



universität  
wien

# MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

Risikomarker Apolipoprotein B-48?

Analyse von Daten einer Gewichtsreduktionsstudie

Verfasserin

Katharina Möller Bakk.rer.nat

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt: Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer: Prof. Dr. Andreas Hahn







# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>III</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IV</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Übersicht der Lipoproteinklassen und ihrer Apolipoproteine</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Apolipoprotein B-48-haltige Lipoproteine</b>	<b>5</b>
2.2.1 Apolipoprotein B-48	5
2.2.2 Methoden zur Bestimmung Apolipoprotein B-48 haltiger Lipoproteine	6
2.2.3 Stoffwechsel der Apolipoprotein B-48-haltigen Lipoproteine	7
2.2.4 Atherogenes Potential der Apolipoprotein B-48-haltigen Lipoproteine	10
<b>2.3 Apolipoprotein B-48-haltige Lipoproteine im Rahmen von Übergewicht und dem metabolischen Syndrom</b>	<b>12</b>
<b>2.4 Interventionsbedingter Einfluss auf Apolipoprotein B-48-haltige Lipoproteine</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Charakterisierung der zugrundeliegenden Studie</b>	<b>17</b>
<b>3.2 Proben</b>	<b>18</b>
<b>3.2 Enzym-gekoppelter Immunosorbenstest</b>	<b>18</b>
3.2.1 Prinzip des Apo B-48 ELISAs	19
3.2.2 Durchführung des Apo B-48 ELISAs	20
3.2.3 Quantitative Auswertung	22
<b>3.3 Präzisionskontrollen</b>	<b>23</b>
<b>3.4 Klassifizierung des Studienkollektivs nach Kriterien des metabolischen Syndroms</b>	<b>24</b>
<b>3.5 Klassifizierung des Studienkollektivs anhand kardiovaskulärer Risikofaktoren zur Beschreibung eines Risikoprofils</b>	<b>25</b>
<b>3.6 Definition von Risikogruppen zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos</b>	<b>27</b>
<b>3.7 Statistische Auswertungen</b>	<b>28</b>
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>29</b>

<b>4.1 Präzisionskontrollen</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Charakterisierung des Studienkollektivs</b>	<b>29</b>
4.2.1 Anthropometrische Daten und Blutdruck	30
4.2.2 Biochemische Daten	31
<b>4.3 Apolipoprotein B-48-Konzentration des Studienkollektivs</b>	<b>31</b>
<b>4.4 Korrelationen anthropometrischer und biochemischer Parameter mit Apolipoprotein B-48</b>	<b>33</b>
<b>4.5 Zusammenhang des Apolipoproteins B-48 mit dem metabolischen Syndrom</b>	<b>36</b>
<b>4.6 Die Rolle des Apolipoproteins B-48 innerhalb kardiovaskulärer Risikofaktoren</b>	<b>37</b>
<b>4.7 Apolipoprotein B-48 innerhalb der definierten Risikogruppen zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos</b>	<b>38</b>
<b>4.8 Änderungen nach zwölf-wöchiger Interventionsphase</b>	<b>40</b>
4.8.1 Einfluss auf Parameter innerhalb der Beobachtungsgruppen Männer und Frauen	40
4.8.3 Einfluss auf Parameter innerhalb der Interventions- und Placebogruppe	41
4.8.2 Korrelationen von Ausgangswerten und Differenzen des Gewichts sowie biochemischen Daten mit Apolipoprotein B-48	42
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>45</b>
<b>5.1 Apolipoprotein B-48 innerhalb eines übergewichtigen Kollektivs</b>	<b>46</b>
<b>5.2 Korrelationen des Apolipoproteins B-48 mit Parametern des Lipid- und Glukosestoffwechsels</b>	<b>47</b>
<b>5.3 Zusammenhang des Apolipoproteins B-48 mit dem metabolischen Syndrom</b>	<b>48</b>
<b>5.4 Die Rolle des Apolipoproteins B-48 innerhalb kardiovaskulärer Risikofaktoren</b>	<b>50</b>
<b>5.5 Apolipoprotein B-48 innerhalb der definierten Risikogruppen zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos</b>	<b>51</b>
<b>5.6 Einfluss interventionsbedingter Änderungen in Bezug auf die Apolipoprotein B-48 Konzentration</b>	<b>52</b>
<b>5.7 Methodische Kritik</b>	<b>54</b>
<b>6. SCHLUSSBETRACHTUNG</b>	<b>56</b>
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>58</b>
<b>8. SUMMARY</b>	<b>59</b>
<b>9. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>60</b>
<b>10. ANHANG</b>	<b>71</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACAT-2	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase-2
Apo B-48	Apolipoprotein B-48
ApoB48R	Apo B-48 Rezeptor
CM	Chylomikronen
CM-R	Chylomikronen Remnants
DBP	diastolischer Blutdruck
ECAM-1	Zell-Adhäsions-Molekül 1
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HDL	High-Density Lipoprotein
HOMA-[IR]	Homeostasis Model Assessment [of Insulin Resistance]
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykanen
HL	hepatische Lipase
IDL	Intermediate-Density Lipoprotein
KHK	koronare Herzerkrankungen
LCAT	Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase
LDL	Low-Density Lipoprotein
LDLR	LDL-Rezeptor
LPL	Lipoproteinlipase
LRP-1	LDL-Related-Protein-1
MCP-1	Monozyten-chemotaktische Protein-1
MetS	Metabolisches Syndrom
MTP	Mikrosomale Triglycerid Transfer Protein
SBP	systolischer Blutdruck
TG	Triglyceride
TGRL	Triglycerid-reiche Lipoproteine
VCAM-1	Vascular-Adhäsions Molekül-1
VLDL	Very-Low-Density Lipoprotein

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der verschiedenen Lipoproteine _____	3
Abbildung 2: Stoffwechsel der Apolipoprotein B-48-haltigen Lipoproteine _____	9
Abbildung 3: Chylomikronen und Chylomikronen-Remnants im Prozess der Atherosklerose _____	11
Abbildung 4: Prinzip des Sandwich ELISAs _____	19
Abbildung 5: Erstellung einer Standardreihe _____	20
Abbildung 6: Pipettierschema auf einer 96 Well Mikrotiterplatte _____	21
Abbildung 7: Standardkurve von Apo B-48 eines ELISAs _____	23
Abbildung 8: Verteilung der Apolipoprotein B-48 Konzentration der Männer und Frauen	32
Abbildung 9: Pearson-Korrelation von Apolipoprotein B-48 mit Parametern des Lipidprofils (Männer und Frauen) _____	35
Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung der Kriterien für das metabolische Syndrom bei Männern und Frauen _____	36
Abbildung 11: Zusammenhang zwischen der Apolipoprotein B-48-Differenz mit dem Apolipoprotein B-48-Ausgangswert _____	42
Abbildung 12: Zusammenhang zwischen der Differenz des Apolipoproteins B-48 mit dem Ausgangswert des Gewichts und der Differenz des Gewichts _____	43

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften, Zusammensetzung und Apolipoproteine der Lipoproteinfraktionen _____	4
Tabelle 2: Kriterien für die Diagnose des metabolischen Syndroms nach Alberti et al., 2009 _____	25
Tabelle 3: Klassifikation von Risikofaktoren anhand definierter Grenzwerte _____	27
Tabelle 4: Mittelwert, Standardabweichungen und Variationskoeffizient der Präzisionskontrollen _____	29
Tabelle 5: Anthropometrische Daten und Daten des Blutdrucks zum Zeitpunkt der Basisuntersuchung _____	30
Tabelle 6: Biochemische Daten zum Zeitpunkt der Basisuntersuchung (Mittelwert $\pm$ SD)	31
Tabelle 7: Apolipoprotein B-48 Konzentration des Studienkollektivs (Mittelwert $\pm$ SD) __	32
Tabelle 8: Spearman Korrelationsmatrix von Apo B-48 mit anthropometrischen und biochemischen Daten (Gesamtkollektiv) _____	34
Tabelle 9: Pearson Korrelationsmatrix von Apo B-48 mit anthropometrischen und biochemischen Daten (Männer und Frauen) _____	34
Tabelle 10: Apolipoprotein B-48 Konzentration beim metabolischen Syndrom _____	37
Tabelle 11: Häufigkeiten und Apolipoprotein B-48-Konzentration innerhalb der definierten Grenzwerte der Risikofaktoren _____	38
Tabelle 12: Häufigkeiten und Apolipoprotein B-48 Konzentration innerhalb der geringen, moderaten und hohen Risikogruppe _____	39
Tabelle 13: Änderungen der Apolipoprotein B-48 Konzentration im Gesamtkollektiv sowie Männern und Frauen nach zwölf-wöchiger Intervention _____	41
Tabelle 14: Änderung der Apolipoprotein B-48-Konzentration in der Interventions- und Placebogruppe nach zwölf-wöchiger Intervention _____	42
Tabelle 15: Spearman Korrelationskoeffizienten des Apolipoprotein B-48-Ausgangswertes mit Differenzen von Parametern des Lipidprofils nach zwölf-wöchiger Intervention _____	44



## 1. Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen zu den häufigsten chronischen Erkrankungen und sind eine wesentliche Ursache für Morbidität und Mortalität. Im Jahr 2011 wurden 40% bzw. 42% der Sterbefälle in Deutschland und Österreich aufgrund von koronaren Herzerkrankungen verursacht [Statistisches Bundesamt, 2012; Statistik Austria, 2012]. Die Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind multifaktoriell bedingt. Während Übergewicht, Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Inaktivität und Nikotinabusus die wichtigsten beeinflussbaren Risikofaktoren darstellen, zählen Lebensalter, familiäre Disposition und männliches Geschlecht zu den unbeeinflussbaren Risikofaktoren für die Inzidenz einer koronaren Herzkrankheit (KHK) [Grundy et al., 1998; Assmann et al., 2002]. Übergewicht und besonders Adipositas nehmen dabei eine wesentliche Rolle im Rahmen der Pathogenese von atherosklerotischen Gefäßerkrankungen ein [Poirier et al., 2006; Whitlock et al., 2009]. Dabei gilt auch die Verteilung der Fettmasse zu berücksichtigen. Durch die Vermehrung des viszeralen, also abdominellen, Fettgewebes werden eine Vielzahl metabolischer Effekte eingeleitet, welche die Entstehung einer chronischen Inflammation sowie weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren bis hin zum metabolischen Syndrom fördern [Eckel et al., 2005; Redberg et al., 2009]. Diese metabolischen Störungen werden häufig begleitet durch eine postprandiale Dyslipidämie [Redgrave, 2008; Ford et al., 2009; Subramanian und Chait, 2012]. Gekennzeichnet ist diese neben der Anreicherung hepatischer Lipoproteine auch durch die Anhäufung intestinaler Lipoproteine, die aufgrund einer gesteigerten Produktion oder eines gestörten Abbaus erfolgt [Klop et al., 2011; Duez et al., 2006]. Die gleichzeitige Ansammlung der in den Lipoproteinen enthaltenen Triglyceride und Cholesterinester fördert den Prozess der Atherosklerose [Proctor und Mamo, 1998, Proctor et al., 2002; Tomkin und Owens, 2011]. Daher wird die postprandiale Dyslipidämie als Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse angesehen [Karpe, 1999; Weintraub et al., 1996; Sarwar, 2007].

Zu den intestinalen Lipoproteinen zählen die Chylomikronen und ihre Abbauprodukte (Chylomikronen-Remnants). Beide besitzen als festen Bestandteil an ihrer Oberfläche das Apolipoprotein (Apo) B-48. Die Nüchternkonzentrationen des Apo B-48 korrelieren mit der Anreicherung der Lipoproteine im postprandialen Zustand [Smith et al., 1999]

und geben so Hinweise auf die postprandiale Hyperlipidämie [Sato et al., 2009, Masuda et al., 2012].

Studien zeigen, dass vorliegende kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Übergewicht, metabolisches Syndrom, Diabetes mellitus Typ II oder bereits vorhandene KHK mit erhöhten Apo B-48-Konzentrationen assoziiert sind [Chan et al., 2002a; Dane-Stewart et al., 2003; Kinoshita et al., 2009; Masuda et al., 2012]. Apo B-48 wird daher als zusätzlicher Marker für das kardiovaskuläre Risiko diskutiert [Alipour et al., 2012].

Ziel der durchgeführten Untersuchung ist die Klärung der Frage, ob Apo B-48 einen weiteren Risikomarker darstellen kann und somit die derzeitige Studienlage bestätigt wird. Dafür wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Wie sind die Konzentrationen des Apo B-48 innerhalb eines übergewichtigen Kollektivs aus Männern und Frauen?
2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Apo B-48-Konzentration mit anthropometrischen Daten oder mit Parametern des Lipidprofils bzw. des Glucosstoffwechsels?
3. Wie wirkt sich das Vorhandensein des metabolischen Syndroms und anderen kardiovaskulären Risikofaktoren auf die Apo B-48-Konzentration aus?
4. Hat die Gewichtsreduktion einen Einfluss auf die Apo B-48 Konzentration? Können Änderungen aufgrund der Intervention begründet werden?

Im Folgenden sollen zunächst die Lipoproteinklassen und ihre Apolipoproteine charakterisiert werden, um im weiteren Verlauf speziell die Apo B-48-haltigen Lipoproteine zu beschreiben. Dabei werden das Apo B-48 sowie mögliche Messmethoden vorgestellt, bevor auf den Metabolismus sowie das atherogene Potential der Apo B-48-haltigen Lipoproteine eingegangen wird. Danach soll der Zusammenhang der Apo B-48-haltigen Lipoproteine mit Übergewicht und dem metabolischen Syndrom aufgezeigt werden und welchen Einfluss eine Gewichtsreduktion darauf hat. Als nächstes wird die eigene Untersuchung vorgestellt. Dazu wird anfänglich beschrieben aus welcher zugrundeliegenden Studie die hier verwendeten Proben stammen, um dann die angewendete Methode zur Messung der Apo B-48-Konzentration darzulegen. Hierauf folgen die Definition des metabolischen Syndroms sowie die Eingrenzung verschiedener Risikofaktoren, um Rückschlüsse auf das kardiovaskuläre Risiko zu erhalten. Im Anschluss werden die Ergebnisse vorgestellt und diskutiert, um abschließend eine Schlussfolgerung aus den diskutierten Ergebnissen zu ziehen.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Übersicht der Lipoproteinklassen und ihrer Apolipoproteine

Lipoproteine sind mizellartige Komplexe, die als Transportproteine für die im Blut vorhandenen Lipide wie Triglyceride, Cholesterin, Cholesterinester, Phospholipide, freie Fettsäuren und fettlösliche Vitamine dienen. Während die hydrophoben Lipide Bestandteile des unpolaren Kerns der Lipoproteine sind, besteht die Oberfläche aus polaren Phospholipiden (Lecithin), freiem unveresterten Cholesterin sowie den Apolipoproteinen. Letztere ermöglichen aufgrund ihrer amphipatischen Molekülstruktur, auf der einen Seite hydrophile und auf der anderen Seite hydrophobe Aminosäureketten, die Komplexierung der Lipide, so dass eine Interaktion zwischen den hydrophoben Kernlipiden und der wässrigen Umgebung des Plasmas entsteht [Mahley et al., 1984].

Die Einteilung der Lipoproteine erfolgt anhand ihrer Eigenschaften z.B. nach Molekülgröße und Dichte. Letztere beruht auf der unterschiedlichen Protein-Lipid-Zusammensetzung (siehe Abbildung 1). Mittels Ultrazentrifugation können mindestens fünf verschiedene Lipoproteinfraktionen aufgetrennt werden: Chylomikronen (CM,  $d < 1,000$  g/dl), Lipoproteine mit sehr geringer Dichte (Very-Low-Density Lipoproteins (VLDL,  $d < 1,005$  g/dl)), Lipoproteine mittlerer Dichte (Intermediate-Density Lipoproteins (IDL,  $d < 1,019$  g/dl)), Lipoproteine geringer Dichte (Low-Density Lipoproteins (LDL,  $d < 1,063$  g/dl)) und Lipoproteine hoher Dichte (High-Density Lipoproteins (HDL,  $d < 1,125$  g/dl)) [Kostner et al., 2006].

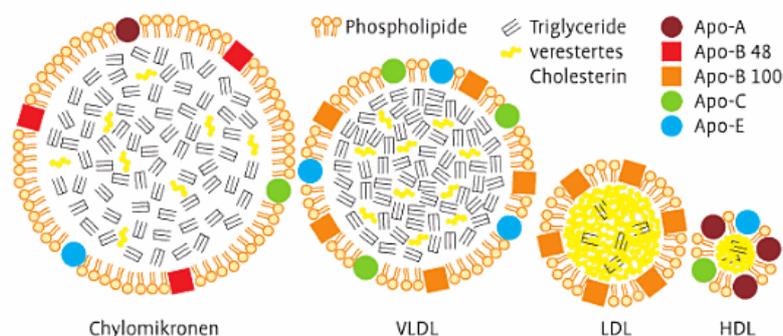


Abbildung 1: Aufbau der verschiedenen Lipoproteine

[Thiery, 2010]

Die Apolipoproteine zählen zu den Oberflächenbestandteilen der Lipoproteine. Die Kategorisierung erfolgt in verschiedene Hauptklassen (Apo A-E) innerhalb derer die Apolipoproteine nochmals aufgeteilt werden wie beispielsweise in Apo A-I bis Apo A-V. Außerdem lassen sie sich in austauschbare und nichtaustauschbare Apolipoproteine einteilen. Zur ersten Gruppe zählen Apo A-I bis A-V, Apo C-I bis C-III sowie Apo E, welche zwischen den verschiedenen Lipoproteinen austauschbar sind. Zur Gruppe der nichtaustauschbaren zählen Apo B-100 und Apo B-48. Diese können nicht zwischen den Lipoproteinen wechseln. Meist befindet sich auf den verschiedenen Lipoproteinfraktionen eine Kombination aus zwei oder mehr Apolipoproteinen. [Alaupovic, 1972]. In Tabelle 1 ist eine Übersicht der verschiedenen Lipoproteinfraktionen nach Dichte, Durchmesser, Zusammensetzung und enthaltenen Apolipoproteinen dargestellt.

**Tabelle 1: Eigenschaften, Zusammensetzung und Apolipoproteine der Lipoproteinfraktionen [nach Kostner et al., 2006]**

Lipoproteine	CM	VLDL	IDL	LDL	HDL
<b>Eigenschaften</b>					
Dichte [g/dl]	< 1,000	< 1,005	< 1,019	< 1,063	< 1,125
Durchmesser [nm]	75 – 1200	50	30	21	12
Cholesterinester [%]	2	13	34	41	13
Triglyceride [%]	90	54	20	4	5
Phospholipide [%]	5	16	20	21	35
Apolipoproteine	A-I, A-IV, C-II, C-III, E, B-48	A-V, B-100, C-II, C-III, E	B-100, C-III, E	B-100	A-I, A-II, A-IV, A-V, E

Apolipoproteine übernehmen neben der lipidkomplexierenden Eigenschaft auch funktionelle Aufgaben im Lipidstoffwechsel. Sie sorgen einerseits für die Stabilisierung der Lipoproteine, andererseits dienen sie als Cofaktoren für Enzyme oder binden an Membranrezeptoren, um so die Aufnahme in die Zielzelle zu steuern. Apo A-I beispielsweise aktiviert die Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase (LCAT), Apo A-II

übernimmt die Rolle als Aktivator der hepatischen Triglyceridlipase (HL) und Apo C-II führt durch Anregung der Lipoproteinlipase zur Hydrolyse der Triglyceride (TG). [Alaupovic, 2003]. Die Apo B-Proteine sind überwiegend in den Triglycerid-reichen Lipoproteinen (TGRL) wie CM und VLDL zu finden, die Apo A-Proteine hingegen hauptsächlich in der HDL-Fraktion [Tam et al., 1983].

## **2.2 Apolipoprotein B-48–haltige Lipoproteine**

Die CM und ihre Remnants (CM-R) zählen zu den Apo B-48-haltigen Lipoproteinen und sind Bestandteile des exogenen Lipoproteinstoffwechsels. Ihre Aufgabe besteht darin, die mit der Nahrung aufgenommenen Fette und fettlöslichen Lipide im Blut zu den peripheren Organen und der Leber zu transportieren. Diese werden dort wieder zusammengebaut und teilweise als VLDL-Partikel zurück ins Blut gegeben oder gespeichert [Kostner et al., 2006].

### **2.2.1 Apolipoprotein B-48**

Apo B-48 ist ein fester Bestandteil der CM und gehört neben dem Apo B-100 zur Gruppe Apolipoprotein B. Dieses ist ein amphipatisches Molekül, welches mit einem Molekulargewicht von 550 kDa zur Gruppe der größeren Strukturapolipoproteine zählt. Aufgrund seiner Tertiärstruktur aus antiparallel verlaufenden  $\beta$ -Faltblattstrukturen besteht eine feste Assoziation mit dem Lipidkern und dem Apo B. Dies ist vermutlich auch der Grund dafür, dass für Apo B kein Austausch zwischen den einzelnen Lipoproteinen möglich ist [Segrest et al., 2001]. Die Transkription des Apo B-48 erfolgt vom gleichen Gen wie Apo B-100, jedoch wird Apo B-48 ausschließlich in den Mukosazellen des Dünndarms gebildet. Während der Synthese des Apo B-48 erfolgt nach der Transkription eine Bearbeitung der RNA (Ribonukleinsäure; engl.: ribonucleic acid), auch RNA-Editing genannt. Dabei wird im Darm die mRNA des Apo B-100 aufgrund des Enzyms Cytosindeaminase (APOBEC1) dahingehend modifiziert, dass die Synthese des Apo B-48 erfolgen kann. Aufgrund der Expression der Cytosindeaminase wird während der Transkription die Position 2153 (CAA) der Apo B-100 mRNA in ein Stoppcodon (UAA) umgewandelt. Hierdurch endet die Translation der mRNA früher und der Syntheseabbruch folgt [Powell et al., 1987]. Apo B-48 besteht somit lediglich aus N-terminalen 48% des Apo B-100, so dass die entscheidenden Sequenzen fehlen, welche für die Bindung am LDL-Rezeptor benötigt werden [Segrest et al., 2001].

### **2.2.2 Methoden zur Bestimmung Apolipoprotein B-48 haltiger Lipoproteine**

Der Stoffwechsel der Apo B-48-haltigen Lipoproteine ist von immer größerem Interesse, seitdem viele Studien einen Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Ereignissen und den postprandialen Apo B-48-haltigen Lipoproteinen gefunden haben [Alipour et al., 2012; Pal et al., 2003]. Demzufolge ist es wichtig den postprandialen Stoffwechsel zu identifizieren.

Die Untersuchung des postprandialen Stoffwechsels erfolgt im Anschluss an eine nächtliche Nüchternphase durch eine orale Fettzufuhr. Nach der Verdauung wird in einem Zeitraum von zehn bis zwölf Stunden alle ein bis zwei Stunden Blut abgenommen und auf Marker des postprandialen Stoffwechsels wie TG, Retinyl-Ester, Remanant-like-Partikel oder Apo B-48 untersucht. Mittels der Fläche unter der Kurve („area under the curve“), die sich aus dem Verlauf der gemessenen Konzentrationen ergibt, wird die postprandiale Antwort bestimmt [Su et al., 2009; Nagata et al., 2012]. Die Nüchternkonzentrationen des Apo B-48 erwiesen sich dabei als besten Marker für den Nachweis der postprandialen Lipide [Smith et al., 1999; Masuda et al., 2012]. Ein Molekül Apo B-48 ist auf einem CM sowie CM-R Partikel assoziiert. Die Serumkonzentration des Apo B-48 umfasst demnach die Anzahl der CM sowie CM-R und ist geeignet für die quantitative Bestimmung postprandialer Anreicherungen der intestinalen Lipoproteine [Masuda et al., 2012].

