

Aus der Klinik für Kardiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Individuelle Unterschiede
in der immunometabolischen Reaktion auf Training
bei Patienten und Patientinnen mit Metabolischem Syndrom

Individual Differences
in the Immunometabolic Reaction to Exercise Training
in Patients with Metabolic Syndrome

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sylvia Kia
aus Berlin

Datum der Promotion: 03.12.2021

Meinem Vater

Vorwort

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotionsarbeit

Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen präsentiert:

- 85. Jahrestagung der DGK in Mannheim, April 2019: Freier Vortrag
 - Exercise intensity and volume differentially impact on innate and adaptive immunity in patients with metabolic syndrome
*K. Lechner, P. von Korn, **S. Kia**, A. Duvinage, J. Scherr, U. Landmesser, M. Halle, N. Kränkel (presenting author)*
- Young-DZHK-Retreat in Potsdam, September 2019: Rapid Fire Talk
 - Exercise intensity and volume differentially impact on innate and adaptive immunity in patients with metabolic syndrome
***S. Kia** (presenting author), K. Lechner, P. von Korn, A. Duvinage, J. Scherr, U. Landmesser, M. Halle, N. Kränkel*
- ESC Congress 2019 in Paris, September 2019: Posterpräsentation
 - Temporal analysis of leukocyte extravasation and morphological activation after standard cardiopulmonary exercise testing in patients with heart failure with reduced ejection fraction
*M. Bahls, **S. Kia**, S. Kaczmarek, K. Lehnert, I. Urbaneck, U. Landmesser, S.E. Felix, M. Doerr, N. Kraenkel (presenting author)*
- DGK Herztage in Berlin, Oktober 2019: Posterpräsentation
Nominierung zum Sven-Effert-Posterpreis
 - Co-regulation of immune parameters by exercise training in patients with metabolic syndrome
*K. Lechner, P. von Korn, **S. Kia** (presenting author), A. Duvinage, J. Scherr, U. Landmesser, M. Halle, N. Kränkel*
- ESC Congress 2020 – The Digital Experience, August 2020: ePosterpräsentation
 - Inter-individual differences in the response to an exercise training intervention in patients with metabolic syndrome
*P. von Korn, **S. Kia**, K. Lechner, A. Duvinage, J. Scherr, U. Landmesser, M. Halle, N. Kränkel (presenting author)*

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	5
Inhaltsverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	10
Abbildungsverzeichnis	12
Tabellenverzeichnis	13
Abstract (deutsch)	14
Abstract (english).....	16
1 Einleitung	18
1.1 Metabolisches Syndrom	18
1.2 Kardiovaskuläre Folgen des Metabolischen Syndroms	21
1.3 Mikrovesikel und ihre Rolle bei Metabolischem Syndrom	23
1.4 Therapieoptionen beim Metabolischen Syndrom.....	23
1.5 Einfluss von Training auf das Metabolische Syndrom	23
1.6 Training und Inflammation	25
1.7 Resolution der Inflammation	26
1.8 Ziel der Arbeit	28
2 Material	30
2.1 Geräte.....	30
2.2 Programme	30
2.3 Gefäße und Werkzeuge.....	30
2.4 Chemikalien	31
3 Methoden	33
3.1 Studiendesign und Patient:innenkollektiv	33
3.2 Untersuchung und Probengewinnung.....	37
3.3 Leukozytencharakterisierung	38
3.3.1 Färbung der Leukozyten	38
3.3.2 Messung der Leukozyten	38