Zum Nachweis von Apo B-48 mittels Enzym-gekoppelten-Immunsorbent-Assay (engl. ELISA) entwickelten Uchida et al. einen monoklonalen Antikörper gegen Apo B-48 [Uchida et al., 1998]. Es gilt jedoch zu beachten, dass ein Antigen viele Epitope besitzen kann. Von verschiedenen B-Zellen produzierte Antikörper können so dieses eine Antigen erkennen und binden. Solch ein Gemisch bezeichnet man als polyklonale Antikörper und ist für einen spezifischen Assay nicht besonders nützlich, da diese in ihrer Spezifität und Affinität gegenüber einem Antigen variieren. Vielmehr sind für Anwendungen eines Immunoassays reine Antikörper notwendig, damit diese spezifisch das gesuchte Protein erkennen und keine Bindungen mit strukturell ähnlichen Proteinen eingehen, um eine hohe Spezifität zu gewährleisten. Zur Herstellung solcher monoklonalen Antikörper ist es erforderlich B-Zellen die einen bestimmten Antikörper produzieren, zu isolieren und zu kultivieren. Somit kann sichergestellt werden, dass diese Antikörper nur ein Epitop des Antigens erkennen [Clark und Pazdernik, 2009 S. 289; Gey, 2008 S. 351]. Im Falle des Apo B-48 wurde das C-terminale Ende des Apo

B-48 Peptids (bestehend aus einem N-terminalen Cysteinrest, welcher mit dem C-terminalen Hexapeptid des Apo B-48 verbunden ist) als Immunogen für die monoklonale Antikörperproduktion verwendet [Uchida et al., 1998].

In Untersuchungen mit dem monoklonalen Antikörper gegen Apo B-48 zeigten sich keinerlei Kreuzreaktivität gegenüber dem Apo B-100 [Kinoshita et al., 2005]. Bei Anwendungen des ELISAs konnte gezeigt werden, dass Nüchternkonzentrationen des Apo B-48 mit der „area under the curve“ nach einer oralen Fettzufuhr korrelieren [Sakai et al., 2003], so dass mittels Apo B-48 eine Beurteilung der postprandialen intestinalen Lipoproteine möglich scheint.

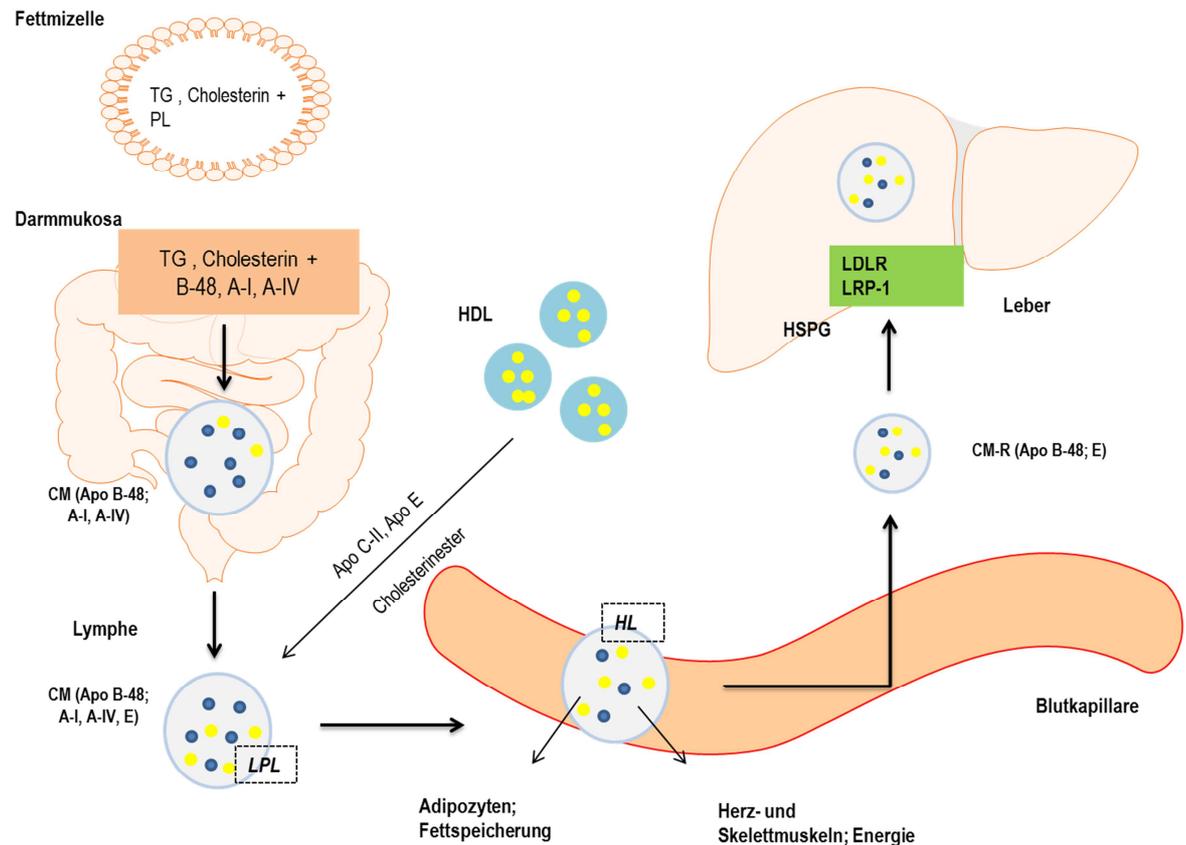
### **2.2.3 Stoffwechsel der Apolipoprotein B-48–haltigen Lipoproteine**

Die Apo B-48-haltigen Lipoproteine sind Bestandteile des exogenen Lipoproteinstoffwechsels. Dieser Stoffwechsel beginnt mit dem Eintreffen der im Rahmen der Lipidverdauung entstandenen wasserunlöslichen Lipide im Gastrointestinaltrakt. Die Lipide werden als Mono- und Diglyceride sowie Cholesterinester zusammen mit freien Fettsäuren, Phospholipiden und Gallensäure emulgiert und als Mizellen in den Epithelzellen des Dünndarms resorbiert [Kostner et al., 2006]. Dort erfolgt die Re-Synthese der TG innerhalb der Mucosazellen entweder durch eine de-novo Synthese aus  $\alpha$ -Glycerophosphat und freien Fettsäuren oder mittels Aktivierung langkettiger Fettsäuren zu Acyl-CoA. Über die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase-2 (ACAT-2) wird das resorbierte Cholesterin verestert [Biesalski und Grimm, 2007].

Die neu entstandenen TG und Cholesterinester werden zusammen mit den Apo A-I und Apo B-48 über das mikrosomale Triglycerid Transfer Protein (MTP) als CM in den Enterozyten des Dünndarms zusammengebaut. Dabei handelt es sich zunächst um kleine, unreife CM, welche daher als nascente CM bezeichnet werden [Tomkin und Owens, 2011]. Diese intestinale CM-Sekretion wird in Folge einer fettreichen Mahlzeit stimuliert [Chan et al., 2002a] und die Partikel variieren je nach Zufuhr der Nahrungslipide in der Größe zwischen 75 – 3000 nm. Nach Exozytose erfolgt die Abgabe in die intestinalen und im Weiteren mesenteralen Lymphgefäße. Bevor sie letztlich in die Blutzirkulation gelangen wird die Reifung der CM abgeschlossen, indem Apo C-II, Apo C-III, Apo E und Cholesterin von HDL auf die CM übertragen werden. Apo C-II ist ein essentieller Aktivator der Lipoproteinlipase (LPL), die über

Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) an die Oberfläche von Blutgefäß-Endothelzellen gebunden ist [Fujioka und Ishikawa, 2009; Mahley und Huang, 2007]. Die LPL hydrolysiert TG und setzt damit Fettsäuren aus den CM frei, die gezielt als Energiequelle in Herz- und Skelettmuskel oder zur Speicherung im Fettgewebe zur Verfügung gestellt werden können [Biesalski und Grimm, 2007].

Durch die Hydrolyse kommt es neben der Größenreduktion auch zur Abgabe von Apo A und Apo C auf HDL. Die neu entstandenen Lipoproteine bezeichnet man als Chylomikronen-Remnants (CM-R). Sie variieren in der Größe zwischen 40 – 60 nm, sind reich an Cholesterinestern und enthalten weiterhin Apo B-48 sowie Apo E [Fujioka und Ishikawa, 2009; Redgrave, 2004]. Die CM-R werden weiter mittels der hepatischen Lipase (HL) bearbeitet. Anschließend erfolgt die Entfernung aus der Blutzirkulation über verschiedene Mechanismen in die Leber. Vor allem ist dabei die Aufnahme über Apo E mittels hepatischen LDL-Rezeptors (LDLR) und dem LDL-Related-Protein (LRP1) zu nennen [Mahley und Huang, 2007]. Der LRP1 ist insulinresistent und wird durch Insulinresistenz down-reguliert [Laatsch et al., 2009], wodurch die Aufnahme der CM-R in die Leber sinkt. Das ebenfalls in den Hepatozyten enthaltene HSPG ist an der Bindung und Aufnahme der CM-R in die Leber beteiligt. Über seine Sulfatgruppen ( $\text{SO}_4$ ) bindet es neben der LPL auch Apo E sowie die HL und unterstützt so die effektive Aufnahme der CM-R über den LDLR und LRP, indem es den lipolytischen Prozess aufrechterhält [Cooper, 1997; Mahley und Huang, 2007]. Der Ablauf des CM-Stoffwechsels ist in der Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2: Stoffwechsel der Apolipoprotein B-48-haltigen Lipoproteine**

(TG: Triglyceride; PL: Phospholipide; CM: Chylomikronen; LDLR: LDL-Rezeptor; LRP-1: LDL-Rezeptor-Related Protein; HSPG - Heparansulfat-Proteoglykanen; LPL: Lipoproteinlipase; HL: Hepatische Lipase; blaue Punkte: Triglyceride; gelbe Punkte: Cholesterin)

[modifiziert nach Fujioka und Ishikawa, 2009; Cooper, 1997]

Der Stoffwechsel der Apo B-48-haltigen Lipoproteine ist zudem mit dem Stoffwechsel der hepatischen Apo B-100-haltigen VLDL verbunden. Die CM beeinträchtigen den VLDL-Stoffwechsel, da beide um die LPL konkurrieren, so dass sich die Zirkulation der VLDL-Partikel verlängert und eine erhöhte postprandiale VLDL-Konzentration resultiert [Cohn et al., 1993]. Zusätzlich kann Insulin die VLDL-Sekretion unterdrücken, so dass vor allem im postprandialen Zustand bei Anwesenheit von Insulin weniger VLDL-Partikel vorhanden sind [Lewis und Steiner, 1996].

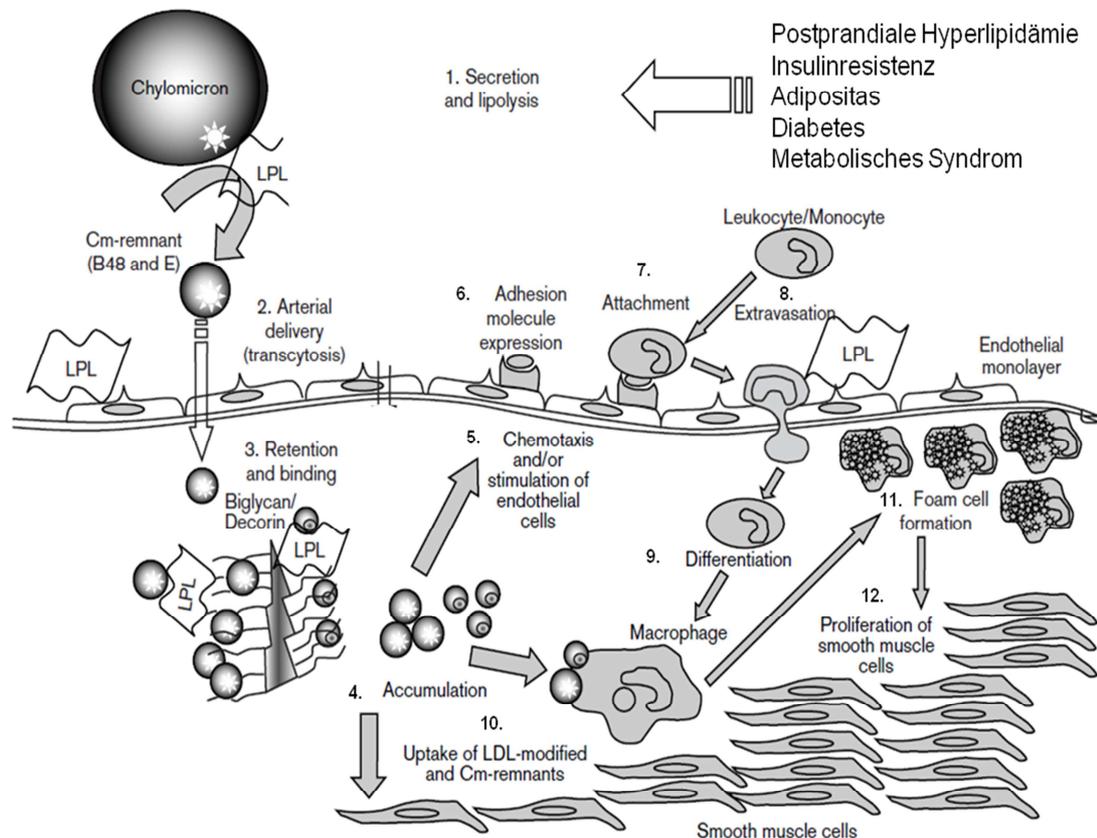
Letztlich ist die CM-Konzentration von der intestinalen Sekretion, der Konversion zu CM-R sowie dem hepatischen Clearance abhängig. Ein physiologischer Stoffwechsel Apo B-48-haltigen Lipoproteine ist charakterisiert durch eine schnelle Hydrolyse der CM und CM-R, wodurch eine Größenreduktion sowie eine anschließende hepatische Aufnahme innerhalb weniger Stunden nach der Mahlzeit resultiert [Nakatani et al., 2011].

## 2.2.4 Atherogenes Potential der Apolipoprotein B-48-haltigen Lipoproteine

Der Einfluss der Apolipoprotein B-48-haltigen Lipoproteine auf die Atherogenese scheint zunächst umstritten, jedoch wird das atherogene Potential in Studien immer häufiger thematisiert [Ginsberg, 2002; Fujioka und Ishikawa, 2009]. So wurde in erster Linie davon ausgegangen, dass nascente CM aufgrund ihrer Größe die Gefäße nicht durchdringen können und daher nicht direkt in den Prozess der Atherosklerose involviert sind [Nordestgaard und Tybjaerg-Hansen, 1992]. Proctor und Mamo zeigten jedoch, dass CM in Form ihrer Remnants klein genug, sind um die Gefäße zu penetrieren um sich im subendothelialen Raum einzulagern [Proctor und Mamo, 1998; Proctor et al., 2002].

Die Rolle der Apolipoprotein B-48-haltigen Lipoproteine im Prozess der Atherosklerose- Entwicklung kann gut mittels der „*Response-to-injury*-Theorie“ beschrieben werden. Diese basiert darauf, dass Endothelverletzungen durch Faktoren wie Hypertonie, veränderte Lipoproteine, Zigarettenrauchen oder Hyperhomocysteinämie verursacht werden und somit die Permeabilität erhöhen, wodurch die Infiltration von Lipoproteinen in den subendothelialen Raum erleichtert wird [Thiery und Teupser, 2006]. Im speziellen gelangen hierbei die Lipoproteine nach der Hydrolyse mittels Transzytose durch die Gefäßwand. Es handelt sich dabei um einen Vesikeltransport vom Plasma der Zelle in den subendothelialen Raum (Abbildung 3; Schritt 1,2). Aufgrund der limitierten Partikelgröße von maximal 70 nm ist dieser Weg vor allem für CM-R (40 – 60 nm) sowie LDL (27 nm) passierbar [Proctor et al., 2002]. Nach Erreichen des subendothelialen Raums werden die CM-R mittels Proteoglykanen gebunden und in der Intima festgehalten (Abbildung 3; Schritt 3,4). *In vivo* konnte gezeigt werden, dass CM die Endothelzellen anregen, woraufhin diese chemotaktisch wirksame Signalstoffe wie das Monozyten-chemotaktische Protein-1 (MCP-1) sezernieren (Abbildung 3; Schritt 5-7) [Domoto et al., 2003]. Dies kann letztlich die Infiltration von Monozyten sowie deren Transformation zu Makrophagen fördern (Abbildung 3; Schritt 8,9) [Thiery und Teupser, 2006]. Gleichzeitig beginnen Endothelzellen mit der Freisetzung von Adhäsionsmolekülen wie Zell-Adhäsions-Molekül-1 (ECAM-1) und Vascular-Adhäsions-Molekül-1 (VCAM-1) [Fujioka und Ishikawa, 2009]. Makrophagen binden und internalisieren Lipidpartikel über Rezeptor-vermittelte Endozytose. Bei Überladung transformieren die Makrophagen zu Schaumzellen, welche durch weitere Mediatoren zur Migration und Proliferation von

glatten Muskelzellen führen (Abbildung 3; Schritt 10-12). Daraufhin folgt die Bildung der reversiblen Läsion „fatty streaks“ bis hin zum fortgeschrittenen und komplizierten Plaque [Thiery und Teupser, 2006].



**Abbildung 3: Chylomikronen und Chylomikronen-Remnants im Prozess der Atherosklerose**

[nach Proctor et al., 2002]

Einerseits zeigen Untersuchungen des Aufnahmemechanismus der CM-R über die Makrophagen, dass die CM-R mit LDL um die Apo E vermittelte Aufnahme über den LDLR konkurrieren. Andererseits konnte zusätzlich ein für Apo B-48 spezifischer Rezeptor identifiziert werden [Tomkin und Owens, 2011]. Der Apo B-48 Rezeptor (ApoB48R) befindet sich auf Monozyten, Makrophagen sowie Endothelzellen. Es ist ein Apo E-unabhängiger Rezeptor, der zusätzlich freie Fettsäuren und fettlösliche Vitamine für die Zellen zur Verfügung stellt [Brown et al., 2002]. In *in vitro* Untersuchungen wurde gezeigt, dass die TGRL und ihre Remnants die einzigen nativen, nichtmodifizierten Lipoproteine sind, die über ApoB48R in Makrophagen aufgenommen werden und diese schließlich zu Schaumzellen formatieren können [Brown et al., 2000].

Zusätzlich könnten über den ApoB48R Stoffwechselwege eingeleitet werden, die das thrombotische Risiko erhöhen [Gianturco und Bradley, 1999]. Dabei bewirkt die Stimulierung des ApoB48 an den Endothelzellen eine Inhibierung der antithrombotischen Eigenschaften. So folgt die verminderte fibrinolytische Kapazität durch Hemmung der Plasminogenbindung an die Endothelzellen sowie die Expression des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors (PAI-1), wodurch letztlich die Plasminproduktion gehemmt ist [Gianturco und Bradley, 1999].

Masuda et al. zeigte, dass bei bereits vorhandenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen erhöhte Konzentrationen des Apo B-48 vorliegen [Masuda et al., 2012]. Dies unterstützt vorherige Tier- als auch Humanstudien, in denen Einlagerungen von Apo B-48 im atherosklerotischen Plaque festgestellt werden konnten [Proctor und Mamo, 2003; Pal et al., 2003; Nakano et al., 2008], ein mögliches atherogenes Potential ist daher nicht aus zu schließen.

### **2.3 Apolipoprotein B-48-haltige Lipoproteine im Rahmen von Übergewicht und dem metabolischen Syndrom**

Mit dem Anstieg der Körperfettmasse erhöht sich gleichzeitig das Risiko für atherosklerotische Gefäßerkrankungen wie z.B. KHK oder der arteriellen Verschlusskrankheit [Whitlock et al., 2009]. So scheint eine Hauptursache für den langsamen Rückgang von Herz-Kreislauf-Erkrankungen die deutliche Zunahme der Prävalenz von Übergewicht und Adipositas [Wirth und Gohlke, 2005]. In Deutschland und Österreich sind 66% bzw. 42% der Männer und 51% bzw. 54% der Frauen übergewichtig (Body-Mass-Index (BMI)  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ). Der Anteil der Adipösen ist mit 21% in Deutschland und 13% in Österreich bei beiden Geschlechtern gleich (Body-Mass-Index (BMI)  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) [Max Rubner-Institut, Nationale Verzehrsstudie II 2008; Statistik Austria, 2007].

Vor allem durch die Vermehrung des viszeralen Fettgewebes werden eine Vielzahl metabolischer Effekte eingeleitet, welche die Entstehung einer chronischen Inflammation sowie weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren bis hin zum metabolischen Syndrom fördern [Eckel et al., 2005]. Der Begriff „Metabolisches Syndrom“ (MetS) umschreibt das gemeinsame Auftreten von viszeraler Adipositas, Hypertonie, Fettstoffwechselstörungen in Form von Dyslipoproteinämie und Glukoseintoleranz [Alberti et al., 2009]. Bei Personen mit viszeraler Adipositas und

dem metabolischen Syndrom sind häufig erhöhte TG-Konzentrationen, niedrige HDL-C-Konzentrationen, hohe Insulinwerte und eine Anreicherung von small-dense LDL-Partikeln zu finden [Eckel et al., 2005].

Diese Stoffwechselsituationen bei Adipositas und dem metabolischen Syndrom gehen zusätzlich mit Störungen des postprandialen Stoffwechsels einher, so dass die Aufnahme einer fetthaltigen Mahlzeit zu einer höheren CM-Produktion und einer reduzierten Clearance der CM-R führen kann [Martins und Redgrave, 2004; Subramanian und Chait, 2012]. Die pathophysiologischen Stoffwechselwege werden durch die vermehrten viszeralen Adipozyten ausgelöst. Diese sind sehr stoffwechselaktiv und erhöhen die Lipolyse, welche die Freisetzung freier Fettsäuren steigert. Die Erhöhung der freien Fettsäuren senkt die Insulinsensitivität und Glucoseverwertung peripherer Gewebe, wodurch eine Insulinresistenz gefördert und die Entstehung von Diabetes begünstigt wird [Eckel et al., 2005]. Eine Insulinresistenz kann beispielsweise die erhöhte Produktion intestinaler Apo B-48-haltiger Lipoproteine zur Folge haben. Duez et al. zeigten, dass Personen mit Insulinresistenz gleichzeitig eine erhöhte Produktion der Apo B-48-haltigen Lipoproteine aufweisen [Duez et al., 2006]. Diese Beobachtungen konnten ebenfalls bei Personen mit Diabetes Mellitus Typ II [Hogue et al., 2007] bei viszeral adipösen Männern und bei Vorhandensein des MetS gemacht werden [Chan et al., 2002a; Kinoshita et al., 2009]. Des Weiteren kann die Insulinresistenz eine verminderte Expression der hepatischen Rezeptoren (LDLR) bewirken, so dass sich die Clearance reduziert und eine Erhöhung der CM-R-Partikel nach sich zieht [Dane-Stewart et al., 2003]. Bei Personen mit viszeraler Adipositas konnte diese Rezeptor-Downregulierung festgestellt werden [Mamo et al., 2001]. Im Weiteren kann die Insulinresistenz ursächlich für eine niedrige LPL-Aktivität im postprandialen Zustand sein, wodurch die Lipolyse im Fettgewebe gestört ist und so die postprandiale Dyslipidämie fördert [Panarotto et al., 2002].

Unter physiologischen Umständen wird die hohe lipolytische Aktivität der Adipozyten im Nüchternzustand durch Insulin vermindert. Im Rahmen einer Insulinresistenz resultiert im Nüchternzustand ein Anstieg von freien Fettsäuren in der Zirkulation und Plasma, die in der Leber erneut zu TG verestert und als VLDL-Partikel abgegeben werden, welche eine Hypertriglyceridämie hervorrufen kann [Eckel et al., 2005; Adiels et al., 2008]. Die Anreicherung der VLDL-Partikel führt zudem zu einer Konkurrenz mit den CM und CM-R. Zum einen konkurrieren sie innerhalb der lipolytischen

Stoffwechselwege (LPL, HL) und zum anderen auch um die Aufnahme über den hepatischen Rezeptor (LDLR, LRP1) [Martins und Redgrave, 2004; Laatsch et al., 2009]. Die postprandiale Anreicherung der TGRL bewirkt gleichzeitig den erhöhten Austausch der TG für Cholesterinester über das Cholesterin-Ester-Transfer-Protein (CETP) aus den LDL und HDL Partikeln. Durch lipolytische Prozesse der HL werden die TG-angereicherten LDL- und HDL-Partikel kleiner und dichter sowie erhöht sich ihr atherogenes Potential [Couillard et al., 2002; Chan et al., 2013]. Darüber hinaus befinden sich Personen mit einem vermehrten abdominellen Körperfettgehalt in einem pro-inflammatorischen und pro-thrombotischen Zustand. Das viszerale Fettgewebe wirkt als endokrines Organ und fördert die Sekretion von pro-inflammatorischen (IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ ) und pro-thrombotischen Substanzen (PAI-1) [Eckel et al., 2005].

Somit kann festgehalten werden, dass die postprandiale Dyslipidämie, viszerale Adipositas, das metabolische Syndrom, Insulinresistenz und Entzündungen miteinander verbunden sind [Klop et al., 2011].

## **2.4 Interventionsbedingter Einfluss auf Apolipoprotein B-48-haltige Lipoproteine**

Interventionen zur Minimierung der postprandialen Hyperlipidämie sind zu empfehlen, da diese gleichzeitig mit der Entwicklung der Atherosklerose assoziiert ist [Redgrave, 2008]. Ansatzpunkte zur Verbesserung der postprandialen Hyperlipidämie liefern unter anderem die CM-Produktion, die Optimierung der Clearance sowie der zugrundeliegenden Änderungen von Stoffwechselsituationen [Redgrave, 2008].

### Einfluss der Ernährung

Der Stoffwechsel der CM kann durch die Nahrung modifiziert werden. Zum einen ist die Größe und Zusammensetzung der Lipoproteine von der Fettzufuhr abhängig. Aus einer geringeren Fettzufuhr resultieren kleinere CM-Partikel. Da die Lipolyserate der CM proportional zur Oberfläche der CM-Partikel ist, werden die kleineren CM schneller abgebaut [Martins et al., 1996]. Ein niedriger Fettgehalt in der Nahrung könnte somit aufgrund des möglichen Einflusses auf die Größe der CM, die Apo B-48-Produktion unterdrücken [Redgrave, 2008]. Dennoch zeigen Studien, die den Einfluss einer Supplementierung mit langkettigen omega-3 (n-3) Fettsäuren, wie beispielsweise Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure untersuchten eine Abnahme der

postprandialen Lipoprotein-Antwort [Bravo et al., 2010]. In Folge der Supplementierung kommt es neben der Reduktion der TG auch zur Senkung der Apo B-48-Konzentration [Slivkoff-Clark et al., 2012]. Ein Mechanismus für die Senkung resultiert womöglich aus der verstärkten Clearance [Park und Harris, 2003; Lu et al., 2011] sowie einer reduzierten Re-Synthese der TG und der daraus verminderten CM-Sekretion [Schmidt et al., 2012].

Im Gegensatz dazu hat der Gehalt verdaulicher Kohlenhydrate in der Nahrung eine Anreicherung der postprandialen Lipoproteine nach fettreichen Mahlzeiten zur Folge [Lairon et al., 2007]. Die Zufuhr eines Essens mit hohem Glykämischen-Index, bewirkt zum einen den Anstieg der Blutglukose und gleichzeitig die Anreicherung der Apo B-100- und Apo B-48-haltigen Lipoproteine in der postprandialen Phase [Harbis et al., 2004]. Im Vergleich dazu untersuchte eine Studie den Einfluss einer einmaligen Gabe eines löslichen Ballaststoffs auf die Apo B-48-Konzentration bei übergewichtigen Probanden. Dabei zeigte sich, dass eine Abnahme der postprandialen Lipämie resultiert und damit gleichzeitig die Verbesserung der gestörten CM-Produktion und Clearance [Khossousi et al., 2008].

#### Einfluss pharmakologischer Behandlungen

Ebenfalls pharmakologische Interventionen können eine Verbesserung der CM-Clearance erzielen. Beispielsweise konnte in einer Tierstudie durch die Behandlung mit Probucool die CM-Clearance verbessert werden [Mamo et al., 1993]. Probucool ist eine bisphenolische chemische Verbindung, welche ursprünglich als Antioxidant gebildet wurde und letztlich als Lipidsenker fungiert [Yamamoto, 2008]. Nach Aufnahme erfolgt im Dünndarm die Absorption des Probucools in die CM und initiiert dadurch die Cholesterinester der CM. Diese Einlagerung des Probucools ermöglicht eine erleichterte Aufnahme der CM-R in die Leber und reduziert die Abgabe des Cholesterins an periphere Gewebe. Aufgrund dieser Effekte werden Probucool anti-atherogene Effekte nahegelegt [Mamo et al., 1993]. Die Verbesserung des CM-Stoffwechsels durch Statine wurde ebenfalls aufgezeigt. Bei viszeral-adipösen Personen mit Insulinresistenz erzielte Atrovastin aufgrund eines beschleunigten Abbaus der CM-R über den LDLR eine signifikante Reduktion des Apo B-48. Die Anzahl dieses Rezeptors erhöht sich, da die Cholesterinsynthese durch Atrovastin gehemmt wird [Chan et al., 2002b]. Houge et al. zeigte bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II durch die Behandlung mit Atrovastin einen signifikanten Abfall der CM-Produktion, wodurch sich die Apo B-48 Konzentration reduzierte [Hogue et al., 2008].

### Einfluss einer Gewichtsreduktion

Die Effekte einer Gewichtsreduktion können die postprandiale Hyperlipidämie positiv beeinflussen, da diese mit Verbesserungen der Stoffwechselsituationen assoziiert ist. Damit im Einklang weisen Studien darauf hin, dass moderate Gewichtsreduktionen in Folge einer Nahrungsrestriktion die Verbesserung der postprandialen Clearance von TGRL bei übergewichtigen Frauen [Volek et al., 2004] und auch die Senkung der Nüchternkonzentrationen des Apo B-48, Apo B-100 und der TG bei Personen mit MetS erzielen können [Chan et al., 2008]. Letzteres wird durch die in Folge der Gewichtsreduktion begleitenden Senkungen des Apo C-III erklärt, da so der Abbau der TGRL beschleunigt wird [Chan et al., 2008]. Demgegenüber konnten die Apo B-48-Konzentrationen durch eine Reduktion des Gewichts um 10 kg bei übergewichtigen Männern nach einer moderaten Energierestriktion nicht gesenkt werden [James et al., 2003].

### Einfluss durch Polyglucosamin

Zurzeit gibt es keine Studien, die den Einfluss von lipidadsorbierenden Substanzen wie Polyglucosamin auf Apo B-48-haltige Lipoproteine untersucht haben. Jedoch konnten die Polyglucosamine aufgrund der Wirkungsweise zur Unterstützung von Gewichtsreduktionen oder auch zur Behandlung von Hypercholesterinämie verwendet werden [Mhurchu et al., 2004; Cornelli et al., 2008]. Polyglucosamin oder auch Chitosan kommt in der Natur selbst nicht vor, sondern entsteht durch Abspaltung eines Acetylrestes vom Chitin. Das Chitin ist ein Polysaccharid, welches aus  $\beta(1-4)$ -verknüpften N-Acetylglucosaminmolekülen aufgebaut ist. Es bildet die Gerüstsubstanz von Pilzen, Krustentieren und Insekten. Die Polyglucosaminfasern haben lipidbindende Eigenschaften und sind daher in der Lage Fett zu binden, wodurch die Resorption der Lipide im Gastrointestinaltrakt vermindert wird [Kumar, 2000]. Da die Apo B-48-haltigen Lipoproteine in die Resorption der Lipide involviert sind, kann vermutlich auch die Anwendung der lipidadsorbierenden Substanz einen Einfluss auf die Konzentration haben.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Charakterisierung der zugrundeliegenden Studie

#### Studiendesign- und Ziel

Im Zuge dieser Ausarbeitung wurde das Probenmaterial aus der Studie „*Effektivität eines multifaktoriellen Konzeptes zur Gewichtsreduktion*“ verwendet.

Die ernährungsphysiologische Studie war eine randomisierte, placebo-kontrollierte, doppelblinde Interventionsstudie, die im Jahr 2010 am Institut für Lebensmittelwissenschaft in der Abteilung Ernährungsphysiologie und Humanernährung der Leibniz Universität in Hannover durchgeführt wurde. Im Rahmen der Studie wurde innerhalb eines zwölfwöchigen Interventionszeitraums die Wirksamkeit einer Eiweiß Diät allein und in Kombination mit einem lipidbindenden Medizinprodukt (formoline L112) untersucht.

Ziel der Studie war eine allgemeine Gewichtsreduktion sowie eine Verbesserung laborchemischer Parameter (Lipidprofil, Parameter des Glucosestoffwechsels) der übergewichtigen und adipösen Probanden.

Bei den Teilnehmern der Studie handelte es sich um 120 übergewichtige und adipöse Männer und Frauen mit einem Alter zwischen 30 und 60 Jahren sowie einem Body Mass Index (BMI) zwischen 28 und 35 kg/m<sup>2</sup>. Schwere chronische Erkrankungen (Krebs, manifeste Herz-Kreislauf-Erkrankungen), insulinpflichtige Personen mit Diabetes mellitus Typ I und II, Nieren- bzw. Leberinsuffizienz, Lebererkrankungen, chronische Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, Laktoseintoleranz, Schwangerschaft, Stillzeit und Alkohol oder Drogenmissbrauch wurden als Ausschlusskriterien definiert. Das eiweißreiche Formulaprodukt wurde während des Studienzeitraums täglich als Ersatz für die Mittags- oder Abendmahlzeit verzehrt. Die Studienteilnehmer erhielten zusätzlich zwei lipidbindende Polyglucosamin-Tabletten bzw. identisch aussehende Placebopräparate, welche jeweils zur fettreichsten Mahlzeit am Tag eingenommen wurden [Willers et al., 2012]. Das lipidbindende Verumpräparat besteht aus natürlichen unverdaulichen Faserstoffen ( $\beta$ -1,4-Polymer von D-Glucosamin und N-Acetyl-D-Glucosamin), einem Polyglucosaminpolymer. Weitere Bestandteile

sind: Cellulose (pflanzlich), Vitamin C, Weinsäure, Siliziumoxid und Magnesiumstearat (pflanzlich).

In der Studie erfolgte sowohl zum Zeitpunkt der Basisuntersuchung ( $t_0$ ), als auch sechs und zwölf Wochen nach Interventionsbeginn ( $t_6$  und  $t_{12}$ ) eine Blutentnahme. Diese erfolgte bei den Probanden im Nüchternzustand, wobei sie mindestens acht Stunden vor der Entnahme keine Nahrung oder kalorienhaltigen Getränke aufgenommen hatten. Insgesamt wurden ca. 40 ml venöses Vollblut entnommen und im Anschluss im institutseigenen Labor präanalytisch aufbereitet.

### **3.2 Proben**

Für die Gewinnung des Serums wurde das Vollblut in den Serumröhrchen zur Gerinnung für 20 Minuten im Kühlschrank gelagert. Im Anschluss wurden die Proben für zehn Minuten bei 4000 Umdrehungen zentrifugiert. Das entstandene Serum, welches sich als wässrige Phase über den festen Blutbestandteilen absetzt, wurde abgesert und in Probengefäße überführt. Die Bestimmung der Parameter des Lipidprofils sowie Glucosestoffwechsels erfolgte im Labor der Klinischen Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover. Ein anderer Teil wurde als Rückstellproben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die Analyse zur Bestimmung der Apo B-48-Konzentrationen wurden in diesen Serumblutproben (Rückstellproben) der Zeitpunkte  $t_0$  ( $n=120$ ) und  $t_{12}$  ( $n=99$ ) durchgeführt.

### **3.2 Enzym-gekoppelter Immunosorbenstest**

Ein ELISA (engl.: Enzyme-linked Immunosorbent Assay) dient als immunochemisches und als enzymatisches, sehr sensitives Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von Proteinen, welche in einer geringen Konzentration in der Probe vorliegen. Sie können für biologische Flüssigkeiten wie Blut, Serum, Urin sowie Lebensmittel genutzt werden. Die Grundlage für ein solches Verfahren ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, d.h. die Bindungsfähigkeit einer zu bestimmenden Substanz (Antigen) an spezifische Antikörper [Clark und Pazdernik, 2009 S. 182].

### 3.2.1 Prinzip des Apo B-48 ELISAs

Die Messung der Apo B-48-Konzentrationen erfolgte mit dem von Shibayagi spezifizierten ELISA-Kit zur Bestimmung von humanen Apo B-48 im Blut oder Serum (Xceltis GmbH, Mannheim). Dieses ist nach dem Sandwichprinzip aufgebaut.

Die im Kit vorhandene 96-Well-Mikrotiterplatte ist bereits mit einem für Apo B-48 spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet. Nach Zugabe der Standard- und Probenlösungen bindet das Apo B-48 an den immobilisierten Antikörper, es folgt die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes. Ungebundene Antikörper werden durch Waschen der Platte entfernt. Anschließend wird ein Biotin-konjugierter zweiter monoklonaler Apo B-48-Antikörper zugegeben, welcher sich am Immunkomplex anlagert. Dabei bildet sich das so genannte „Sandwich“, bei dem das Antigen von zwei Antikörpern umgeben ist (Abbildung 4). Der nächste Waschschriff entfernt die überschüssigen Reagenzlösungen. Im Anschluss wird das Merrettichperoxidase-konjugierte Streptavidin hinzugefügt. Das Streptavidin hat am Avidin noch freie Bindungsstellen für Biotin und bindet somit am Biotin des Sekundärantikörpers. Dieses Enzym ist notwendig, um die chromogene Substanz farblich umzusetzen. Es ergibt sich eine Färbung proportional zu dem anfangs gebundenen Apo B-48. Mit Hilfe einer Stopplösung wird die Reaktion abgebrochen. Über die Messung der Lichtabsorption kann mittels einer Standardreihe die Menge des enthaltenden Apo B-48 quantifiziert werden [Matissek et al., 2010, S. 429].

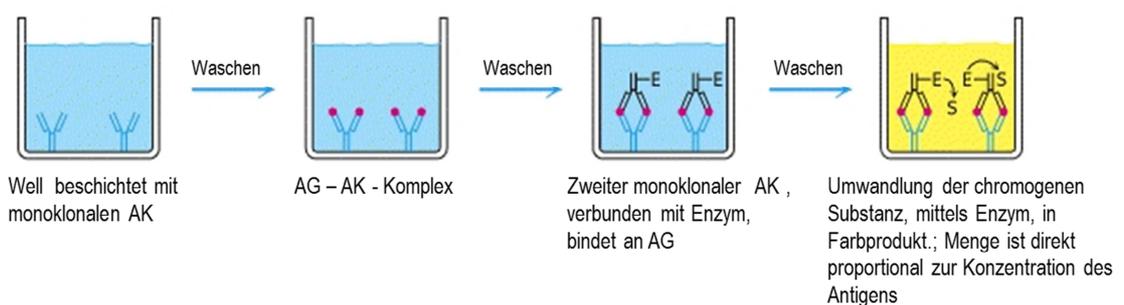


Abbildung 4: Prinzip des Sandwich ELISAs

[modifiziert nach Berg et al., 2002]

### 3.2.2 Durchführung des Apo B-48 ELISAs

Zur Bestimmung der insgesamt 219 Proben der Untersuchungszeitpunkte  $t_0$  ( $n = 120$ ) und  $t_{12}$  ( $n = 99$ ) wurden sieben ELISA-Kits verwendet. Vor der allgemeinen Durchführung jedes ELISAs sind einige Vorbereitungen notwendig. Zunächst erfolgte ca. zwei Stunden vor der Bearbeitung die Entnahme der Testreagenzien und Proben aus dem Kühlschrank, damit sich diese auf Raumtemperatur erwärmen. Die 1000 ml Waschpuffer entstanden durch die Verdünnung von 100 ml Wasch-Puffer-Konzentrat mit 900 ml destilliertem Wasser. Um die Standardlösung von 128 ng/Fläschchen herzustellen, wurden in den gefriergetrockneten Human Apo B-48-Standard 400  $\mu$ l des Puffers zugegeben und durch leichtes Schütteln für 15 Minuten gelöst. In acht 1,5ml Eppendorfgefäße wurden jeweils 150  $\mu$ l der Pufferlösung vorgelegt. Im nächsten Schritt wurden 150  $\mu$ l der höchsten Standardlösung in das erste Eppendorfgefäß überführt. Der Vorgang des Pipettierens erfolgte, indem man die Pipettenspitze an die Oberfläche der vorgelegten Pufferlösung hält. Der Standard wurde durch drücken bis zum ersten Druckpunkt herausgelassen und nochmals aufgezogen. Dieser Vorgang wurde zwei bis drei Mal wiederholt. Vor dem Herausziehen der Pipettenspitze wurden beide Lösungen komplett entfernt, indem die Pipette bis zum zweiten Stopp gedrückt wurde. Mit einem Vortexer, eingestellt auf 200 Umdrehungen, wurde der Standard dreimal für zehn Sekunden gemischt. Anschließend wurden aus dem ersten Gefäß wiederum 150  $\mu$ l in das Nächste gegeben. Dies wurde so lange weitergeführt, bis eine Standardreihe von 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, und 0 ng/ml entstand (Abbildung 5).

Standard Nr.	7	6	5	4	3	2	1	0
Konz. [ng/ml]	160	80	40	20	10	5,0	2,5	0
Std. Lsg. [ $\mu$ l]	150	150	150	150	150	150	150	0
Puffer Lsg. [ $\mu$ l]	150	150	150	150	150	150	150	150

**Abbildung 5: Erstellung einer Standardreihe**

*Konz.: Konzentration; Std. Lsg.: Standardlösung*

Bevor die Proben auf die Mikrotiterplatte überführt werden konnten, war eine Verdünnung mit der Pufferlösung erforderlich. Für eine 1:100 Verdünnung wurden 495  $\mu$ l Puffer mit 5  $\mu$ l der Probe vermischt. Die 495  $\mu$ l Pufferlösung wurde in die Gefäße mittels einer Multistep Eppendorf Pipette vorgelegt. Dann folgte mit einer 5 – 10  $\mu$ l Eppendorf Pipette die Probe. Mittels Vortexer wurden die beiden Lösungen vermischt.

Neben den Standard- und Probenlösungen wurde bei jeder ELISA Durchführung auch ein interner Standard analysiert, um Präzisionskontrollen zu gewährleisten. Von dieser internen Standardlösung wurde, wie bei den Proben, eine 1:100 Verdünnung hergestellt.

Die 96 Well Mikrotiterplatte ist bereits durch den Hersteller mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen humanes Apo B-48 beschichtet. Der erste Schritt der Testdurchführung startete, indem die Mikrotiterplatte mit einem Waschpuffer mittels Sprühflasche gewaschen und anschließend durch Ausklopfen auf einem Papiertuch getrocknet wurde. In Abbildung 6 ist das Pipettierschema aufgezeigt mit dem die Mikrotiterplatten bestückt wurden. In die Vertiefungen überführte man jeweils in Doppelbestimmung 50 µl der Standard- und Serumprobenlösungen und schüttelte die Platte dreimal auf einem Mixer für Mikrotiterplatten bei 600 - 1200 Umdrehungen für zehn Sekunden. Um eventuelle Einflüsse durch die Dauer des Auftragens und daraus resultierende unterschiedliche Inkubationszeiten zu vermeiden, wurden die Proben der Zeitpunkte  $t_0$  und  $t_{12}$  auf ähnliche Wellpositionen innerhalb der Platten aufgetragen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST 7 160 ng/ml	ST 7 160 ng/ml	Interner Standard	Interner Standard	Probe 6	Probe 6	Probe 14	Probe 14	Probe 22	Probe 22	Probe 30	Probe 30
B	ST 6 80 ng/ml	ST 6 80 ng/ml	Interner Standard	Interner Standard	Probe 7	Probe 7	Probe 15	Probe 15	Probe 23	Probe 23	Probe 31	Probe 31
C	ST 5 40 ng/ml	ST 5 40 ng/ml	Interner Standard	Interner Standard	Probe 8	Probe 8	Probe 16	Probe 16	Probe 24	Probe 24	Probe 32	Probe 32
D	ST 4 20 ng/ml	ST 4 20 ng/ml	Probe 1	Probe 1	Probe 9	Probe 9	Probe 17	Probe 17	Probe 25	Probe 25	Probe 33	Probe 33
E	ST 3 10 ng/ml	ST 3 10 ng/ml	Probe 2	Probe 2	Probe 10	Probe 10	Probe 18	Probe 18	Probe 26	Probe 26	Probe 34	Probe 34
F	ST 2 5,0 ng/ml	ST 2 5,0 ng/ml	Probe 3	Probe 3	Probe 11	Probe 11	Probe 19	Probe 19	Probe 27	Probe 27	Probe 35	Probe 35
G	ST 1 2,5 ng/ml	ST 1 2,5 ng/ml	Probe 4	Probe 4	Probe 12	Probe 12	Probe 20	Probe 20	Probe 28	Probe 28	Probe 36	Probe 36
H	ST 0 0 ng/ml LW	ST 0 0 ng/ml LW	Probe 5	Probe 5	Probe 13	Probe 13	Probe 21	Probe 21	Probe 29	Probe 29	Probe 37	Probe 37

**Abbildung 6: Pipettierschema auf einer 96 Well Mikrotiterplatte**

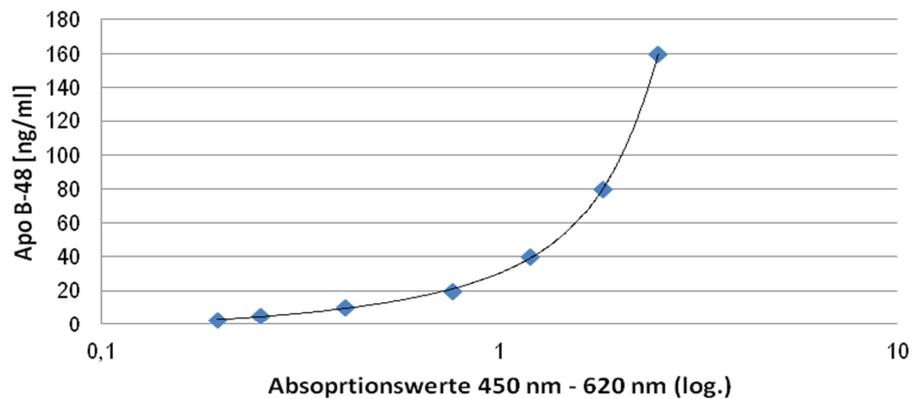
*ST: Standard*

Die Inkubationszeit von einer Stunde startete nach dem Auftragen der letzten Probe ins Well und dient zur Bindung des in den Proben vorhandenen Apo B-48 am immobilisierten Antikörper. Im Anschluss an die Inkubationszeit erfolgte der zweite Waschgang. Mittels einer Eppendorf Multipipette wurden vorsichtig 200 µl des Waschpuffers in die Wells gefüllt, um eine Verunreinigung innerhalb des Wells zu vermeiden. Danach wurde der Waschgang mit der Sprühflasche fortgesetzt und dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschgang erfolgte das Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf Papiertüchern. Während der Inkubationszeit wurde der konzentrierte Biotin-konjugierte Anti-Apo B-48 Antikörper mit der Pufferlösung verdünnt. Entsprechend einer 1:100 Verdünnung vermischte man 5940 µl Puffer mit 60 µl der konzentrierten Lösung. Als nächstes wurden 50 µl dieser verdünnten Biotin-konjugierten Anti-Apo B-48 Antikörper in die Wells pipettiert, die Platte geschüttelt, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und erneut viermal mit Waschpuffer gewaschen. Die Inkubationszeit diente ebenfalls zur Herstellung der 1:100 Verdünnung, diesmal für das konzentrierte Merretticheroxidase-konjugierte Straptavidin, welches im nächsten Schritt verdünnt in die Wells hinzugegeben wurde. Nach dem Schütteln der Platte erfolgte eine weitere Inkubationszeit von 30 Minuten, welche wieder mit dem Waschgang abgeschlossen wurde. Anschließend überführte man 50 µl des chromogenen Substrats in die Wells. Innerhalb der Inkubationszeit von 20 Minuten zeigte sich eine Blaufärbung der Lösung, die sich proportional zu der gebundenen Apo B-48 Menge verhält. Durch die Zugabe von 50 µl einer 1-molaren Schwefelsäure, welche als Stopplösung fungiert, wurde die ablaufende Enzymreaktion unterbrochen. Dies zeigte sich anhand eines Farbumschlags von blau auf gelb. Innerhalb der nächsten 30 Minuten wurde nun die optische Dichte bei 450 nm und einer Referenz-Wellenlänge von 620 nm von jedem Well bestimmt. Zur Verfügung stand dafür ein Mikroplatten-Leser der Firma Tecan. Vor jeder erneuten Messung wurde speziell für die ELISA Platte eine Methode definiert. Die Durchführungen des ELISAs erfolgte nach Herstellerangabe.

### **3.2.3 Quantitative Auswertung**

Die Bestimmung der Apo B-48 Konzentrationen erfolgte mittels einer Standardkurve. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden als Logarithmus auf der X-Achse gegen die Konzentrationen des Standards auf der Y-Achse aufgetragen. Mit Microsoft Office Excel 2007 wurde anhand der Punkte eine sigmoide Regressionskurve der 3. Ordnung erstellt (Abbildung 7). Über die Regressionsgleichung wurden die Konzentrationen der

Proben berechnet. Hierbei wurden die zuvor verdünnten Proben mit ihrem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert.



**Abbildung 7: Standardkurve von Apo B-48 eines ELISAs**

### 3.3 Präzisionskontrollen

Diese Kontrollen werden zur internen Überprüfung durchgeführt, da das ELISA-Kit keine Kontrollstandards zur Verfügung stellt. Es wird sehr selten derselbe Wert innerhalb einer Probe bestimmt, daher dienen die Kenngrößen wie die Intra-assay Varianz und die Inter-assay Varianz als wichtige Messmethoden für die Präzision einer Methode. Beide geben die analytische Streuung an, welche als Variationskoeffizient (VK %) ausgedrückt wird [Halwachs-Baumann 2011, S. 4]. Diese Messmethoden sind im Folgenden aufgeführt.

#### Intra-assay Varianz

Von einer intern hergestellten Standardprobe wurde sechsmal hintereinander die Apo B-48-Konzentration bestimmt. Aus den Ergebnissen wurden die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten ermittelt. Der berechnete Variationskoeffizient sollte höchstens 10 % betragen. Mögliche Ursachen für eine Abweichung sind beispielsweise fehlerhafte Verdünnungen oder falsches Pipettieren.

#### Inter-assay Varianz

Die Inter-assay Varianz hingegen gibt die Abweichungen an, die durch die Apo B-48 Konzentrationen aus derselben internen Standardprobe an mehreren Tagen bestimmt wurden. Dazu erfolgte die Messung des internen Standards auf fünf verschiedenen ELISA Platten in jeweils vier hintereinander aufgetragenen Proben.

#### Probenauftrag zu Beginn und am Ende der Platte

Ebenfalls sollte getestet werden, ob es Unterschiede in den Konzentrationswerten zum Zeitpunkt des Auftragens der Probe gibt. Es sollte somit untersucht werden, ob die Dauer des Auftragens einen Einfluss hat. Dazu wurde innerhalb einer Platte in drei Wells zu Beginn und drei Wells am Ende des Pippetiervorgangs, die interne Standardprobe überführt. Auch hier wurden Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet.

### **3.4 Klassifizierung des Studienkollektivs nach Kriterien des metabolischen Syndroms**

Zur Abschätzung des kardiovaskulären Risiko wird das Studienkollektiv anhand der Kriterien des metabolischen Syndroms entsprechend der Definition des ATP III (National Cholesterol Education Programs's Adult Treatment Panel III) eingeteilt (Tabelle 2). An erster Stelle steht dabei das abdominelle Fettgewebe, welches durch den Taillenumfang messbar ist. Weitere Kriterien zur Diagnose sind ein erhöhter Blutdruck, erhöhte TG, vermindertes HDL-C und erhöhte Nüchternglucose. Zur Diagnose eines metabolischen Syndroms müssen drei der genannten Kriterien in Tabelle 2 erfüllt sein. [Alberti et al., 2009; Grundy et al., 2001]. Innerhalb dieser Einteilung wird die Konzentration des Apolipoproteins B-48 untersucht.

**Tabelle 2: Kriterien für die Diagnose des metabolischen Syndroms nach Alberti et al., 2009**

Kriterien	Diagnosewerte
erhöhter Taillenumfang	≥ 102 cm bei Männern; ≥ 88 cm bei Frauen
erhöhter Blutdruck	≥ 130 mm Hg systolisch und/oder 85 mm Hg diastolisch oder Einnahme von antihypertensiven Medikamenten
erhöhte Triglyceride	≥ 150 mg/dl oder medikamentöse Behandlung wegen erhöhter Triglyceride
vermindertes HDL	< 40 mg/dl bei Männern; < 50 mg/dl bei Frauen
erhöhte Nüchtern-glucose	≥ 100 mg/dl oder medikamentöse Behandlung wegen erhöhter Plasmaglutose

### 3.5 Klassifizierung des Studienkollektivs anhand kardiovaskulärer Risikofaktoren zur Beschreibung eines Risikoprofils

Auf Basis der vorliegenden anthropometrischen Daten sowie Parameter des Lipidprofils und Glucosestoffwechsels wurde das Studienkollektiv anhand von Grenzwerten in Gruppen eingeteilt, um so ein mögliches Risikoprofil erstellen zu können. Die ausgewählten Variablen sind von großem Interesse, da sie im Zusammenhang mit der Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen stehen [Assmann et al., 2002]. Es handelt sich um etablierte Risikofaktoren, die entsprechend der Erscheinungsform Dyslipidämie, Insulinresistenz, Bluthochdruck und Adipositas einzeln betrachtet werden. Dabei wird anhand des Grenzwerts entschieden, ob das Risiko als akzeptabel, grenzwertig oder hoch einzustufen ist. Die in der Tabelle 3 aufgelisteten Risikofaktoren mit den dazugehörigen Definitionen sind teilweise anhand der Kriterien zur Klassifikation des metabolischen Syndroms abgeleitet. Restliche Definitionen zur Klassifikation stammen von nationalen und internationalen Public Health Organisationen.

Die bereits beim metabolischen Syndrom erwähnten Lipidparameter werden zusätzlich noch um das Gesamt-C sowie LDL-C ergänzt. Die Einteilung der Grenzwerte beider Parameter erfolgt ebenfalls anhand der ATP III Klassifikation [Grundy et al., 2001]. Der aufgelistete HOMA-[IR]-Index (Homeostasis Model Assessment [of Insulin Resistance])

kann zur klinischen Abschätzung der Insulinresistenz bei Nichtdiabetikern oder im frühen Stadium von Diabetes erfolgen. Für die Berechnung werden Nüchterninsulin- und glucosewerte herangezogen [Stern et al., 2005]. Nachfolgende Formel steht dafür zur Verfügung:

$$\text{HOMA-Index} = \text{Insulin (nüchtern, } \mu\text{U/ml)} \times \text{Blutzucker (nüchtern, mg/dl)} / 405$$

Verglichen mit dem Gold-Standard für die Messung der Insulinresistenz, dem sehr aufwändigen und invasiven euglykämischen-hyperinsulinämischen Clamp-Test, entspricht der HOMA-Index einer evaluierten Schätzung [Matthews et al., 1985]. In Untersuchungen zeigte sich jedoch bei erwachsenen Patienten ein Korrelationskoeffizient von 0,88 ( $p < 0,0001$ ) zwischen der geschätzten Insulinresistenz ermittelt durch HOMA und dem euglykämischen-hyperinsulinämischen Clamp-Test [Matthews et al., 1985; Wallace et al., 2004]. Der berechnete HOMA-Index wird so zusammen mit dem Parameter Nüchtern-glucose zur Abschätzung einer möglichen Insulinresistenz herangezogen.

Auf der Suche nach der Existenz eines möglichen Risikomarkers werden die Beziehungen zwischen den eingeteilten Risikofaktoren und Apo B-48 untersucht.

**Tabelle 3: Klassifikation von Risikofaktoren anhand definierter Grenzwerte**

Risikofaktoren		Grenzwerte	
<b>Adipositas</b>	Taillenumfang	Akzeptabel	männlich: < 102 cm; weiblich: < 88 cm
		Grenzwertig / hoch	männlich: > 102 cm; weiblich: > 88 cm
<b>Bluthochdruck</b>	SBP	Akzeptabel	< 130 mmHg
		Grenzwertig / hoch	> 130 mmHg
	DBP	Akzeptabel	< 85 mmHg
		Grenzwertig / hoch	> 85 mmHg
<b>Dyslipidämie</b>	TG	Akzeptabel	< 150 mg/dl
		Grenzwertig / hoch	≥ 150 mg/dl
	Gesamt -C	Akzeptabel	< 200 mg/dl
		Grenzwertig / hoch	> 200 mg/dl
	LDL-C	Akzeptabel	< 130 mg/dl
	Grenzwertig / hoch	≥ 130 mg/dl	
<b>Insulinresistenz</b>	HOMA-[IR]-Index	Akzeptabel	männlich: >40 mg/dl; weiblich: > 50mg/dl
		Grenzwertig / hoch	männlich: < 40 mg/dl; weiblich: < 50mg/dl
	nüchtern Glukose	Keine IR	< 2,5
		IR	> 2,5
		NGT	< 100 mg/dl
	IGT	> 100 mg/dl	

*SBP: systolischer Blutdruck; DBP: diastolischer Blutdruck; TG: Triglyceride; LDL-C: Low density lipoprotein, HDL-C: high density lipoprotein; HOMA-Index: Homeostasis Model Assessment; IR: Insulinresistenz; NGT: normal glucose tolerance IGT: Impaired glucose tolerance*

### 3.6 Definition von Risikogruppen zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos

Basierend auf den in Tabelle 3 aufgelisteten Risikofaktoren, die oberhalb des grenzwertigen bis hohen Risikobereichs liegen, erfolgte eine Einteilung der Studienteilnehmer in Gruppen, die entweder einem geringen, moderaten oder hohen kardiovaskulären Risiko entsprechen. Die Kriterien des systolischen und diastolischen Blutdrucks werden wie beim metabolischen Syndrom als ein Risikofaktor zusammengefasst. Letztlich erfolgt so für insgesamt acht Risikofaktoren die Einteilung. Dabei werden null bis zwei Risikofaktoren, die oberhalb des grenzwertigen bis hohen Bereichs liegen als geringes Risiko, drei bis vier als moderates und fünf bis acht als hohes Risiko eingeschätzt. Mittels einer logistischen Regression soll untersucht werden, welchen Einfluss die Apo B-48 Konzentrationen haben, die hohe Risikogruppe zu erreichen.

### 3.7 Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows vorgenommen (Statistical Package for Social Sciences, Version 20.0). Zur Allgemeinen Beschreibung der Daten diente die explorative Datenanalyse. Bei dieser wurde beobachtet, wie Parameter des Lipidprofils bzw. Glucosestoffwechsels und auch die Apo B-48 Konzentrationen innerhalb der Gesamtgruppe, vor allem zum Zeitpunkt der Basisuntersuchung, verteilt sind. Die Auswertung erfolgte per Protokoll, so dass bei  $t_{12}$  nur die Daten von Probanden ausgewertet wurden, die alle im Protokoll vorgegebenen Voraussetzungen erfüllt haben. Die Ergebnisse sind anhand des Mittelwerts  $\pm$  Standardabweichungen angegeben. Der Test auf Normalverteilung erfolgte mittels des Kolmogorov-Smirnov Tests. Unterschiede zwischen Männern und Frauen wurden mittels T-Tests für unabhängige Stichproben erfasst. Unterschiede zwischen der Placebogruppe (F+P) und der Interventionsgruppe (F+LA) wurden mittels Mann-Whitney U Test berechnet. Mit dem Wilcoxon Test wurden die Änderungen der Konzentrationswerte im Vergleich zum Untersuchungsbeginn erhoben. Die Untersuchungen der Korrelationen mit anderen Parametern aus dem Lipidprofil oder Glucosestoffwechsel erfolgten entweder nach Pearson (normalverteilte Daten) oder nach Spearman (nicht-normalverteilte Daten). Eine multivariate Regressionsanalyse dient zur Überprüfung, ob Parameter aus der Korrelationsmatrix als Prädiktoren für die Apo B-48-Konzentration dienen. Als Signifikanzniveau wurde immer ein p-Wert von 0,05 festgelegt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Präzisionskontrollen

Für die Bestimmung der Präzision innerhalb einer Platte wurde aus einem internen Standard sechsmal direkt hintereinander die Apo B-48 Konzentrationen gemessen. Des Weiteren wurde die Inter-assay Varianz durch Messung der Apo B-48-Konzentration einer internen Probe an mehreren Tagen auf fünf verschiedenen ELISA Platten bestimmt. Die gemessenen Werte der internen Standardprobe zu Beginn und am Ende des Pipettiervorgangs dienen der Überprüfung, ob die Dauer des Auftragens einen Einfluss auf die Konzentrationen hatte. In diesem Fall betrug das Auftragen der Proben auf die Platte insgesamt ca. 45 – 50 Minuten. Dies entsprach in etwa der Zeit bei den sechs weiteren ELISA Platten. Die enthaltenen Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten aller Präzisionskontrollen sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Es ist zu sehen, dass beim Auftrag der Proben zum Beginn eine deutlich höhere Konzentration im Vergleich zu den am Ende aufgetragenen Proben besteht.

**Tabelle 4: Mittelwert, Standardabweichungen und Variationskoeffizient der Präzisionskontrollen**

	Apo B-48 [ug/ml]	Standard- abweichung (SD)	Variationskoeffizient (VK) [%]
<b>Intra-assay</b>	3,8	1,7	4,5
<b>Inter-assay</b>	3,5	3,5	9,9
<b>Probenauftrag</b> Beginn	3,9	0,6	1,5
Ende	2,7	1,0	3,7

### 4.2 Charakterisierung des Studienkollektivs

Im Rahmen der durchgeführten Gewichtsreduktionsstudie wurden zum Zeitpunkt der Basisuntersuchung sowohl die anthropometrischen als auch biochemischen Parameter von allen randomisierten Studienteilnehmern ermittelt.

#### 4.2.1 Anthropometrische Daten und Blutdruck

Das gesamte Studienkollektiv (n = 120) umfasst 59 Männer und 61 Frauen. In der Tabelle 5 sind die erfassten Daten des Blutdrucks und die anthropometrischen Daten zusammengefasst. Der mittlere BMI liegt in beiden Kollektiven über 30 kg/m<sup>2</sup> und stellt somit nach der Definition der WHO bei Männern und Frauen ein Adipositas Grad 1 dar. Der BMI unterscheidet sich im Gegensatz zum Gewicht nicht signifikant zwischen Männern und Frauen (p = 0,193). Die Probanden wiesen eine ausgeprägte abdominale Körperfettverteilung auf (Taillenumfang > 102 cm bei Männern und > 88 cm bei Frauen), die mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergeht. In Bezug auf den Taillen- und Hüftumfang unterscheiden sich die beiden Gruppen (Männer und Frauen) signifikant. Laut WHO-Kriterien gilt ein erhöhter Blutdruckwert von > 140 mmHg systolisch und > 90 mmHg diastolisch als grenzwertig und kann als manifeste Hypertonie angesehen werden [Whitworth, 2003]. Der Blutdruck des Studienkollektivs beträgt 138,5 mmHg zu 93,5 mmHg und liegt demnach an der Grenze zur Klassifizierung einer Hypertonie Grad I.

**Tabelle 5: Anthropometrische Daten und Daten des Blutdrucks zum Zeitpunkt der Basisuntersuchung (Mittelwert ± SD)**

	Gesamtkollektiv	Männer	Frauen	p <sup>##</sup>
<b>Probandenanzahl [n]</b>	120	59	61	
<b>Gewicht [kg]</b>	96,8 ± 11,4	104,4 ± 9,7	89,5 ± 7,4	<b>0,000</b>
<b>BMI [kg/m<sup>2</sup>]</b>	31,8 ± 1,9	31,1 ± 1,9	32,0 ± 2,1	0,193
<b>Taillenumfang [cm]</b>	106,1 ± 8,1	110,3 ± 7,1	102,1 ± 6,7	<b>0,000</b>
<b>Hüftumfang [cm]</b>	114,7 ± 5,1	112,9 ± 4,7	116,3 ± 4,9	<b>0,000</b>
<b>T-H-V</b>	0,93 ± 0,07	0,98 ± 0,05	0,88 ± 0,06	<b>0,000</b>
<b>SBP [mmHg]</b>	138,5 ± 15,1	139,4 ± 13,4	137,6 ±	0,512
<b>DBP [mmHg]</b>	93,5 ± 11,2	94,7 ± 10,8	16,6 92,4 ± 11,5	0,251

<sup>##</sup>T-Test bei unabhängige Stichproben; BMI: Body Mass Index; T-H-V: Taille-Hüft-Verhältnis; SBP: systolischer Blutdruck; DBP: diastolischer Blutdruck

#### 4.2.2 Biochemische Daten

Die unten aufgeführte Tabelle 6 beinhaltet die biochemischen Parameter der Studienteilnehmer zum Zeitpunkt der Basisuntersuchung. Bei dieser Studienpopulation konnte kein signifikanter Unterschied innerhalb der Männer und Frauen im Hinblick auf das Gesamt-C, LDL-C, Insulin und dem HOMA-Index festgestellt werden. Die TG, HDL-C, Glukose und das Akute-Phase-Protein C-reaktives Protein (hs CRP) zeigen zwischen den beiden Gruppen (Männer und Frauen) einen signifikanten Unterschieden auf. Letzteres zeigt einen signifikanten Unterschied durch höhere Werte der Frauen.

**Tabelle 6: Biochemische Daten zum Zeitpunkt der Basisuntersuchung (Mittelwert  $\pm$  SD)**

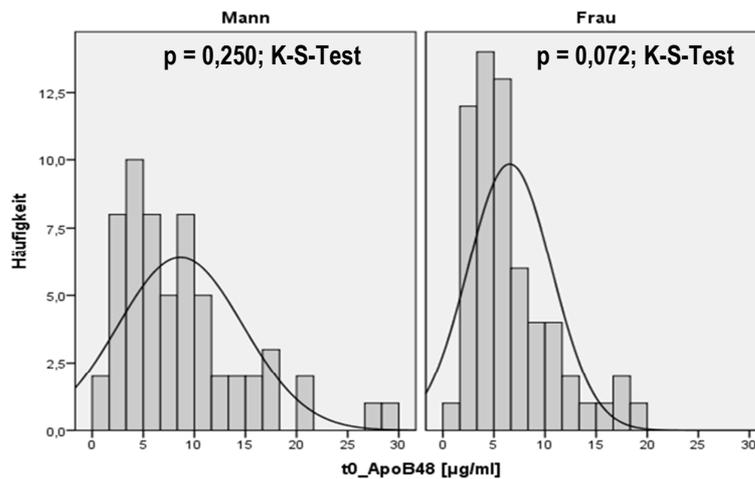
	Gesamtkollektiv	Männer	Frauen	p*, ##
<b>Probandenanzahl [n]</b>	120	59	61	
<b>TG [mg/dl]</b>	174,3 $\pm$ 117,2	207,8 $\pm$ 142,1	141,9 $\pm$ 74,6	<b><math>\leq 0,001^*</math></b>
<b>Gesamt-C [mg/dl]</b>	240,8 $\pm$ 43,9	242,8 $\pm$ 45,9	238,8 $\pm$ 42,3	0,627##
<b>LDL-C [mg/dl]</b>	153,0 $\pm$ 36,7	154,5 $\pm$ 37,3	151,7 $\pm$ 36,4	0,677##
<b>HDL-C [mg/dl]</b>	54,5 $\pm$ 12,0	49,9 $\pm$ 10,9	59,1 $\pm$ 11,5	<b><math>\leq 0,001^{##}</math></b>
<b>hsCRP [mg/dl]</b>	3,1 $\pm$ 2,75	2,5 $\pm$ 5,6	3,7 $\pm$ 5,3	<b>0,033*</b>
<b>Glukose [mg/dl]</b>	95,9 $\pm$ 12,4	98,4 $\pm$ 13,1	92,6 $\pm$ 10,4	<b>0,003##</b>
<b>Insulin [<math>\mu</math>E/ml]</b>	14,1 $\pm$ 6,9	15,1 $\pm$ 8,4	13,1 $\pm$ 5,1	0,337*
<b>HOMA-Index</b>	3,4 $\pm$ 2,0	3,8 $\pm$ 2,5	3,1 $\pm$ 1,3	0,135*

\*Mann-Whitney U Test; ## T-Test bei unabhängigen Stichproben; hsCRP: hoch sensitives C-reaktives Protein; HOMA-Index: Homeostasis Model Assessment

#### 4.3 Apolipoprotein B-48-Konzentration des Studienkollektivs

Der Kolmogorov-Smirnov Test (K-S-Test) zeigte, dass sich die Daten des Gesamtkollektivs signifikant von einer Normalverteilung unterscheiden ( $p = 0,04$ ). Somit erfolgen weitere Berechnungen der Apo B-48-Konzentrationen des Gesamtkollektivs mittels SPSS unter Berücksichtigung der nichtparametrischen Tests.

Die Verteilung der Apo B-48-Konzentrationen innerhalb des Männer- und Frauenkollektivs ist unten dargestellt (Abbildung 8). Im Gegensatz zum Gesamtkollektiv unterscheiden sich die Konzentrationen des Apo B-48 bei Männern und Frauen nicht signifikant von einer Normalverteilung. Demnach werden weitere Berechnungen der Apo B-48-Konzentration bezogen auf Männer und Frauen mittels parametrischer T-Tests durchgeführt.



**Abbildung 8: Verteilung der Apolipoprotein B-48 Konzentration der Männer und Frauen**

Bezogen auf die mittleren Apo B-48-Konzentrationen (Tabelle 7) wurde bei dieser Studienpopulation ein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen gefunden ( $p = 0,029$ ).

**Tabelle 7: Apolipoprotein B-48 Konzentration des Studienkollektivs (Mittelwert  $\pm$  SD)**

	Gesamtkollektiv	Männer	Frauen	$p^{*, \#\#}$
<b>Probandenanzahl [n]</b>	120	59	61	
<b>Apo B-48 [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>	$7,6 \pm 5,3$	$8,6 \pm 6,1$	$6,5 \pm 4,1$	<b><math>0,029^{\#\#}</math></b>

*\*Mann-Whitney U Test;  $\#\#$  T-Test bei unabhängigen Stichproben*

#### **4.4 Korrelationen anthropometrischer und biochemischer Parameter mit Apolipoprotein B-48**

Im Gesamtkollektiv wurden Korrelationen zwischen Apo B-48 und einigen der erhobenen anthropometrischen als auch biochemischen Daten gefunden (Tabelle 8). Es ist eine positiv signifikante Korrelationen hinsichtlich der Parametern des Lipidprofils zu erkennen, wie TG, Gesamt-C und LDL-C ( $p < 0,001$ ; Spearman-Korrelation).

Bei erhöhten Konzentrationen des Apo B-48 zeigen sich ebenso erhöhte TG-, Gesamt-C- und LDL-C-Konzentrationen. Hingegen wurden negative Zusammenhänge zwischen Apo B-48 und dem Hüftumfang ( $p < 0,01$ ) und auch dem Entzündungsparameter CRP ( $p < 0,05$ ) festgestellt.

Die Tabelle 9 dient zur Darstellung der Pearson Korrelationen von Apo B-48 mit den jeweiligen Parametern in Abhängigkeit des Geschlechts. Vor allem bei Männern ist ein höherer Pearson-Korrelationskoeffizient zwischen Apo B-48 und den TG zu erkennen ( $r = 0,69$ ;  $p < 0,001$ ). Die Apo B-48-Konzentrationen in der Gruppe der Frauen zeigen zusätzlich positive Korrelationen mit Insulin ( $r = 0,30$ ;  $p = 0,018$ ) und dem HOMA-Index ( $r = 0,291$ ;  $p = 0,023$ ). Bei hohen Konzentrationen des Apo B-48 sind demnach ebenfalls die Konzentrationen des Insulins sowie die Werte des HOMA-Index erhöht. Die Beziehung zwischen Apo B-48 und den Parametern des Lipidprofils ist bei geschlechtsspezifischer Betrachtung in Abbildung 9 dargestellt.

Tabelle 8: Spearman Korrelationsmatrix von Apo B-48 mit anthropometrischen und biochemischen Daten (Gesamtkollektiv)

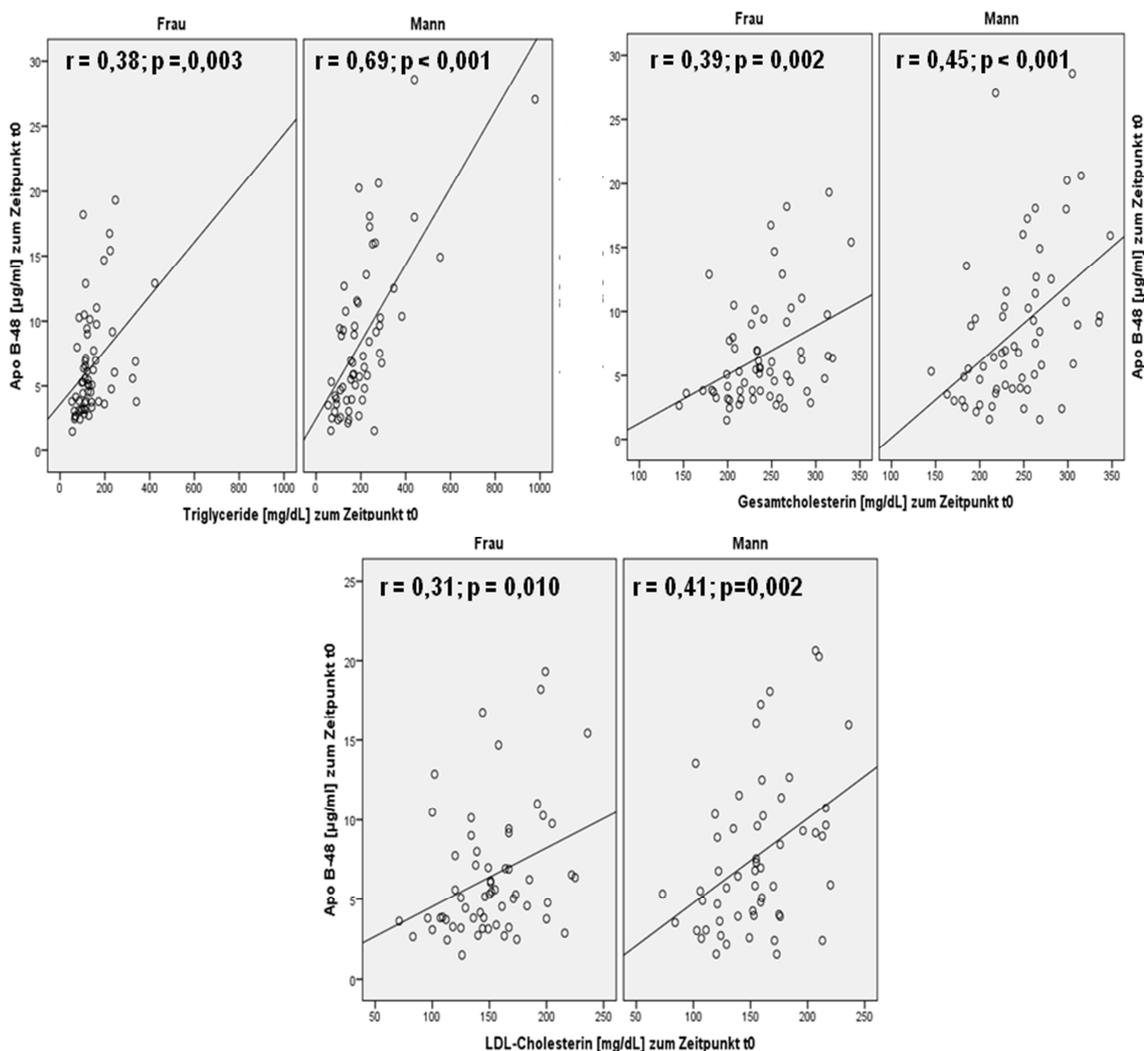
Parameter	Gewicht [kg]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	Taille [cm]	Hüfte [cm]	T-H-V	SBP [mmHg]	DBP [mmHg]	TG [mg/dl]	Gesamt-C [mg/dl]	LDL-C [mg/dl]	HDL-C [mg/dl]	CRP [mg/dl]	Glukose [mg/dl]	Insulin [uE/ml]	HOMA-Index
ApoB48 [µg/ml]	-,024	,029	,09	-,303**	,230*	,029	,011	,562**	,430**	,347**	-,155	-,227*	,058	,088	,104

\*\*p < 0,01; \* p < 0,05; BMI: Body-Mass-Index; TG: Triglyceride; SBP: systolischer Blutdruck; DBP: diastolischer Blutdruck; T-H-V: Taillen-Hüft-Verhältnis; LDL-C: Low-density-lipoprotein, HDL-C: high-density-lipoprotein; CRP: c-reaktives Protein; HOMA-Index: Homeostasis Model Assessment

Tabelle 9: Pearson Korrelationsmatrix von Apo B-48 mit anthropometrischen und biochemischen Daten (Männer und Frauen)

Parameter	Gewicht [kg]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	Taille [cm]	Hüfte [cm]	T-H-V	SBP [mmHg]	DBP [mmHg]	TG [mg/dl]	Gesamt-C [mg/dl]	LDL-C [mg/dl]	HDL-C [mg/dl]	CRP [mg/dl]	Glukose [mg/dl]	Insulin [uE/ml]	HOMA-Index
ApoB48 Mann [µg/ml]	-,200	,097	-,108	-,380**	,184	,029	,075	,688**	,447**	,412**	-,197	-,182	-,051	-,089	-,056
ApoB48 Frau [µg/ml]	-,184	,035	,031	-,220	,173	,077	-,099	,377**	,390**	,313*	-,044	-,291	,108	,302*	,291*

\*\*p < 0,01; \* p < 0,05; BMI: Body-Mass-Index; TG: Triglyceride; SBP: systolischer Blutdruck; DBP: diastolischer Blutdruck; T-H-V: Taillen-Hüft-Verhältnis; LDL-C: Low-density-lipoprotein, HDL-C: high-density-lipoprotein; CRP: c-reaktives Protein; HOMA-Index: Homeostasis Model Assessment

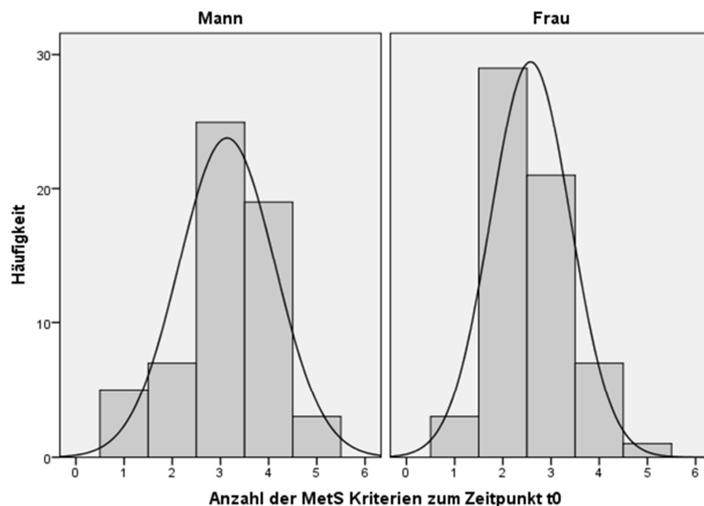


**Abbildung 9: Pearson-Korrelation von Apolipoprotein B-48 mit Parametern des Lipidprofils (Männer und Frauen)**

Die multivariate Regressionsanalyse wurde für das Gesamtkollektiv durchgeführt um zu bestimmen, ob mittels eines der Parameter eine Aussage über die Apo B-48-Konzentrationen gemacht werden kann. Parameter des Lipidprofils, Glukosestoffwechsels sowie anthropometrische Daten wurden in einzelnen Modellen untersucht. Weder Glukose ( $\beta = 0,004; p = 0,821$ ), logInsulin ( $\beta = 0,764; p = 0,835$ ) oder logHOMA-Index ( $\beta = -0,592; p = 0,886$ ) zeigten einen signifikanten Einfluss auf die Apo B-48 Konzentrationen. In der schrittweisen multiplen Regression werden schließlich logTriglyceride ( $\beta = 0,56; p = 0,000$ ) und LDL-C ( $\beta = 0,001; p = 0,015$ ) in das Modell aufgenommen. Die Vorhersage der Apo B-48-Konzentration lässt sich anhand der TG und LDL-C zu 34% ( $R^2 = 0,34; p = 0,000$ ) verbessern. Eine Abhängigkeit wird sich letztlich zeigen, wenn Veränderungen des Apo B-48 durch Veränderungen dieser Parameter verursacht werden.

## 4.5 Zusammenhang des Apolipoproteins B-48 mit dem metabolischen Syndrom

In Abbildung 10 ist die Häufigkeitsverteilung der definierenden Kriterien des MetS bei Männern und Frauen dargestellt. Die Häufigkeiten der Kriterien des MetS sind innerhalb des Geschlechts unterschiedlich verteilt ( $p < 0,001$ ; Chi-Quadrat-Test).



**Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung der Kriterien für das metabolische Syndrom bei Männern und Frauen**

Insgesamt erfüllten 36 Personen zwei der definierten Diagnosekriterien für das MetS. Innerhalb dieser Gruppe liegen die Apo B-48-Konzentrationen bei  $5,59 \pm 3,31 \mu\text{g/ml}$ . Bezugnehmend auf die Gruppe der Probanden, die drei Diagnosekriterien für das MetS ( $n = 46$ ) erfüllen, zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied sondern lediglich ein Trend für eine höhere Konzentration ( $8,34 \pm 5,81 \mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0,072$ ; Mann-Whitney-U-Test).

Anhand der Einteilungskriterien ergab sich eine Gesamtprävalenz von 63% für das MetS. Die Prävalenz allein für die Männer beträgt 80% ( $n = 47$ ) und für die Frauen 48% ( $n = 29$ ). Bei Vorhandensein eines MetS liegt die Apo B-48-Konzentration bei  $8,7 \pm 5,9 \mu\text{g/ml}$ . Der Unterschied zu den Probanden, die das MetS nicht aufzeigen ( $5,65 \pm 3,20 \mu\text{g/ml}$ ), ist signifikant ( $p = 0,006$ ; Mann-Whitney-U-Test). Ebenfalls unterscheiden sich die männlichen Probanden mit MetS durch signifikant höhere Apo B-48-Konzentrationen gegenüber den Probanden ohne MetS ( $p = 0,026$ ; T-Test bei unabhängigen Stichproben).

Hinsichtlich der Apo B-48-Konzentrationen zwischen Männern und Frauen mit und ohne MetS sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen ( $p = 0,115$ ;  $p = 0,535$ ; T-Test bei unabhängigen Stichproben).

In der Tabelle 10 sind neben der Häufigkeit für das metabolische Syndrom auch die Apo B-48-Konzentrationen innerhalb der Gruppen aufgeführt.

**Tabelle 10: Apolipoprotein B-48 Konzentration beim metabolischen Syndrom**

Apo B-48 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Metabolisches Syndrom		
	JA	NEIN	$p^{*,\#\#}$
Gesamtkollektiv	8,7 $\pm$ 5,9	5,7 $\pm$ 3,20	<b>0,006</b>
<b>n</b>	<b>76</b>	<b>44</b>	
Männer	9,5 $\pm$ 6,4	5,2 $\pm$ 2,9	<b>0,026<sup>\#\#</sup></b>
<b>n</b>	<b>47</b>	<b>12</b>	
Frauen	7,3 $\pm$ 4,8	5,8 $\pm$ 3,3	0,161 <sup>\#\#</sup>
<b>n</b>	<b>29</b>	<b>32</b>	
<b>p*</b>	0,115 <sup>\#\#</sup>	0,535 <sup>\#\#</sup>	

*\*Mann-Whitney-U-Test; <sup>\#\#</sup> T-Test bei unabhängigen Stichproben*

#### 4.6 Die Rolle des Apolipoproteins B-48 innerhalb kardiovaskulärer Risikofaktoren

Die Häufigkeiten innerhalb der kardiovaskulären Risikofaktoren wurden im Gesamtkollektiv erfasst. Zusätzlich erfolgte hinsichtlich der Risikofaktoren eine Einteilung der Probanden in einen akzeptablen und grenzwertigen Risikobereich. Aus der Tabelle 11 sind die Verteilungen der Häufigkeit innerhalb der Risikofaktoren sowie die dazugehörigen Apo B-48-Konzentrationen dargestellt. In Bezug auf die Häufigkeit ist ersichtlich, dass die grenzwertigen bis hohen Risikobereiche oftmals eine höhere Probandenanzahl umfassen. Vor allem beim Taillenumfang ist eine deutliche Mehrheit von 116 Proben oberhalb der definierten Grenzwerte von  $\geq 102$  cm bei Männern und  $\geq 88$  cm bei Frauen zu erkennen. Innerhalb der genannten Risikofaktoren systolischer und diastolischer Blutdruck, Gesamt-C, LDL-C und HOMA-Index ist die Anzahl der Probanden im grenzwertigen bis hohen Risikobereich ebenfalls höher. Bezugnehmend auf die Konzentrationen des Apo B-48 innerhalb der definierten Risikogruppen sind signifikant höhere Werte des Apo B-48 bei Probanden in grenzwertigen bis hohen

Risikobereichen innerhalb der TG, Gesamt-C und LDL-C ersichtlich ( $p < 0,000$ ;  $p = 0,005$ ;  $p < 0,000$ ).

**Tabelle 11: Häufigkeiten und Apolipoprotein B-48-Konzentration innerhalb der definierten Grenzwerte der Risikofaktoren (Mittelwert  $\pm$  SD)**

Risikofaktoren		Grenzwerte für Risiko	Häufigkeit	Apo B-48 [µg/ml]	p*
<b>Adipositas</b>	Taillenumfang	Akzeptabel	4	3,8 $\pm$ 0,7	0,074
		Grenzwertig / hoch	116	7,7 $\pm$ 5,3	
<b>Blutdruck</b>	SBP und DBP	Akzeptabel	16	7,1 $\pm$ 4,1	0,886
		Grenzwertig / hoch	104	7,6 $\pm$ 5,5	
<b>Dyslipidämie</b>	TG	Akzeptabel	65	5,3 $\pm$ 3,2	<b>&lt; 0,001</b>
		Grenzwertig / hoch	55	10,2 $\pm$ 6,0	
	Gesamt -C	Akzeptabel	20	5,1 $\pm$ 3,4	<b>0,005</b>
		Grenzwertig / hoch	100	8,1 $\pm$ 5,5	
	LDL-C	Akzeptabel	34	5,1 $\pm$ 3,0	<b>&lt; 0,001</b>
		Grenzwertig / hoch	81	7,9 $\pm$ 4,7	
HDL-C	Akzeptabel	94	7,8 $\pm$ 5,3	0,524	
	Grenzwertig / hoch	26	6,9 $\pm$ 5,2		
<b>Insulinresistenz</b>	HOMA-Index	keine IR	44	7,4 $\pm$ 5,4	0,699
		IR	76	7,7 $\pm$ 5,2	
	nüchtern	NGT	79	7,7 $\pm$ 5,3	0,421
	Glucose	IGT	41	7,2 $\pm$ 5,4	

Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \*Mann-Whitney U Test; SBP: systolischer Blutdruck; DBP: diastolischer Blutdruck; TG: Triglyceride; LDL-C: Low-density lipoprotein, HDL-C: high-density lipoprotein; HOMA-Index: Homeostasis Model Assessment; IR: Insulinresistenz; NGT: normal glucose tolerance IGT: Impaired glucose tolerance

#### **4.7 Apolipoprotein B-48 innerhalb der definierten Risikogruppen zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos**

Im Folgenden wird in der Tabelle 12 die Häufigkeit innerhalb der Risikogruppen sowie die Konzentration des Apo B-48 zusammengefasst. In der hohen Risikogruppe befinden sich 43 Männer und 35 Frauen. Innerhalb der verschiedenen Gruppen zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos ist die Häufigkeit bezogen auf Männer und Frauen signifikant verschieden ( $p = 0,027$ ; Chi-Quadrat-Test).

Es zeigt sich eine Apo B-48-Konzentration von  $4,3 \pm 2,3$   $\mu\text{g/ml}$  für die Gruppe mit geringem Risiko,  $5,4 \pm 3,2$   $\mu\text{g/ml}$  für Gruppe mit moderatem Risiko und  $8,8 \pm 5,8$   $\mu\text{g/ml}$  für die Gruppe mit hohem Risiko. Auch bei dieser Einteilung ist der Unterschied zwischen der moderaten ( $n = 35$ ) und hohen ( $n = 78$ ) Risikogruppe signifikant ( $p = 0,002$ ; Mann-Whitney-U-Test). Ebenso sind die Konzentrationen der Männer in der Gruppe mit dem hohem Risiko im Vergleich zur Gruppe mit moderatem Risiko signifikant höher ( $p = 0,04$ ; T-Test bei unabhängigen Stichproben). Innerhalb der hohen Risikogruppe lässt sich ein statistischer Trend für höhere Konzentrationen des Apo B-48 der Männer feststellen ( $p = 0,08$ ; T-Test bei unabhängigen Stichproben).

**Tabelle 12: Häufigkeiten und Apolipoprotein B-48 Konzentration innerhalb der geringen, moderaten und hohen Risikogruppe**

Apo B-48 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Risikogruppe			p <sup>***</sup>
	gering	moderat	hoch	
Gesamtkollektiv	$4,3 \pm 2,3$	$5,4 \pm 3,2$	$8,8 \pm 5,8$	<b>0,002*</b>
<b>n</b>	<b>7</b>	<b>35</b>	<b>78</b>	
Männer	$5,0 \pm 2,3$	$5,5 \pm 3,9$	$9,8 \pm 6,5$	<b>0,040<sup>##</sup></b>
<b>n</b>	<b>5</b>	<b>11</b>	<b>43</b>	
Frauen	$2,6 \pm 1,5$	$5,4 \pm 2,9$	$7,5 \pm 4,6$	0,051 <sup>##</sup>
<b>n</b>	<b>2</b>	<b>24</b>	<b>35</b>	
<b>p</b>	0,738 <sup>##</sup>	0,970 <sup>##</sup>	0,080 <sup>##</sup>	

*Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \*Mann-Whitney-U-Test; <sup>##</sup> T-Test bei unabhängigen Stichproben für Vergleiche der Gruppen moderates und hohes Risiko*

Der Einfluss der Apo B-48-Konzentration auf die Zugehörigkeit zu einer Risikogruppe wurde innerhalb einer logistischen Regression untersucht. Dabei zeigte sich, dass Probanden mit höheren Apo B-48-Konzentrationen tendenziell in den Risikogruppen zu finden sind, die ein höheres Risiko darstellen ( $\beta = 0,181$ ;  $p = 0,004$ ). Die Wahrscheinlichkeit, dass die höhere Risikogruppe erreicht wird ist bei steigenden Apo B-48-Konzentrationen um das 1,199 fache größer als bei abfallenden Werten ( $\text{Exp}(B) = 1,199$ ).

## 4.8 Änderungen nach zwölf-wöchiger Interventionsphase

Die zugrundeliegende Studie zielte darauf ab, das Gewicht der Probanden zu reduzieren und die Parameter des Lipidprofils sowie des Glucosestoffwechsels zu verbessern.

### 4.8.1 Einfluss auf Parameter innerhalb der Beobachtungsgruppen Männer und Frauen

#### Anthropometrische und biochemische Daten

Die anthropometrischen Daten des gesamten Studienkollektivs zeigten im Verlauf der zugrundeliegenden Intervention von zwölf Wochen signifikante Reduktionen ( $p < 0,001$ ; T-Test bei gepaarten Stichproben). Der Gewichtsverlust der Männer von  $-6,1 \pm 4,3$  kg und der Frauen von  $-4,5 \pm 3,2$  kg erwies sich als statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ; T-Test bei gepaarten Stichproben). Auch eine signifikante Senkung der Parameter des Glukosestoffwechsels konnte erzielt werden (HOMA-Index:  $p = 0,000$ ; Insulin  $p = 0,000$ ; Glukose  $p = 0,028$ ; Wilcoxon-Test).

Nach Ablauf der zwölf Wochen zeigte sich ebenfalls eine signifikante Änderung der TG bei beiden Geschlechtern (Männer:  $p = 0,001$ ; Frauen:  $p = 0,043$ ; Wilcoxon Test). Dagegen ist das Gesamt-C nur bei Frauen signifikant gesunken ( $p = 0,026$ ; T-Test bei gepaarten Stichproben), während sich das HDL-C bei Männern signifikant erhöhte ( $p = 0,031$ ; T-Test bei gepaarten Stichproben). Demgegenüber zeigten die LDL-C Werte sowohl bei Männern als auch Frauen keine signifikante Änderung (Männer:  $p = 0,126$ ; Frauen:  $p = 0,127$ ; T-Test bei gepaarten Stichproben). Hinsichtlich der Unterschiede zwischen Männern und Frauen ist lediglich die Erhöhung der männlichen HDL-C Werte signifikant ( $p = 0,005$ ; T-Test bei unabhängigen Stichproben). Die Tabelle der Änderungen der Lipidparameter bei Männern und Frauen nach zwölf-wöchiger Intervention ist im Anhang (Tabelle A) aufgeführt.

#### Apolipoprotein B-48-Konzentrationen

In beiden Gruppen (Männer und Frauen) konnte im Studienverlauf eine signifikante Reduktion der Apolipoprotein B-48-Konzentration festgestellt werden (Männer:  $p \leq 0,001$ ; Wilcoxon Test; Frauen:  $p = 0,004$ ; Wilcoxon Test). Bei Betrachtung der Reduktion der Apo B-48-Konzentration zwischen  $t_0$  und  $t_{12}$  ergab sich für Männer eine signifikant höhere Differenz ( $p = 0,009$ ; Mann-Whitney-U-Test). Die Änderungen der Konzentrationen des Apo B-48 sind in Tabelle 13 aufgelistet.

**Tabelle 13: Änderungen der Apolipoprotein B-48 Konzentration im Gesamtkollektiv sowie Männern und Frauen nach zwölf-wöchiger Intervention**

Apo B-48 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Gesamt	Männer	Frauen	p*
t <sub>0</sub>	7,6 $\pm$ 5,3	8,6 $\pm$ 6,1	6,5 $\pm$ 4,1	0,080
n	<b>120</b>	<b>59</b>	<b>61</b>	
t <sub>12</sub>	4,8 $\pm$ 3,4	4,7 $\pm$ 3,8	5,1 $\pm$ 2,9	0,151
n	<b>99</b>	<b>51</b>	<b>48</b>	
$\Delta$ t <sub>12</sub> - t <sub>0</sub>	- 2,9 $\pm$ 4,4	-4,1 $\pm$ 4,8	-1,8 $\pm$ 3,8	<b>0,009</b>
<b>p** t<sub>12</sub> - t<sub>0</sub></b>	<b><math>\leq</math> 0,001</b>	<b><math>\leq</math> 0,001</b>	<b>0,004</b>	

\*Mann-Whitney-U-Test, \*\*Wilcoxon-Test

### 4.8.3 Einfluss auf Parameter innerhalb der Interventions- und Placebogruppe

#### Anthropometrische und biochemische Daten

Die anthropometrischen Daten Gewicht, BMI, Taillen- und Hüftumfang sowie der systolische und diastolische Blutdruck zeigten innerhalb der beiden Gruppen (Intervention und Placebo) im Verlauf der Studie signifikante Veränderungen auf ( $p < 0,001$ ; Wilcoxon Test). In der Interventionsgruppe kam es zu einer signifikanten Senkung der Parameter des Lipidprofils TG ( $p = 0,001$ ; Wilcoxon-Test), LDL-C ( $p = 0,001$ ; Wilcoxon-Test) und Gesamt-C ( $p < 0,001$ ; Wilcoxon-Test). Im Hinblick auf Insulin wurde bei beiden Gruppen eine signifikante Senkung ( $p < 0,0001$ ; Wilcoxon-Test) beobachtet. [Willers et al., 2012].

#### Apolipoprotein B-48-Konzentration

Da Apo B-48 in Proben von Probanden einer Interventionsstudie gemessen wurde, soll ebenfalls der Einfluss des verwendeten Polyglucosamins und der Formuladiät allein auf die Änderungen der Apo B-48-Konzentrationen erläutert werden. Beim Vergleich des lipidbindenden Medizinprodukts (L112) mit der Formuladiät als Placeboprodukt hinsichtlich der Apo B-48-Differenz von t<sub>0</sub> zu t<sub>12</sub> zeigt sich ein statistischer Trend ( $p = 0,067$ ; Mann-Whitney-U-Test). Letztlich ist auch hier eine deutlich signifikante Änderung der Konzentrationen des Apo B-48 nach Ablauf der Interventionszeit zu erkennen, sowohl bei der Interventions- ( $p = 0,000$ ; Wilcoxon-Test) als auch der Placebogruppe ( $p = 0,002$ ; Wilcoxon-Test) (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Änderung der Apolipoprotein B-48-Konzentration in der Interventions- und Placebogruppe nach zwölf-wöchiger Intervention**

Apo B-48 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	L112	Placebo	p*
$t_0$	$7,9 \pm 4,7$	$7,2 \pm 5,8$	0,137
n	<b>60</b>	<b>60</b>	
$t_{12}$	$4,5 \pm 3,4$	$5,1 \pm 3,5$	0,149
n	<b>49</b>	<b>50</b>	
$\Delta t_{12} - t_0$	$-3,3 \pm 3,4$	$-2,5 \pm 5,3$	0,067
<b>p** <math>t_{12} - t_0</math></b>	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>	

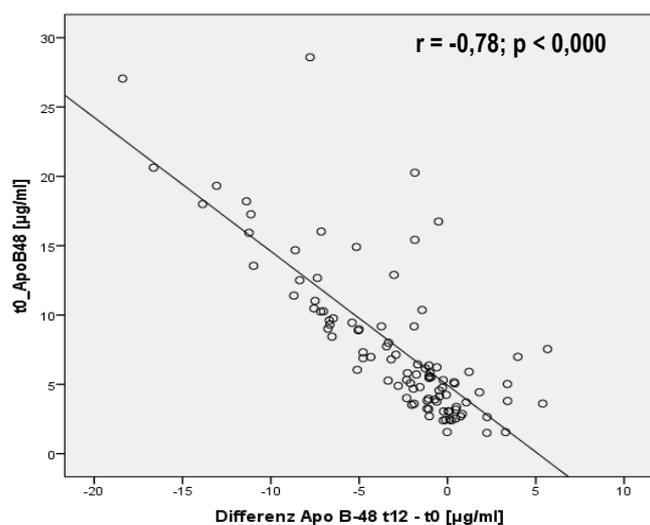
\*Mann-Whitney-U-Test, \*\*Wilcoxon-Test

#### 4.8.2 Korrelationen von Ausgangswerten und Differenzen des Gewichts sowie biochemischen Daten mit Apolipoprotein B-48

Im diesem Abschnitt wird der Zusammenhang zwischen Ausgangswerten und Differenzen des Apo B-48 sowie Änderungen des Gewichts und Parametern des Lipidprofils betrachtet.

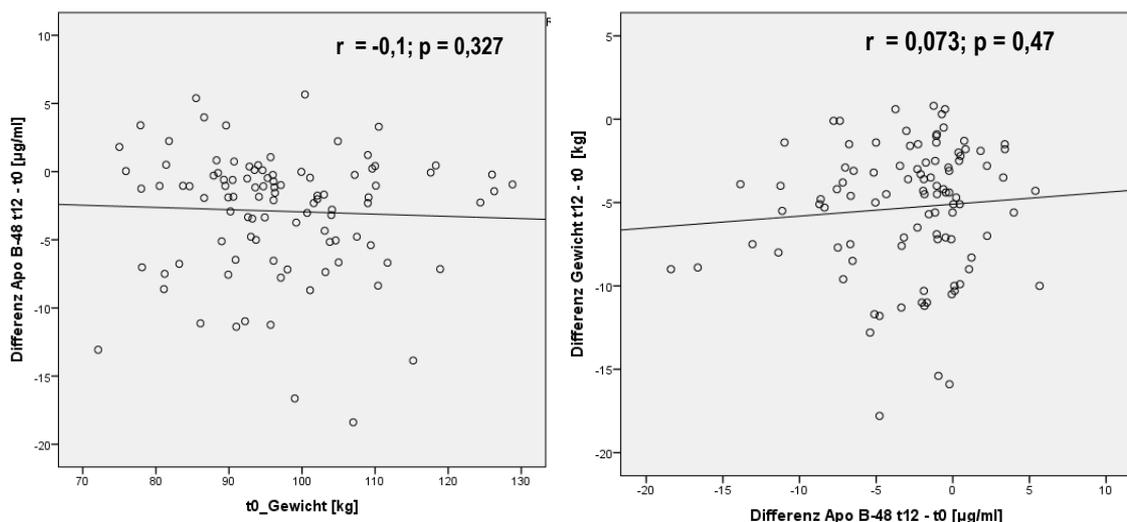
##### Gewichtsreduktion

Wie in der Abbildung 11 dargestellt ist die Abnahme des Apo B-48 nach zwölf Wochen umso größer, je höher die Ausgangskonzentration. Mittels Spearman-Korrelationskoeffizient erwies sich die Korrelation zwischen der Apo B-48-Differenz und dem Ausgangswert als signifikant ( $r = -0,78$ ;  $p < 0,000$ ).



**Abbildung 11: Zusammenhang zwischen der Apolipoprotein B-48-Differenz mit dem Apolipoprotein B-48-Ausgangswert**

Ob die Apo B-48-Konzentration direkt in einem Zusammenhang mit der Gewichtsreduktion steht, zeigt die Abbildung 12. Wie im linken Bild ersichtlich ist kein Zusammenhang hinsichtlich des Ausgangsgewichts und der Reduktion des Apo B-48 festzustellen ( $r = -0,1$ ;  $p = 0,327$ ; Spearman-Korrelation). Bei Betrachtung des rechten Bilds wird erkennbar, dass die Reduktion des Ausgangsgewichts ebenfalls keine Bedeutung auf die Senkung der Apo B-48-Konzentrationen hat ( $r = 0,073$ ;  $p = 0,47$ ; Spearman-Korrelation).



**Abbildung 12: Zusammenhang zwischen der Differenz des Apolipoproteins B-48 mit dem Ausgangswert des Gewichts und der Differenz des Gewichts**

#### Änderungen der Parameter des Glukose- und Lipidstoffwechsels

Für die Parameter des Glukosestoffwechsels und Apo-B-48 konnte keinerlei Zusammenhang in Bezug auf die Reduktion festgestellt werden.

Aufgrund der Korrelationen von Apo B-48 mit Parametern des Lipidprofils zum Zeitpunkt der Basisuntersuchung lässt sich ebenfalls ein Zusammenhang der beiden Parameter nach Ablauf der zwölf-wöchigen Intervention vermuten und auch in den Ergebnissen bestätigen. Für das gesamte Studienkollektiv zeigen sich höhere Ausgangswerte des Apo B-48, umso höher die Differenz der Lipidparameter wie TG, Gesamt-C und LDL-C ist. Die Korrelation der Ausgangswerte mit den jeweiligen Parametern erweisen sich als signifikant (Tabelle 15).

**Tabelle 15: Spearman-Korrelationskoeffizienten des Apolioprotein B-48-Ausgangswertes mit Differenzen von Parametern des Lipidprofils nach zwölfwöchiger Intervention**

Parameter	Diff.TG [mg/dl]	Diff. Gesamt-C [mg/dl]	Diff. LDL-C [mg/dl]	Diff. HDL-C [mg/dl]
<b>ApoB-48</b> [µg/ml]	<b>-0,335**</b>	<b>-0,301**</b>	<b>-0,214*</b>	-0,007

\*\*p < 0,01; \* p < 0,05; TG: Triglyceride; LDL-C: *Low-density-lipoprotein*, HDL-C: *high-density-lipoprotein*

Ebenso zeigen die Untersuchungen der Apo B-48-Differenzen mit Lipidparametern signifikante Korrelationen und zwar sowohl bei den Ausgangswerten, wie auch den Differenzwerten. Je höher die Differenz des Apo B-48, desto höher fallen die Reduktionen der TG, Gesamt-C und LDL-C aus (Tabelle B, im Anhang).

## 5. Diskussion

Apo B-48 gilt als fester Bestandteil der intestinalen Lipoproteine wie CM und CM-R, welche eine Rolle im exogenen Lipidstoffwechsel einnehmen. Ein gestörter Stoffwechsel ist gekennzeichnet durch Anreicherungen dieser Lipoproteine im postprandialen Zustand und wird als Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse angesehen [Karpe, 1999; Weintraub et al., 1996; Sarwar, 2007]. In der derzeitigen Studienlage wird Apo B-48 als zusätzlicher Marker für das kardiovaskuläre Risiko diskutiert [Alipour et al., 2012].

Zur Beurteilung der Frage, ob Apo B-48 einen weiteren Risikomarker darstellen könnte, erfolgte in dieser Masterarbeit die Messung der Apo B-48-Konzentration in einem übergewichtigen Kollektiv sowie die Untersuchungen auf Zusammenhänge mit etablierten Risikofaktoren. Zusätzlich wurde der Einfluss einer placebo-kontrollierten Interventionsstudie in Bezug auf die Apo B-48-Konzentration untersucht.

Im Folgenden werden im Kapitel 5.1 die Ergebnisse der gemessenen Apo B-48-Konzentrationen mit denen anderer Studienresultate verglichen. Anschließend werden die gefundenen Zusammenhänge des Apo B-48 mit Parametern des Lipid- und Glukosestoffwechsels diskutiert (Kapitel 5.2). Im Weiteren erfolgt die Untersuchung des Apo B-48 innerhalb metabolischer Störungen wie dem MetS (Kapitel 5.3) und anderen etablierten Risikofaktoren (Kapitel 5.4). In Kapitel 5.5 soll das durch Risikogruppen abgeschätzte kardiovaskuläre Risiko im Zusammenhang mit Apo B-48 beurteilt werden. Weiterhin werden in Kapitel 5.6 die interventionsbedingten Änderungen wie eine Gewichtsreduktion oder Senkung der Lipidparameter in Bezug auf die Apo B-48-Konzentrationen diskutiert. Dabei wird auch der Einfluss innerhalb der Interventions- und Placebogruppe betrachtet. Am Ende wird die in der Untersuchung angewandte Methode in Bezug auf die Aussagekraft und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beurteilt (Kapitel 5.7).

## 5.1 Apolipoprotein B-48 innerhalb eines übergewichtigen Kollektivs

Die Apo B-48-Konzentrationen in den bisher veröffentlichten Studien haben eine sehr große Schwankungsbreite. Die Konzentrationen liegen in einem Bereich zwischen 0,08 µg/ml und 29 µg/ml [Lovegrove et al., 1996; Lorec et al., 2000; Dane-Stewart et al., 2001; Sakai et al., 2003; Otokozawa et al., 2009]. Die großen Schwankungsbreiten der Konzentrationen lassen sich möglicherweise aufgrund der unterschiedlich angewendeten Methoden innerhalb der verschiedenen Studien erklären (Tabelle B, Anhang). Die Apo B-48-Konzentrationen der vorliegenden Arbeit (Männer 8,6 µg/ml und Frauen mit 6,5 µg/ml (Mittelwert)) befinden sich innerhalb des Konzentrationsbereichs (0,08 µg/ml und 29 µg/ml). Sie ähneln den Werten die in einer Studie bei übergewichtigen Männern und Frauen mittels des gleichen ELISA-Assays (Shibayagi) erfasst wurden (8,2 µg/ml (Mittelwert)). Im Vergleich dazu zeigen 12 gesunde Probanden Apo B-48-Konzentrationen von 5,1 µg/ml (Mittelwert) [Otokozawa et al., 2009]. Daher scheint eine Vergleichbarkeit zwischen den gemessenen Apo B-48-Konzentrationen und denen in bereits publizierten Studien gegeben.

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darlegen, besteht eine signifikant höhere Apo B-48-Konzentration der Männer im Vergleich zu den Frauen. Dies geht mit diversen Studien einher, die ebenfalls höhere Apo B-48-Konzentrationen bei Männern nachgewiesen haben [Sakai et al., 2003; Kinoshita et al., 2009]. Kinoshita et al. begründet die geschlechtsspezifischen Unterschiede mit einem schnellerem Abbau der CM und/oder CM-R bzw. mit einer geringeren Fettabsorption [Kinoshita et al., 2009].

Bei den gemessenen Apo B-48-Konzentrationen handelt es sich um Serum-Nüchternkonzentrationen. Hohe Nüchternwerte des Apo B-48 deuten gleichzeitig auch auf hohe postprandiale Konzentrationen der CM und CM-R hin [Smith et al., 1999]. Diese lassen wiederum einen gestörten Stoffwechsel und somit eine postprandiale Hyperlipidämie vermuten [Masuda et al., 2012]. Beim Vergleich der oben genannten Apo B-48 Konzentrationen liegen diese oberhalb der Konzentrationen eines normalgewichtigen Kollektivs (5,1 µg/ml) [Otokozawa et al., 2009]. Die hohen Apo B-48 Nüchternkonzentrationen dieses übergewichtigen Kollektivs könnten daher auf eine postprandiale Hyperlipidämie hindeuten.

## 5.2 Korrelationen des Apolipoproteins B-48 mit Parametern des Lipid- und Glukosestoffwechsels

Im Zuge der Untersuchungen konnten signifikante Korrelationen von Apo B-48 mit Parametern des Lipidprofils wie TG, Gesamt-C und LDL-C nachgewiesen und somit frühere Studien bestätigt werden [Kinoshita et al., 2009; Alipour et al., 2012] (Tabelle C, im Anhang). Vor allem die positive Assoziation zwischen den TG und Apo B-48 wurde bereits mehrfach in der Literatur aufgezeigt [Smith et al., 1999; Couillard et al., 2002; Chan et al., 2002a].

Die Ergebnisse dieser Untersuchung und auch die vorheriger Studien scheinen insofern physiologisch erklärbar, da die CM große Mengen der zirkulierenden TG enthalten. Die TG-Konzentration dieses Kollektivs liegt mit  $174,3 \pm 117,2$  mg/dl oberhalb des Cut-Off Werts von 150 mg/dl. Dieser Cut-Off Wert wird laut National Cholesterol Education Program ATP als Hypertriglyceridämie diagnostiziert [Grundy et al., 2001]. Die deutlich erhöhten TG-Konzentrationen könnten somit ursächlich für die signifikante Korrelation mit Apo B-48 sein.

Anhand der Korrelationen des Apo B-48 mit den Parametern des Lipidprofils wie LDL-C lassen sich im Weiteren mögliche Rückschlüsse auf die in der Theorie beschriebene Verbindung zu den hepatischen Lipoproteinen ableiten. Die TGRL intestinalen und hepatischen Ursprungs konkurrieren sowohl um die Lipolyse als auch um die Rezeptor-vermittelte Aufnahme. Eine Störung im Stoffwechsel der CM und ihrer Remnants könnte somit auch eine gestörte Konversion der VLDL in LDL oder eine reduzierte Aufnahme der VLDL bzw. LDL reflektieren [Redgrave, 2004]. Unter der Annahme, dass aufgrund der erhöhten Apo B-48-Konzentration des Studienkollektivs auch ein gestörter CM-Stoffwechsel vorliegt, könnte die in der vorliegenden Arbeit gezeigte positive Korrelation der Apo B-48-Konzentration mit LDL-C Hinweise auf die reduzierte Aufnahme des LDL-C über den Rezeptor geben. Letztlich lässt sich jedoch keine eindeutige Aussage über den Zusammenhang der intestinalen und hepatischen Lipoproteine bzw. eines gestörten Stoffwechsels ableiten. Es müssten weitere Parameter wie beispielsweise die VLDL-Konzentration, die Aktivität der Lipase oder der LDLR in Betracht gezogen werden.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit positive Korrelationen von Apo B-48 mit Insulin und dem HOMA-Index innerhalb der weiblichen

Probandengruppe. Ähnliche Ergebnisse erzielten Duez. et al., die eine signifikant höhere Produktionsrate ( $p = 0,04$ ) bei Männern mit höheren Nüchterninsulinkonzentrationen und einem höheren HOMA-Index feststellten [Duez et al., 2006]. Ein möglicher Mechanismus wäre demnach, dass die intestinale Produktionsrate der Apo B-48-haltigen Lipoproteine durch Insulin erhöht werden kann. Nichtsdestotrotz muss berücksichtigt werden, dass Apo B-48 weder im Gesamtkollektiv noch bei den Männern mit Parametern des Glukosestoffwechsels (HOMA-Index, Glukose oder Insulin) korreliert. Es muss daher in Betracht gezogen werden, dass erhöhte Nüchternkonzentrationen des Apo B-48 über einen Insulin-unabhängigen Mechanismus erfolgen. Übereinstimmend dazu zeigte eine 8-wöchige Interventionsstudie mit Metformin und Rosiglitazone (Medikamente zur Insulinsensibilisierung) eine Verbesserung der Insulinresistenz. Gleichzeitig konnten dabei jedoch weder Nüchtern- noch Postprandialekonzentrationen der CM bei den übergewichtigen insulinresistenten Männern verbessert werden [James et al., 2005].

Im Zuge der Untersuchungen konnte im Gesamtkollektiv eine negative Assoziation zwischen den CRP-Werten und Apo B-48 festgestellt werden. Dieses Ergebnis scheint jedoch unerwartet, wenn man die Theorie annimmt, dass den Apo B-48-haltigen Lipoproteinen eine Rolle im Prozess der Atherosklerose zugeschrieben wird. CRP ist ein etablierter Entzündungsmarker, welcher in der Pathogenese der Atherosklerose von Bildung der „fatty streaks“ bis hin zur Plaqueruptur eine wichtige Rolle spielt [Torres und Ridker, 2003]. Derzeit fehlt es an vergleichbaren Studien, welche die Apo B-48-Konzentration im Zusammenhang mit CRP betrachtet haben. Studien belegten lediglich Auswirkungen der Apo B-48-haltigen Lipoproteine auf die Leukozytenaktivität [Alipour et al., 2008], welche wiederum eine Rolle im Prozess der Atherosklerose einnehmen. Dennoch kann anhand dieser Ergebnisse keine genauere Aussage über die mögliche atherogene Wirkung der Apo B-48-haltigen Lipoproteine gemacht werden.

### **5.3 Zusammenhang des Apolipoproteins B-48 mit dem metabolischen Syndrom**

Das Studienkollektiv wurde anhand der Definition zur Diagnose eines MetS nach Alberti et al. eingeteilt [Alberti et al., 2009]. Insgesamt ergab sich eine Prävalenz von 76% für das MetS. Ähnlich zu vorherigen Studien [Kinoshita et al., 2009] ist die Konzentration des Apo B-48 im Vergleich zu den Probanden ohne MetS höher.

In der pathophysiologischen Entwicklung des MetS wird als grundlegende Ursache die Insulinresistenz angesehen [Eckel et al., 2005]. Unter der Annahme, dass auch jene Probanden dieses Studienkollektivs mit MetS eine Insulinresistenz besitzen, könnte dies eine mögliche Erklärung für die höheren Apo B-48-Konzentrationen darstellen. Die Ergebnisse einer Studie von Duez et al. zeigen, dass eine Anregung der CM-Produktion bei Insulinresistenz und erhöhten freien Fettsäuren erfolgt [Duez et al., 2006]. Zusätzlich kann eine Insulinresistenz zu einer Reduktion der LPL im peripheren Gewebe führen [Pruneta-Deloche et al., 2004]. Diese Änderungen der LPL-Aktivität können wiederum eine Anreicherung der Apo B-48 –haltigen Lipoproteine bewirken, da ihr Abbau vermindert wird. Letztlich kann in diesem Studienkollektiv der HOMA-Index ( $3,4 \pm 2,0$ ) Hinweise auf eine Insulinresistenz geben, doch es kann keine genaue Diagnose einer bestehenden Insulinresistenz erfolgen. Die Untersuchung des Zusammenhangs von Apo B-48 mit der LPL oder inhibierender Faktoren der LPL wie das Apo C-III könnten zusätzlich interessante Ansatzpunkte für eine Aussage zur Insulinresistenz beim MetS darlegen.

Das typische Lipidprofil beim metabolischen Syndrom ist durch Hypertriglyceridämie und niedrige HDL-C-Konzentrationen gekennzeichnet [Grundy et al., 2012]. Die Tatsache des Vorliegens einer Hypertriglyceridämie und gleichzeitig erhöhten Apo B-48-Konzentrationen bestätigt wiederum nur den bereits aufgezeigten starken Zusammenhang der beiden Parameter. Eine andere Störung der Lipoproteine beim metabolischen Syndrom ist die Reduktion des HDL-C. Im Gegensatz zu anderen Studien [Kinoshita et al., 2009; Alipour et al., 2012] konnte innerhalb dieser Untersuchung keine signifikante Beziehung zwischen Apo B-48 und HDL-C festgestellt werden.

Weiterhin deuten Vine et al. an, dass ein gestörter Stoffwechsel der Apo B-48–haltigen Lipoproteine bei Ratten mit MetS die Entwicklung von Atherosklerose fördert [Vine et al., 2007]. Die Probanden dieses Studienkollektivs mit MetS zeigen ebenfalls erhöhte Nüchternkonzentrationen des Apo B-48. Die Ergebnisse reichen dennoch nicht aus, um ein erhöhtes Risiko für Atherosklerose der Probanden mit MetS anzudeuten.

## 5.4 Die Rolle des Apolipoproteins B-48 innerhalb kardiovaskulärer Risikofaktoren

Neben dem in Studien aufgezeigten Zusammenhang zwischen der postprandialen Hyperlipidämie und der Anwesenheit bzw. Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen scheint ebenfalls die Untersuchung der Nüchternkonzentrationen des Apo B-48 innerhalb kardiovaskulärer Risikofaktoren interessant.

In der vorliegenden Masterarbeit wurden kardiovaskuläre Risikofaktoren entsprechend der Erscheinungsform Adipositas, Bluthochdruck, Dyslipidämie und Insulinresistenz genutzt, um das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen abzuschätzen. Zusätzlich zum Übergewicht ( $\text{BMI } 31,8 \pm 1,9 \text{ kg/m}^2$ ) weisen insgesamt 116 Probanden des Kollektivs Merkmale einer abdominellen Adipositas begleitet durch überschüssiges viszerales Fettgewebe auf. Hierdurch sind gleichzeitig weitere metabolische Störungen assoziiert, die das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse erhöhen [Poirier et al., 2006]. Studien zeigten bereits, dass die abdominelle Adipositas häufig mit einer postprandialen Hyperlipidämie assoziiert ist und dies wiederum durch erhöhte Apo B-48-Konzentrationen erkennbar wird [Couillard et al., 2002]. Hierbei lassen sich die Ergebnisse dieses Kollektivs jedoch abgrenzen, da keine signifikante Erhöhung der Apo B-48-Konzentrationen vorliegt ( $p = 0,074$ ). Der aufgezeigte statistische Trend für höhere Apo B-48-Konzentrationen resultiert vermutlich aus der hohen Anzahl an Probanden, die einen Taillenumfang oberhalb des Grenzwertes aufweisen.

Betrachtet man die Parameter des Lipidprofils zur Beschreibung einer Dyslipidämie fällt auf, dass innerhalb der TG 65 Probanden eine Konzentration unterhalb von 150 mg/dl haben. Kürzlich konnte in einer Studie von Nakatani et al. gezeigt werden, dass Apo B-48 bei normalen Triglyceriden ( $100 \leq \text{TG} \leq 150 \text{ mg/dl}$ ) mit der Intima-Media-Dicke korreliert und somit Hinweise auf frühe atherosklerotische Läsionen bei normalen TG-Konzentrationen geben könnte [Nakatani et al., 2011]. Nichtsdestotrotz haben 55 Probanden des Kollektivs erhöhte TG-Konzentrationen. Beim Vergleich der Apo B-48-Konzentration zeigen sich statistisch signifikant höhere Werte bei vorliegender Hypertriglyceridämie ( $p < 0,001$ ). Dies war dahingehend zu erwarten, da die TG sehr stark mit Apo B-48 assoziiert sind.

Die gleichzeitig erhöhten Apo B-48- und LDL-C-Konzentrationen ( $\geq 130 \text{ mg/dl}$ ) können einen Abbau der VLDL-Partikel und dessen Konvertierung zu LDL-C andeuten. Da der

gestörte CM-Stoffwechsel ebenfalls Hinweise auf die Anreicherung der VLDL bzw. LDL-Partikel geben kann [Redgrave, 2004]. Aufgrund der Anreicherung der CM und CM-R im postprandialen Zustand können sich weitere atherogene Lipidprofile wie hohe small dense LDL und niedrige HDL-Konzentrationen ergeben [Couillard et al., 2002]. So zeigte Blackburn et al., dass während der postprandialen Phase die Partikelgröße der LDL signifikant gesunken ist [Blackburn et al., 2003]. Innerhalb dieser Untersuchung lässt sich jedoch kein Aufschluss über die Größe der LDL-Partikel erhalten.

## **5.5 Apolipoprotein B-48 innerhalb der definierten Risikogruppen zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos**

Innerhalb der unterschiedlichen Risikogruppen, die mit einem niedrigen, moderaten und hohem Risiko definiert sind, konnten in der Gruppe mit hohem Risiko signifikant höhere Apo B-48-Konzentrationen festgestellt werden, als in der Gruppe mit moderatem Risiko. Sobald demnach mehr als fünf der in Tabelle 11 definierten kardiovaskulären Risikofaktoren vorliegen, ist gleichzeitig die Konzentration des Apo B-48 erhöht.

Ähnlich dieser Masterarbeit untersuchte eine Studie von Masuda et al. verschiedene metabolische Parameter des metabolischen Syndroms, welche mit dem Herz-Kreislauf-Risiko verbunden sind (TG, HDL-C, HbA1c und Adiponektin; klassifiziert als hoch und niedrig) in Bezug auf die Apo B-48-Konzentration. Zusätzlich zu den Risikofaktoren erfolgte bei vorliegender Koronararterienstenose die Diagnose einer koronaren Herzkrankheit (KHK). Die Ergebnisse der Studie zeigten eine signifikante Prävalenz für KHK bei Probanden mit hohen TG-, niedrigen HDL-C-, hohen HbA1c- und niedrigen Adiponektin-Konzentrationen sowie hohen Apo B-48-Konzentrationen im Vergleich zu Probanden mit niedrigen Apo B-48-Konzentrationen und normalen Werten der metabolischen Parameter. Letztlich konnte mittels logistischer Regression festgestellt werden, dass Apo B-48 einen entscheidenden Faktor für das Vorhandensein der KHK darstellte ( $p < 0,0001$ ). Die Schlussfolgerung der Studie ist, dass die Messung der Apo B-48-Konzentration nützlich scheint für die Feststellung von KHK bei Probanden mit MetS oder niedrigem koronarem Risiko [Masuda et al., 2012].

Nichtsdestotrotz unterscheiden sich die Untersuchungen der Studie von Masuda et al. von denen der vorliegenden Masterarbeit, zumal hier nicht die KHK-Prävalenz ermittelt wurde. Dennoch kann im Rahmen dieser Untersuchung mittels logistischer Regression festgestellt werden, dass bei Vorliegen mehrerer kardiovaskulärer Risikofaktoren ebenfalls die Apo B-48-Konzentration einen signifikanten Einfluss auf die Zugehörigkeit zur Gruppe mit hohem Risiko darstellt. In Anbetracht der Tatsache, dass innerhalb der hohen Risikogruppe mehrere metabolische Störungen vorliegen und diese gleichzeitig mit einer hohen Apo B-48-Konzentration verbunden sind, könnte Apo B-48 vermutlich auch im Rahmen dieses Studienkollektivs einen ergänzenden Beitrag zur Erkennung des kardiovaskulären Risiko leisten.

## **5.6 Einfluss interventionsbedingter Änderungen in Bezug auf die Apolipoprotein B-48 Konzentration**

### Einfluss der Gewichtsreduktion

Die zugrundeliegende Gewichtsreduktionsstudie konnte eine signifikante Senkung des Gewichts bei Männern und Frauen erzielen. Während der zwölfwöchigen Interventionszeit wurde ebenfalls die Apolipoprotein B-48-Konzentration signifikant gesenkt.

Ergebnisse vorheriger Studien, die eine Verbesserung der postprandialen Hyperlipidämie speziell durch eine Gewichtsreduktion begründen [Volek et al., 2004], können in dieser Untersuchung nicht bestätigt werden. Wie in Abbildung 12 aufgezeigt steht die signifikante Reduktion der Apo B-48-Konzentration in keinerlei Assoziation zur Reduktion des Gewichts. Für die Senkung des Apo B-48 müssen daher andere Mechanismen, die eventuell mit der Gewichtsreduktion einhergehen, in Betracht gezogen werden.

Einer Studie von Chan et al. untersuchte anhand einer randomisierten, kontrollierten Interventionsstudie ebenfalls den Einfluss einer Gewichtsreduktion auf Marker des Stoffwechsels der TGRL. Bei dieser Studie erfolgte die Zuteilung in eine Gewichtsreduktions- und eine Gewichtserhaltungsgruppe. Nach 16-wöchiger Intervention zeigen sich beim Vergleich beider Apo B-48-Konzentrationen eine signifikant höhere Differenz in der Gewichtsreduktionsgruppe ( $t_0 = 9,9 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$  und  $t_{16} = 6,3 \pm 1,0 \mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$ )) [Chan et al., 2008]. Die Gewichtsreduktion in dieser Studie steht ebenfalls in keinen Zusammenhang zur Senkung des Apo B-48. Zusätzlich

konnte jedoch festgestellt werden, dass mit der Gewichtsreduktion gleichzeitig auch der LPL-Inhibitor Apo C-III gesenkt wird, wodurch wiederum die Reduktion der Apo B-48-Konzentration resultiert [Chan et al., 2008].

Neben diesem möglichen Effekt können Gewichtsreduktionen auch mit der Verbesserung anderer metabolischer Störungen wie der Insulinsensitivität und Reduktion des viszeralen Fettgewebes einhergehen [Ross et al., 2000]. Diese wiederum könnten ebenfalls ursächlich für die Änderungen der Apo B-48-Konzentrationen sein. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde dahingehend der interventionsbedingte Einfluss auf den Taillenumfang und den HOMA-Index untersucht. In Folge der zugrundeliegenden Studie ergab sich eine signifikante Reduktion des Taillenumfangs und HOMA-Index. Hierbei steht jedoch keiner der beiden Parameter in einem Zusammenhang mit der Reduktion des Apo B-48. Im Gegensatz dazu zeigten Studien, dass eine verbesserte Insulinsensitivität die LPL stimuliert, wodurch die Hydrolyse sowohl der endogenen als auch der exogenen TGRL erhöht wird [Duez et al., 2006; Chan et al., 2002a]. Ein anderer positiver Effekt konnte von James et al. dargelegt werden. In diesem Fall geht eine Gewichtsreduktion mit der Erhöhung des LDLR einher, wodurch sich die Clearance der VLDL- als auch CM-Remnants steigert [James et al., 2003]. Die hier aufgezeigten Mechanismen könnten demnach den Änderungen der Apo B-48-Konzentration zugrunde liegen. Allerdings lassen sie sich im Rahmen dieser Untersuchung nicht bestätigen.

#### Einfluss der Änderungen des Lipidprofils

Im Gegensatz zum Gewicht besteht eine signifikante Korrelation der Parameter des Lipidprofils mit Apo B-48. Aufgrund des sehr starken Zusammenhangs ist die Senkung des Apo B-48 durch Reduktion dieser Parameter zu erwarten. Statistisch lässt sich dies mit der durchgeführten multiplen Regressionsanalyse bestätigen, die eine unabhängige Korrelation zwischen Parametern des Lipidprofils und Nüchternkonzentrationen des Apo B-48 ergibt. So kann durch Veränderungen der Parameter TG und LDL-C am stärksten auf die Veränderungen von Apo B-48 eingewirkt werden.

#### Änderungen hinsichtlich der Verum- und Placebogruppe

In der Verum- und Placebogruppe konnte ebenfalls eine signifikante Senkung des Apo B-48 festgestellt werden. Der Vergleich der Differenz des Apo B-48 zwischen den beiden Gruppen zeigt einen statistischen Trend für eine größere Reduktion in der

Verumgruppe, was auf einen produktbezogenen Effekt hinweisen kann. Der dahinter liegende Mechanismus könnte aus der lipidadsorbierenden Wirkung des Polyglucosamins resultieren. Die Polyglucosamine vermindern die Resorption der Lipide [Kumar, 2000], wodurch gleichzeitig eine Senkung der Lipideinlagerung in die nascenten CM möglich ist. So würden kleinere Partikel entstehen, die schneller durch lipolytische Prozesse abgebaut werden können [Martins et al., 1996]. Die Größe der CM wird hauptsächlich durch die Zufuhr der TG bestimmt, weshalb eine fettarme Ernährung kleinere CM produziert [Martins et al., 1996]. Da die Placebogruppe gleichzeitig eine proteinreiche Formuladiät erhielt und somit auch weniger Fett aufnahm, lässt sich eine Produktion kleinerer CM vermuten, welche als reduzierte Konzentrationen des Apo B-48 messbar werden. Die Messung des Apo B-48 erscheint somit ein sinnvolle Maßnahme für die Überwachung der Effektivität einer lipidsenkenden Intervention.

## **5.7 Methodische Kritik**

Die durchgeführten Präzisionskontrollen ergaben einen Intra- und Inter-assay von 4,5% bzw. 9,9%. Letzteres weicht von Ergebnissen anderer Studien ab, die für den Inter-assay einen Wert zwischen 2,2% und 5,4% erzielten [Kinoshita et al., 2005; Tanimura et al., 2008].

Die Durchführungen eines ELISA Kits setzte jeweils sowohl die Verdünnung des Standards als auch der Proben voraus. Folglich können aufgrund von Pipettier- und Verdünnungsfehlern größere Schwankungsbreiten entstehen, welche eine mögliche Erklärung für die abweichenden Präzisionskontrollen darstellen. Aufgrund der dadurch resultierenden Konzentrationsunterschiede innerhalb der verschiedenen Platten lassen sich ebenfalls die hohen Standardabweichungen der Apo B-48-Konzentrationen vermuten. Eine routinierte Arbeitsweise könnte die Pipettier- und Verdünnungsfehler und somit die hohen Standardabweichungen reduzieren.

Die Dauer des Auftragens auf die Platten scheint, wie in den Ergebnissen gezeigt, einen Einfluss auf die Apolipoprotein B-48-Konzentrationen zu haben. Dies ist unverständlich, da eigentlich davon auszugehen ist, dass nach dem Auftragen der Probe nur das enthaltene Apo B-48 mit dem gebundenen Apo B-48 der Platte reagiert. Dennoch ist festzustellen, dass zu Beginn eine höhere Konzentration besteht als am

Ende. Es lässt sich demnach vermuten, dass die Reaktion scheinbar nicht abgeschlossen wird, obwohl die vorgegebene Inkubationszeit von einer Stunde abgelaufen ist. Dies wiederum erschwert die Aussage über die Validität der gemessenen Konzentrationen. Um diesen Zeitfaktor dennoch miteinzubeziehen wurden die Proben eines Probanden zu den jeweiligen Zeitpunkten  $t_0$  und  $t_{12}$  auf ähnliche Positionen der Platte aufgetragen. Da die Dauer des Auftrags immer ungefähr 40 – 45 Minuten betrug, entsprach dies in etwa der gleichen Inkubationszeit beider Proben.

Da es sich bei den hier untersuchten Proben um Rückstellproben aus dem Jahr 2010 handelt, sollte ebenfalls die längere Aufbewahrungszeit bedacht werden. Diese sowie auch die Bearbeitung der Proben können die immunogene Bindungsstelle des Apo B-48 beeinflussen, wodurch die Bindung am immobilisierten Antikörper erschwert wird [Jackson und Williams, 2004]. Letztlich ist festzuhalten, dass die Apo B-48-Konzentrationen nicht stark von Konzentrationen in bereits publizierten Studien abweichen und innerhalb des Schwankungsbereichs liegen. Folglich können bei übergewichtigen Personen mittels des gleichen ELISA Kits sehr ähnliche Konzentrationen zu dieser Probandengruppe erzielt werden [Oktozawa et al., 2008]. Innerhalb der Methoden zur Bestimmung der Apo B-48 Konzentrationen kann der Sandwich-ELISA eine einfache und quantitative Methode für eine routinemäßige Anwendung in der klinischen Praxis darstellen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten [Su et al., 2009].

## 6. Schlussbetrachtung

Ziel dieser Masterarbeit ist die Untersuchung der Frage, ob Apo B-48 als Risikomarker bei übergewichtigen Personen geeignet ist und welchen Einfluss eine Gewichtsreduktion auf die Konzentration hat. Zu diesem Zweck wurden die Apo B-48-Konzentrationen in einem Studienkollektiv mit übergewichtigen Probanden zum Zeitpunkt der Basis- und Abschlussuntersuchung nach drei Monaten bestimmt. Im Weiteren wurde Apo B-48 auf Zusammenhänge mit Parametern des Lipid- und Glukosestoffwechsels sowie innerhalb bereits etablierter Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen untersucht, um so ihre wechselseitigen Auswirkungen zu erforschen.

Die Ergebnisse zeigten erhöhte Apo B-48-Konzentrationen bei Übergewicht und bei zusätzlichen Störungen wie dem metabolischen Syndrom. Dies bestätigt vorherige Studienergebnisse und kann auf eine mögliche postprandiale Hyperlipidämie der Probanden hinweisen. Es ergaben sich ebenfalls starke Assoziationen zu den Lipidparametern TG, Gesamt-C und LDL-C. Dadurch lässt sich einerseits der Zusammenhang aufzeigen, dass die CM große Mengen der TG enthalten. Andererseits weist es auf eine Verbindung des intestinalen und hepatischen Lipoproteinstoffwechsels hin. Innerhalb dieser Untersuchung konnte kein Zusammenhang zwischen den erhöhten Apo B-48-Konzentrationen und Parametern des Glukosestoffwechsels festgestellt werden. Es muss daher ein insulinunabhängiger Mechanismus für die Apo B-48-Erhöhung in Betracht gezogen werden. Anhand der Ergebnisse lässt sich vermuten, dass bei Probanden mit einem höheren kardiovaskulären Risiko aufgrund ihrer vorliegenden Adipositas, Dyslipidämie, Insulinresistenz und Hypertonie auch die erhöhten Apo B-48-Konzentrationen einen Beitrag zur Erkennung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen anzeigen können. Die signifikante Senkung der Apo B-48-Konzentrationen wurde mittels eiweißreicher Formuladiät allein und in Kombination mit einem lipidbindenden Polyglucosamin erzielt. Diesbezüglich ließ sich die Reduktion des Apo B-48 auf eine Senkung der Parameter des Lipidprofils zurückführen und nicht aufgrund der resultierten Gewichtsreduktion. Apo B-48 könnte daher als Indikator zur Überwachung lipidsenkender Interventionen dienen. Davon ausgehend, dass hohe Apo B-48-Konzentrationen einen gestörten postprandialen Stoffwechsel andeuten, kann die signifikante Reduktion der Apo B-48-

Konzentration in Folge der Intervention Hinweise auf die Verbesserung der postprandialen Hyperlipidämie geben.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Frage „Risikomarker Apolipoprotein B-48?“ differenziert beantwortet werden muss. Anhand der Ergebnisse kann möglicherweise darauf geschlossen werden, dass Apolipoprotein B-48 bei vorliegender Adipositas, Dyslipidämie, Hypertonie und Insulinresistenz einen weiteren Risikomarker darstellt. Zusätzlich bietet Apolipoprotein B-48 als Bestandteil der intestinalen Lipoproteine Informationen zur Identifikation des Stoffwechsels der CM und CM-R. Diese Angaben werden innerhalb der derzeitigen Messungen des Lipidprofils nicht berücksichtigt. Ebenfalls scheint die verwendete Methode zur Messung des Apo B-48 für eine verbreitete Anwendung zur Erzielung reproduzierbarer Ergebnisse geeignet.

Für die Etablierung eines Risikomarkers müssen jedoch weitere Aspekte mit einbezogen werden. So fehlen beispielsweise noch genaue biologische Mechanismen, die das erhöhte kardiovaskuläre Risiko in Bezug auf Apo B-48 bzw. die Apo B-48-haltigen Lipoproteine erklären und wodurch eine Prognose der Erkrankung möglich wäre. Zur Beantwortung der Frage wäre letztlich die Durchführung einer prospektiven Kohortenstudie sinnvoll, die erhöhte Serumwerte des Apo B-48 als unabhängigen Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei übergewichtigen Personen darstellen kann.

## 7. Zusammenfassung

**Hintergrund und Ziel:** Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie viszerale Adipositas, Insulinresistenz oder das metabolische Syndrom sind mit der postprandialen Anreicherung intestinaler Lipoproteine assoziiert. Apolipoprotein (Apo) B-48 kann als fester Bestandteil der intestinalen Lipoproteine (Chylomikronen und Chylomikronen-Remnants) Hinweise auf einen gestörten postprandialen Stoffwechsel geben und wird als weiterer Marker für das kardiovaskuläre Risiko diskutiert. Ziel der Masterarbeit ist die Beurteilung der Frage, ob Apo B-48 einen Risikomarker bei übergewichtigen Personen darstellen kann.

**Material und Methode:** Die verwendeten Proben wurden aus der Studie: „Effektivität eines multifaktoriellen Konzeptes zur Gewichtsreduktion“ entnommen. Diese untersuchte den Einfluss einer eiweißreichen Formuladiät allein und in Kombination mit einem lipidbindenden Polyglucosamin. Im Rahmen der Masterarbeit erfolgte die Messung der Apo B-48-Konzentration ( $n = 120$ ) innerhalb des übergewichtigen Kollektivs mittels Sandwich-ELISA. Zudem soll der Beitrag von Apo B-48 innerhalb etablierter kardiovaskulärer Risikofaktoren und die interventionsbedingte Änderungen in Bezug auf Apo B-48 untersucht werden.

**Ergebnisse:** Innerhalb des übergewichtigen Kollektivs ist die Apo B-48-Konzentration signifikant höher bei Männern im Vergleich zu den Frauen ( $8,6 \pm 6,1 \mu\text{g/ml}$  vs.  $6,5 \pm 4,1 \mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0,029$ ) sowie bei Probanden mit metabolischem Syndrom ( $8,7 \pm 5,9 \mu\text{g/ml}$  vs.  $5,7 \pm 3,20 \mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0,006$ ). Zusätzlich zeigt sich bei Vorhandensein mehrerer kardiovaskulärer Risikofaktoren wie viszeraler Adipositas, Hypertonie, Dyslipidämie und Insulinresistenz eine gleichzeitig erhöhte Apo B-48-Konzentration. In Folge der Intervention sinkt Apo B-48 signifikant sowohl durch das lipidbindende Polyglucosamin ( $p = 0,000$ ) als auch durch die Formuladiät allein ( $p = 0,002$ ). Dabei haben Änderungen der Lipidparameter den stärksten Einfluss auf Veränderungen des Apo B-48.

**Schlussbetrachtung:** Die Untersuchungen zeigen, dass beim Auftreten von metabolischen Störungen und kardiovaskulären Risikofaktoren innerhalb dieses Studienkollektivs, Apo B-48 einen ergänzenden Beitrag zur Erkennung des Risikos leisten könnte. Zur Etablierung von Apo B-48 als Risikomarker ist letztlich die Durchführung von prospektiven Kohortenstudien sinnvoll.

## 8. Summary

**Background and Aim:** Cardiovascular risk factors like visceral obesity, insulin resistance or metabolic syndrome are associated with a postprandial accumulation of intestinal lipoproteins. Apolipoprotein (apo) B-48 is an integral part of intestinal chylomicron and chylomicron-remnant particles and reflects a delayed postprandial metabolism. Moreover, it is suggested that apo B-48 may help to detect cardiovascular risk. The aim of this thesis is to assess apo B-48 as additional marker of risk in overweight adults.

**Materials and methods:** The used samples results from a study, which examine the efficacy of a weight loss strategy using high-protein formula diet in combination with polyglucosamine a lipid adsorbing fiber. Within the framework of the thesis apo B-48 was quantified using a sandwich-ELISA. Additionally, the contribution of apo B-48 to risk factors and the effect of intervention on apo B-48 were analyzed.

**Results:** In this overweight sample fasting apo B-48 concentrations achieved higher significance in men than in women ( $8,6 \pm 6,1 \mu\text{g/ml}$  vs.  $6,5 \pm 4,1 \mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0,029$ ) and was elevated in patients with metabolic syndrome ( $8,7 \pm 5,9 \mu\text{g/ml}$  vs.  $5,7 \pm 3,20 \mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0,006$ ). In addition, apo B-48 increased because of established cardiovascular risk factors like visceral obesity, hypertension, insulin resistance and dyslipidemia. As a result of intervention, apo B-48 achieved a significant reduction due to both, polyglucosamine ( $p = 0,000$ ) and a formula diet alone ( $p = 0,002$ ). The reduction in serum apo B-48 was most associated with reduction of lipid parameters.

**Conclusion:** The intervention demonstrated that apo B-48 may help to detect subjects at risk, if metabolic disorders and cardiovascular risk factors exist. Finally, a prospective cohort study would be useful to establish apo B-48 as a maker for cardiovascular risk.

## 9. Literaturverzeichnis

**Adiels M**, Olofsson SO, Taskinen MR, Borén J. Overproduction of Very-low-Density Lipoprotein is a Hallmark of the Dyslipidemia in the Metabolic Syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2008; 28: 1225 -1236

**Alaupovic P**, Lee DM, McConathy WJ. Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. *Biochimica Biophysica Acta* 1971; 260: 689 - 707

**Alaupovic P**. The Concept of Apolipoprotein-defined Lipoprotein Families and Its Clinical Significance. *Current Atherosclerosis Reports* 2003; 5: 459 – 467

**Alipour A**, van Osstroom A JHHM, Izraeljan A, Verseyden C, Collins JM, Frayn KN, Plokker TWM, Elte JWF, Cabezas MC. Leucocyte Activation by Triglyceride-Rich Lipoproteins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2008; 28: 792 – 797

**Alipour A**, Valdivielso P, Elte JWF, Janssen HW, Rioja J, van der Meulen N, van Mechelen R, Njo TJ, González-Santos P, Rietveld AP, Cabezas MC. Exploring the value of apoB48 as a marker for atherosclerosis in clinical practice. *European Journal of Clinical Investigation* 2012; 42 (7): 702 - 708

**Alberti KG**, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr. Harmonizing the Metabolic Syndrome: a Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120: 1640 – 1645

**Assmann G**, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation* 2002; 105: 310 – 315

**Blackburn P**, Côté Mélanie, Lamarche B, Couillard C, Pascot A, Tremblay A, Bergeron J, Lemieux I, Després JP. Impact of Postprandial Variation in Triglyceridemia on Low-Density Lipoprotein Particle Size. *Metabolism* 2003; 52 (11); 1379 – 1386

- Bravo E**, Napolitano M, Botham KM. Postprandial Lipid Metabolism: The Missing Link between Life-Style Habits and the Increasing Incidence of Metabolic Disease in Western Countries? *The Open Translation Medicine Journal* 2010; 2: 1 – 13
- Brown ML**, Ramprasad MP, Umeda PK, Tanaka A, Kobayashi Y, Watanabe T, Shimoyamada H, Kuo W-L, Li R, Song R, Bradley WA, Gianturco SH. A macrophage receptor for apolipoprotein B48: Cloning, expression, and atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000; 97 (13): 7489 – 7493
- Brown ML**, Yui K, Smith JD, LeBoeuf RC, Weng W, Umeda PK, Li R, Song R, Gianturco SH, Bradley WA. The murine macrophage apoB-48 receptor gene (ApoB-48r):homology to the human receptor. *Journal of Lipid Research* 2002; 43: 1181 – 1191
- Chan DC**, Gerald FW, Barrett PHR, Mamo J. CL, Redgrave TG. Markers of Triglyceride-rich Lipoprotein Remnant Metabolism in Visceral Obesity. *Clinical Chemistry* 2002a; 48 (2): 278 – 283
- Chan DC**, Gerald FW, Barrett PHR, Martins IJ, James AP, Mamo JCL, Mori TA, Redgrave TG. Effect of atorvastatin on chylomicron remnant metabolism in visceral obesity: a study employing a new stable isotope breath test. *Journal of Lipid Research* 2002b; 43: 706 – 712
- Chan DC**, Gerald FW, Ng TWK, Yamashita S, Barrett PHR. Effect of weight loss on markers of triglyceride-rich lipoprotein metabolism in the metabolic syndrome. *European Journal of Clinical Investigation* 2008; 38 (10): 743 – 751
- Chan DC**, Pang J, Romic G, Watts GF. Postprandial Hypertriglyceridemia and Cardiovascular Disease: Current and Future Therapies. *Current Atherosclerosis Report* 2013; 15: 1 -9
- Cohn JS**, Johnson EJ, Millar JS, Cohn SD, Milne RW, Marcel YL, Russell RM, Schaefer EJ. Contribution of apoB-48 and apoB-100 triglyceride-rich lipoproteins (TRL) to postprandial increases in the plasma concentration of TRL triglycerides and retinyl esters. *Journal of Lipid Research* 1993; 34: 2033 – 2040
- Cooper AD**. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *Journal of Lipid Research* 1997; 38: 2173 – 2192
- Cornelli U**, Belcaro G, Cesarone MR, Cornelli M. Use of polyglucosamine and physical activity to reduce body weight and dyslipidemia in moderately overweight subjects. *Minerva Cardioangiologica* 2008; 56; 71 – 78

- Couillard C**, Bergeron N, Pascot A, Alm eras N, Bergeron J, Tremblay A, Prud'homme D, Despr es JP. Evidence for impaired lipolysis in abdominally obese men: postprandial study of apolipoprotein B-48- and B-100-containing lipoproteins. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2002; 76: 311 – 318
- Eckel RH**, Grundy CM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365: 1415 - 1428
- Dane-Stewart CA**, Watts GF, Barrett PHR, Stuckey BGA, Mamo JCL, Redgrave TG. Chylomicron remnant metabolism studied with a new breath test in postmenopausal women with and without type 2 diabetes mellitus. *Clinical Endocrinology* 2003; 58: 415 – 420
- Dane-Stewart CA**, Watts GF, Mamo JCF, Dimmitt SB, Barrett PHR, Redgrave TG. Elevated apolipoprotein B-48 and remnant-like particle-cholesterol in heterozygous familial hypercholesterolaemia. *European Journal of Clinical Investigation* 2001; 31: 113 – 117
- Domoto K**, Taniguchi T, Takaishi H, Takahashi T, Fujioka Y, Takahashi A, Ishikawa Y, Yokoyama M. Chylomicron remnants induce monocyte chemoattractant protein-1 expression via p38 MAPK activation in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2003; 171: 193 – 200
- Duez H**, Lamarche B, Uffelman KD, Valero R, Cohn JS, Lewis GF. Hyperinsulinemia is associated with increased production rate of intestinal apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in human. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2006; 26: 1357 – 1363
- Ford ES**, Li Chaoyang, Zhao G, Pearson WS, Mokdad AH. Hypertriglyceridemia and Its Pharmacologic Treatment Among US Adults. *Archives of Internal Medicine* 2009; 169 (6): 572 – 578
- Gianturco SH und Bradley WA**. Pathophysiology of Triglyceride-Rich Lipoproteins in Atherothrombosis: Cellular Aspects. *Clinical Cardiology* 1999; 22: 7 – 14
- Ginsberg HN**. New Perspective on Atherogenesis: Role of Abnormal Triglyceride-Rich Lipoprotein Metabolism. *Circulation* 2002; 106: 2137 – 2142
- Grundy SM**, Balady GJ, Criqui MH, Fletcher G, Greenland P, Hiratzka LF, Houston-Miller N, Kris-Etherton P, Krumholz H.M; LaRosa J, Ockene IS, Pearson TA, Reed J, Washington R, Smith SC. Primary prevention of coronary heart disease: guidance from

Framingham: a statement for healthcare professionals from AHA Task Force on Risk Reduction. American Heart Association. *Circulation* 1998; 97: 1876 – 1887

**Grundy SM**, Becker D, Clark, LT, Richard SC, Denke MA, Howard WJ, Hunninghake DB, Illingworth DR, Luepker RV, McBride P, McKenney JM, Pasternak RC, Stone NJ, Van Horn L. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) - Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). National Cholesterol Education Program Expert Panel 2001

**Grundy SM**. Pre-Diabetes, Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk. *Journal of the American College of Cardiology* 2012; 59 (7): 635 – 643

**Harbis A**, Perdreau S, Vincent-Baudry S, Charbonnier M, Bernard MC, Raccach D, Senft M, Lorec AM, Defoort C, Portugal H, Vinoy S, Lang V, Lairon D. Glycemic and insulinemic meal response modulates postprandial hepatic and intestinal lipoprotein accumulation in obese, insulinresistant subjects. *American Journal of Nutrition* 2004. 80: 896 – 902

**Hogue JC**, Lamarche B, Tremblay AJ, Bergeron J, Gagné C, Couture P. Evidence of increased secretion of apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in subjects with type 2 diabetes. *Journal of Lipid Research* 2007; 48: 1336 – 1342

**Hogue JC**, Lamarche B, Deshaies Y, Tremblay AJ, Bergeron J, Gagné C, Couture P. Differential effect of fenofibrate and atorvastatin on in vivo kinetics of apolipoprotein B-100 and B-48 in subjects with type 2 diabetes mellitus with marked hypertriglyceridemia. *Metabolism Clinical and Experimental* 2008; 57: 246 – 254

**Jackson KG und Williams CM**. Apolipoprotein B-48: comparison of fasting concentrations measured in normolipidemic individuals using SDS-Page, immunoblotting and ELIS. *Atherosclerosis* 2004; 176: 207 – 217

**James AP**, Watts GF, Barrett HR, Smith D, Pal S, Chan DC, Mamo JCL. Effect of Weight Loss on Postprandial Lipemia and Low-Density Lipoprotein Receptor Binding in Overweight Men. *Metabolism* 2003; 52 (2): 136 – 141

**James AP**, Watts GF, Mamo JCL. The effect of metformin and rosiglitazone on postprandial lipid metabolism in obese insulin-resistant subjects. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2005; 7 (4): 381 – 389

**Karpe F**. Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine* 1999; 246: 341 – 355

- Khossousi A**, Binns CW, Dhaliwal SS, Pal S. The acute effects of psyllium on postprandial lipaemia and thermogenesis on overweight and obese men. *British journal of Nutrition* 2008. 99 (5): 1068 – 1075
- Kinoshita M**, Kojima M, Matsushima T, Teramoto T. Determination of apolipoprotein B-48 in serum by a sandwich ELISA. *Clinica Chimica Acta* 2005; 351: 115 - 120
- Kinoshita M**, Ohnishi H, Maeda T, Yoshimura N, Takeoka Y, Yasuda D, Kusano J, Mashimo Y, Saito S, Shimamoto K, Teramoto T. Increased Serum Apolipoprotein B48 Concentration in Patients with Metabolic Syndrome. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2009; 16 (4): 517 – 522
- Klop B**, Proctor SD, Mamo JC, Botham KM, Cabezas MC. Understanding Postprandial Inflammation and Its Relationship to Lifestyle Behaviour and Metabolic Diseases. *International Journal of Vascular Medicine* 2011; 1 -11
- Kumar MR**. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers* 2000; 46: 1 – 27
- Laatsch A**, Merkel M, Talmud PJ, Grewal T, Beisiegel U, Heeren J. Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance. *Atherosclerosis* 2009; 204: 105 – 111
- Lairon D**, Play B, Jourdeuil-Rahmani D. Digestible and indigestible carbohydrates: interactions with postprandial lipid metabolism. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2007; 18: 217 – 227
- Lewis GF und Steiner G**. Acute effect of Insulin in the control of VLDL production in humans. Implications for the insulin resistant state. *Diabetes Care* 1996; 19: 390 - 393
- Lorec AM**, Juel C, Pafumi Y, Portugal H, Pauli AM, Lairon D, Deffort C. Determination of Apolipoprotein B-48 in Plasma by a Competitive ELISA. *Clinical Chemistry* 2000; 46 (10): 1638 – 1642
- Lovegrove JA**, Isherwood SG, Jackson KG, Williams CM, Gould BJ. Quantification of apolipoprotein B-48 in triacylglycerol-rich lipoproteins by a specific enzyme-linked immunosorbent assay. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; 1301: 221 – 229
- Mahley RW**, Innerarity TL, Rall SC JR, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *Journal of Lipid Research* 1984; 25: 1277 – 1294

- Mahley RW und Huang Y.** Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. *The Journal of Clinical Investigation* 2007; 117 (1): 94 – 89
- Mamo JC,** Elsegood CL, Umeda Y, Hirano T, Redgrave TG. Effect of probucol on plasma clearance and organ uptake of chylomicrons and VLDLs in normal and diabetic rats. *Thrombosis, and Vascular Biology* 1993; 13: 231 – 239
- Mamo JC,** Watts GF, Barrett HR, Smith D, James AP, Pal S. Postprandial dyslipidemia in men with visceral obesity an effect of reduced LDL receptor expression?. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 2001; 281: 626 – 632
- Martins IJ,** Mortimer BC, Miller J, Redgrave TG. Effects of particle size and number on the plasma clearance of chylomicrons and remnants. *Jorunal of Lipid Research* 1996; 37: 2696 - 2705
- Martins IJ und Redgrave TG.** Obesity and post-prandial lipid metabolism. Feast or famine?. *Journal of Nurtritional Biochemistry* 2004; 15: 130 – 141
- Masuda D,** Sugimoto T, Tsujii K, Inagaki MI, Nakatani K, Yuasa-Kawase M, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Nishida M, Ishigami M, Kawamoto T, Matsuyama A, Sakai N, Komuro I, Yamashita S. Correlation of fasting serum apolipoprotein B-48 with coronary artery disease prevalence. *European Journal of Clinical Investigation* 2012; 42 (9): 992 – 999
- Matthews DR,** Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412 - 419
- Max Rubner-Institut,** Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel. Nationale Verzehrsstudie II – Ergebnisbericht Teil 1 2008
- Mhurchu CN,** Poppitt SD, McGill AT, Leahy FE, Bennett DA, Lin RB, Ormdrod D, Ward L, Strik C, Rodgers A. The effect of the dietary supplement, Chitosan, on body weight: a randomized controlled trial in 250 overweight and obese adults. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 2004; 28: 1149 – 1156
- Nagata T,** Sugiyama D, Kise T, Tsuji S, Ohira H, Sato I, Yamamoto M, Kohsaka H, Kawano S, Yamashita S, Ishikawa Y, Fujioka Y. Fasting remnant lipoproteins can predict postprandial hyperlipidemia. *Lipids and Health and Disease* 2012; 11 (146): 1 - 11

**Nakatani K**, Sugimoto T, Masuda D, Okano R, Oya T, Monden Y, Yamashita T, Kawase R, Nakaoka H, Inagaki M, Yuasa-Kawase M, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Nishida M, Ishigami M, Komuro I, Yamashita S. Serum apolipoprotein B-48 levels are correlated with carotid intima-media thickness in subjects with normal serum triglyceride levels. *Atherosclerosis* 2011; 218: 226 – 232

**Nakano T**, Nakajima K, Niimi M, Fujita MQ, Nakajima Y, Takeichi S, Kinoshita M, Matsushima T, Teramoto T, Tanaka A. Detection of apolipoprotein B-48 and B-100 carrying particles in lipoprotein fractions extracted from human aortic atherosclerotic plaques in sudden cardiac death cases. *Clinica Chimica Acta* 2008; 390: 38 – 43

**Nordestgaard BG und Tybjerg-Hansen A**. IDL, VLDL, Chylomicrons and Atherosclerosis. *European Journal of Epidemiology* 1992; 8 (2): 92 - 98

**Otokozawa S**, Masumi A, Diffenderfer MR, Asztalos BF, Tanaka A, Lamon-Fava S, Schaefer EJ. Fasting and postprandial apolipoprotein B-48 levels in healthy, obese, and hyperlipidemic subjects. *Metabolism Clinical and Experimental* 2009; 58: 1536 – 1542

**Pal S**, Semorine K, Watts GF, Mamo J. Identification of Lipoproteins of Intestinal Origin in Human Atherosclerotic Plaque. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2003; 41 (6): 792 – 795

**Panarotto D**, Rémillard P, Bouffard L, Maheux P. Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in adipose tissue-specific manner. *European Journal of Clinical Investigation* 2002; 32: 84 – 92

**Park Y and Harris WS**. Omega-3 fatty acids supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. *Journal of Lipid Research* 2003; 44: 455 - 463

**Poirier P**, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer X, Eckel RH. Obesity and Cardiovascular Disease: Pathophysiology, Evaluation, and Effect of Weight Loss. *Circulation* 2006; 113: 898 – 918

**Proctor SD, Vine DF, Mamo JCL**. Arterial retention of apolipoprotein B48- and B100-containing lipoproteins in atherogenesis. *Current Opinion in Lipidology* 2002; 13: 1 - 10

**Proctor SD und Mamo JCL**. Retention of fluorescent-labelled chylomicron remnants within the intima of the arterial wall – evidence that plaque cholesterol may be derived from post-prandial lipoproteins. *European Journal of Clinical Investigation* 1998; 28: 497 – 503

- Pruneta-Deloche V**, Sassolas A, Dallinga-Thie GM, Berthez ne F, Ponsin G, Moulin P. Alteration in lipoprotein lipase activity bound to triglyceride-rich lipoproteins in the postprandial state in type 2 diabetes. *Journal of Lipid Research* 2004; 45: 859 - 865
- Redberg RF**, Benjamin EJ, Bittner V, Braun LT, Goff Jr. DC, Havas S, Labarthe DR, Limacher MC, Lloyd-Jones DM, Mora S, Pearson TA, Radford MJ, Smetana GW, Spertus JA, Swegler EW et al. ACCF/AHA 2009 Performance Measures for Primary Prevention of Cardiovascular Disease in Adults. *Journal of American College of Cardiology* 2009; 54 (14): 1365 – 1405
- Redgrave TG**. Chylomicron metabolism. *Biochemical Society Transaction* 2004; 32 (1): 79 – 81
- Redgrave TG**. Chylomicrons in disease-future challenges Invited keynote address. *Atherosclerosis Supplements* 2008; 9: 3-6
- Sakai N**, Uchida Y, Ohasi K, Hibuse T, Saika Y, Tomari Y, Kihara S, Hiraoka H, Nakamura T, Ito S, Yamashita S, Matsuzawa Y. Measurement of fasting serum apoB-48 levels in normolipidemic and hyperlipidemic subjects by ELISA. *Journal of Lipid Research* 2003; 44: 1256 – 1262
- Sarwar N**, Danesh J, Eriksdotti G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt M, Khaw KT, Gudnason V. Triglycerides and the Risk of Coronary Heart Disease – 10 158 Incident Cases Among 262 525 Participants in 29 Western Prospective Studies. *Circulation* 2007; 115: 450 – 458
- Schmidt S**, Willers J, Stahl F, Mutz KO, Scheper T, Hahn A, Schuchardt JP. Regulation of lipid metabolism-related gene expression in whole blood cells of normo- and dyslipidemic men after fish oil supplementation. *Lipids in Health and Disease* 2012; 11 (172): 1 – 10
- Segrest JP**, Jones MK, Loof HD, Dashti N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *Journal of Lipid Research* 2001; 42: 1346 - 1367
- Slivkoff-Clark KM**, James AP, Mamo JCL. The chronic effects of oil with exercise on postprandial lipaemia and chylomicron homeostasis in insulin resistant viscerally obese men. *Nutrition and Metabolism* 2012; 9 (9): 1 - 9
- Smith D**, Watts GF, Dane-Stewart C, Mamo JCL. Post-prandial chylomicron response may be predicted by a single measurement of plasma apolipoprotein B48 in the fasting state. *European Journal of Clinical Investigation* 1999; 29: 204 – 209

- Stern SE**, Williams K, Ferrannini E, DeFronzo RA, Bogardus C, Stern MP. Identification of Individuals With Insulin Resistance Using Routine Clinical Measurements. *Diabetes* 2005; 54: 333 – 339
- Su JW**, Nzekwu MMU, Cabezas MC, Redgrave T, Proctor SD. Methods to assess impaired post-prandial metabolism and the impact for early detection of cardiovascular risk. *European Journal of Clinical Investigation* 2009; 39 (9): 741 – 754
- Subramanian S und Chait A**. Hypertriglyceridemia secondary to obesity and diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1821: 819 – 825
- Tam SP**, Dory L, Rubinstein D. Fate of apolipoproteins C-1, C-iii, and E during lipolysis of human very low density lipoproteins in vitro. *Journal of Lipid Research* 1981; 22: 641 – 651
- Tanimura K**, Nakajima Y, Nagao M, Ishizaki A, Kano T, Harada T, Okajima F, Sudo M, Tamura H, Ishii S, Sugihara H, Yamashita S, Asai A, Oikawa S. Association of serum apolipoprotein B48 level with the presence of carotid plaque in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2008; 81: 338 – 344
- Tomkin GH und Owens D**. The Chylomicron: Relationship to Atherosclerosis. *International Journal of Vascular Medicine* 2011; 2012: 1 – 13
- Torres JL und Ridker MP**. Clinical use of high sensitivity C-reactive protein for the prediction of adverse cardiovascular events. *Current Opinion in Cardiology* 2003; 18: 471 – 478
- Uchida Y**, Kurano Y, Ito S. Establishment of Monoclonal Antibody Against Human Apo B-48 and Measurement of Apo B-48 in Serum by ELISA Method. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 1998; 12: 289 – 292
- Vine DF**, Takechi R, Russell JC, Proctor SD. Impaired postprandial apolipoprotein-B48 metabolism in the obese, insulin-resistant JCR:LA-cp rat: increased atherogenicity for the metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 2007; 190 (2): 282 – 290
- Volek JF**, Sharman MJ, Gómez AL, DiPasquale C, Roti M, Pumerantz A, Kraemer WJ. Comparison of a Very Low-Carbohydrate and Low-Fat Diet on Fasting Lipids, LDL Subclasses, Insulin Resistance, and Postprandial Lipemic Responses in Overweight Women. *Journal of American College of Nutrition* 2004; 23 (2): 177 -184
- Wallace TM**, Levy JC, Matthews DR. Use and Abuse of HOMA Modeling. *Diabetes Care* 2004; 27 (6): 1487 – 1495

**Weintraub MS**, Grosskopf I, Rassin T, Miller H, Charach G, Rotmensch HH, Liron M, Rubinstein A, Laina A. Clearance of chylomicron remnants in normolipidaemic patients with coronary artery disease: case control study over three years. *British Medical Journal* 1996; 312: 936 - 939

**Whitlock G**, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins P, Peto R et al. (Prospective Studies Collaboration). Body-Mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet* 2009; 373: 1083 - 1096

**Whitworth JA**, World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group. WHO / International Society management of hypertension. *Journal of Hypertension* 2003; 11: 1983 – 1992

**Willers J**, Plötz SC, Hahn A. The Combination of a High-protein Formula diet and Polyglucosamine Decreases Body Weight and Parameters of Glucose and Lipid Metabolism in Overweight and Obese Men and Women. *European Journal of Food Research & Review* 2012; 2(1): 29-45

**Yamamoto A**. A Unique Antilipidemic Drug-Probucol. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2008; 15 (6): 304 – 305

### **Bücher:**

**Biesalski KH und Grimm P**. Die Nährstoffe: Lipide in Taschenatlas Ernährung, 4. Auflage 2007, Thieme

**Clark DP**, Pazdernik N. Molekulare Biotechnologie – Grundlagen und Anwendungen. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2009

**Halwachs-Baumann G**. Labormedizin Klinik – Praxis – Fallbeispiele. Springer Verlag Wien New York 2011, 2. Auflage

**Kostner GM**, Schnarnagl H, Kostner K, März W. Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine in Schwandt P. und Parhofer KG. Handbuch der Fettstoffwechselstörung, 3. Auflage 2006, Schattauer Verlag

**Matissek R**, Steiner G, Fischer M. Lebensmittelanalytik. Springer Verlag 2010, 4. Auflage

**Thiery J und Teupser D**. Oxidierte Low-Density-Lipoproteine und Atherogenese in Schwandt P. und Parhofer KG. Handbuch der Fettstoffwechselstörung, 3. Auflage 2006, Schattauer Verlag

**Thiery J**, Teupser D, Fiedler M. Fettstoffwechsel und Herzmuskel in Renz H. Praktische Labordiagnostik, 2010, Verlag de Gruyter

**Internet:**

Statistik Austria:

[http://www.statistik.at/web\\_de/statistiken/gesundheit/todesursachen/todesursachen\\_ausgewaehlte/index.html](http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/todesursachen/todesursachen_ausgewaehlte/index.html)

[https://www.statistik.at/web\\_de/statistiken/gesundheit/gesundheitsdeterminanten/bmi\\_body\\_mass\\_index/index.html](https://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/gesundheitsdeterminanten/bmi_body_mass_index/index.html)

## 10. Anhang

Tabelle A: Änderung der Lipidparameter nach der 12-wöchiger Intervention bei Männern und Frauen

	Triglyceride [mg/dl]		p*		Gesamtcholesterin [mg/dl]		p*		LDL-Cholesterin [mg/dl]		p*		HDL-Cholesterin [mg/dl]		p*		
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
t <sub>0</sub>	208 ± 142	142 ± 75	243 ± 46	239 ± 42	155 ± 37	152 ± 36	50 ± 11	59 ± 12									
t <sub>12</sub>	142 ± 67	127 ± 58	229 ± 50	232 ± 39	147 ± 41	149 ± 35	52 ± 12	57 ± 10	0,025								
Δ t <sub>12</sub> - t <sub>0</sub>	-29 ± 56	-13 ± 53	-8 ± 31	-10 ± 31	-6 ± 25	-5 ± 23	2 ± 6	-2 ± 7	0,005								
p** t <sub>12</sub> - - t <sub>0</sub>	0,001**	0,043	0,074	0,026	0,126	0,127	0,031	0,059									

\*Mann-Whitney-U-Test bzw. T-Test bei unabhängigen Stichproben; \*\*Wilcoxon-Test bzw. T-Test bei gepaarten Stichproben; M: Männer, F: Frauen

Tabelle B: Spearman Korrelationskoeffizienten der Apolipoprotein B-48 Differenz mit Differenzen und Ausgangswerten von Parametern des Lipidprofils

Parameter	TG [mg/dl]	Diff.	Gesamt -C		Diff. Gesamt		LDL-C		Diff. LDL-C		HDL-C		Diff. HDL-C	
			[mg/dl]	[mg/dl]	-C [mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]	[mg/dl]	
Diff.	-0,386**	0,460**	-0,270**	0,374**	-0,237*	0,286**	0,197	-0,009						
Apo B-48 [µg/ml]														

\*\*p < 0,01; \* p < 0,05; TG: Triglyceride; LDL-C: Low-density-lipoprotein, HDL-C: high-density-lipoprotein

Tabelle C: Apolipoprotein B-48 Konzentrationen – Ergebnisse von Studien

Referenz	Methode	Probanden	n (M / F)	Apo B-48 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	p
Chan et al., 2002a	SDS-Page	Nicht-Übergewichtig	10 / 0	12,3 $\pm$ 2,8	< 0,001
		Übergewichtig	48 / 0	24,3 $\pm$ 8,8	
		Kein Typ 2 Diabetes	0 / 60	13,0 $\pm$ 0,9	
Dane-Stewart et al., 2003	Western-Blot	Typ 2 Diabetes	0 / 60	16,4 $\pm$ 1,2	-
		Kombinierte Hyperlipidämie Übergewichtig	5 / 4 30/33	17,9 $\pm$ 0,47 8,2 [0,53 – 1,41]	- -
Kinoshita et al., 2009	Sandwich ELISA	Metabolisches Syndrom JA	125/78	2,5 (2,17 – 2,88)/ 2,19 (1,86 – 2,59)	<0,0001
		Metabolisches Syndrom NEIN	397/ 741	1,76 (1,65 – 1,89) / 1,64 (1,57 – 1,72)	
Eigene Untersuchung	Sandwich ELISA	Übergewichtige Männer	59	8,6 $\pm$ 6,1	0,029
		Übergewichtige Frauen	61	6,5 $\pm$ 4,1	
		Metabolisches Syndrom JA	47/29	8,7 $\pm$ 5,9	
		Metabolisches Syndrom NEIN	12/32	5,7 $\pm$ 3,20	
		Kombinierte Hyperlipidämie	6/4	6,5 $\pm$ 3,3	0,261

M / F: Männer / Frauen; SDS-Page: sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis, kombinierte Hyperlipidämie: LDL-Cholesterin > 130 mg/dl und TG > 150 mg/dl; (Konfidenzintervall); [interquartiler Bereich]

**Tabelle D: Korrelationen von Apolipoprotein B-48 mit verschiedenen Parametern**

Referenz	Korrelationen von Apo B-48 mit	Korrelationskoeffizient	p
Kinoshita et al.; 2009	Triglyceriden [mg/dl]	Männer : 0,53; Frauen: 0,48	keine Angabe
	Cholesterin [mg/dl]	Männer : 0,24; Frauen: 0,20	
	HDL-C [mg/dl]	Männer : -0,18; Frauen: -0,15	
	HOMA-Index	Männer : 0,51 Frauen: 0,43	
Alipour et al.; 2012	Triglyceride [mg/dl]	0,69	< 0,001
	nüchtern Glukose [mg/dl]	0,21	0,040
	Taillenumfang	0,38	0,009
	Intima-Media-Dicke	0,52	< 0,001
Eigene Untersuchung	Triglyceride [mg/dl]	Männer : 0,69 Frauen: 0,38	< 0,001 0,003
	Cholesterin [mg/dl]	Männer : 0,45 Frauen: 0,39	< 0,001 0,002
	LDL-C [mg/dl]	Männer : 0,41 Frauen: 0,31	0,010 0,002
	HOMA-Index	Frauen: 0,291	0,029
	Insulin [uE/ml]	Frauen: 0,30	0,018

## **Mein Dank gilt...**

...in erster Linie Herrn Prof. Dr. Andreas Hahn, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Masterarbeit zu diesem Thema zu schreiben.

...Frau Dr. Janina Willers, die sich immer die Zeit nahm meine Fragen zu beantworten, um an der Entstehung der Arbeit mitzuwirken.

...Herrn Dr. Jan Philipp Schuchardt für die tatkräftige Hilfestellung bei der Korrektur dieser Arbeit.

... Frau Heike Kohrs für die Unterstützung während der Zeit des praktischen Arbeitens im Labor.

... letztlich der gesamten Arbeitsgruppe für die Hilfe, die Fragen zwischendurch und das sehr nette und freundliche Arbeitsklima.