3.3.3 Gating der Leukozyten.....	39
3.4 Charakterisierung der MV	42
3.4.1 Färbung der MV.....	42
3.4.2 Gating der MV	44
3.5 Zytokinmessung mittels Cytometric Bead Assay	44
3.6 Untersuchung der Differenzierung von THP1-Zellen zu Makrophagen unter dem Einfluss von Plasma	47
3.7 Proximity Extension Assay: Bestimmung der Plasmaproteine	50
3.8 Statistische Auswertung.....	50
4 Ergebnisse	53
4.1 Die individuelle Verbesserung der VO ₂ peak ist kein Indikator für die Verbesserung des MetS	53
4.2 Individuelle Verbesserungen kardiometabolischer Zielparameter sind mit der Anzahl und Aktivierung von Leukozyten sowie der Plasmaproteinkonzentrationen assoziiert.	56
4.2.1 Veränderungen der Anzahl und Aktivierung von Leukozyten.....	56
4.2.2 Veränderungen der Plasmaproteinkonzentrationen.....	59
4.3 Durch das kardiometabolische Outcome lassen sich drei verschiedene Cluster von Patient:innen identifizieren.....	61
4.3.1 MetS-Cluster 1	61
4.3.2 MetS-Cluster 2	63
4.3.3 MetS-Cluster 3	66
5 Diskussion	71
5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse	71
5.2 Die individuelle Verbesserung der VO ₂ peak ist kein Indikator für die Verbesserung des MetS	71
5.3 Individuelle Verbesserungen kardiometabolischer Zielparameter sind mit der Anzahl und Aktivierung von Leukozyten sowie der Plasmaproteinkonzentrationen assoziiert	72
5.3.1 Veränderungen der Leukozyten von Baseline zu Follow-up über die gesamte Kohorte	72
5.3.2 Korrelationen der Leukozyten zu klinischen Parametern auf individueller Ebene.....	75

5.3.3 Veränderungen der Plasmaproteinkonzentrationen von Baseline zu Follow-Up über die gesamte Kohorte	77
5.3.4 CES1: Veränderung zum Follow-Up und Korrelationen.....	78
5.3.5 IL-7R (subunit alpha): Veränderung zum Follow-Up und Korrelationen.....	79
5.3.6 Makrophagen: Veränderung zum Follow-Up und Korrelationen	79
5.4 Durch das kardiometabolische Outcome lassen sich drei verschiedene Cluster von Patient:innen identifizieren	80
5.4.1 Klinische Unterschiede der Cluster	80
5.4.2 Immunometabolische Unterschiede der Cluster	81
5.5 Limitationen	83
5.5.1 Limitationen durch das Studiendesign.....	83
5.5.2 Limitationen bei der Analyse der T-Zell-Subpopulationen	83
5.6 Schlussfolgerung und Ausblick.....	84
Literaturverzeichnis	86
Eidesstattliche Versicherung	109
Lebenslauf.....	110
Publikationsliste.....	112
Danksagung	113
Bescheinigung über Statistikberatung	114

Abkürzungsverzeichnis

ACD	Acid Citrate Dextrose/Glucose
AHA	American Heart Association
BL	Baseline
BMI	Body Mass Index
CBA	Cytometric Bead Assay
CD	Cluster of Differentiation
CES1	Carboxylesterase 1
CSB	Cells Staining Buffer (Zellfärbepuffer)
CVD	Cardiovascular Disease (Kardiovaskuläre Krankheiten)
ET	Exercise Training
FCS	Fetales Kälberserum
FMO	Fluorescence minus one
FSC	forward scatter
FU	Follow Up
HDL	High-density Lipoprotein
HIIT	hoch-intensives Intervalltraining
HRmax	Heart rate maximum (Maximale Herzfrequenz)
HRreserve	Heart rate reserve (Herzfrequenzreserve)
IDF	Internationale Diabetes Federation
IFN- γ	Interferon γ
IL	Interleukin
IL-7R	Interleukin-7-Rezeptor
LDL	Low-density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
MCT	moderate continuous Training (moderates kontinuierliches Training)
MetS	Metabolisches Syndrom
miRNA	Mikro-Ribonukleinsäure

MTX	Methotrexat
MV	Mikrovesikel
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease (nicht-alkoholische Fettlebererkrankung)
NPG	Nüchternplasmagluucose
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (Pufferlösung)
PEA	Proximity Extension Assay
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol 12-Myristat-13-Acetat-Lösung
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
SSC	sidewards scatter
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TG	Triglyzeride
TGRL	Triglyzeridreiche Lipoproteine
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
tSNE	t-stochastic neighbourhood embedding
VLDL	Very-low-density Lipoprotein
VO ₂ max	Maximale Sauerstoffaufnahme bei Ausbelastung
VO ₂ peak	Sauerstoffaufnahme bei maximal erreichter Belastung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Fragestellung und des Studiendesigns. ..	29
Abbildung 2: Ein- und Ausschluss der Patient:innen bei ExMET	34
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Studiendesigns von OptimEx und ExMET36	
Abbildung 4: Exemplarisches Gating der Leukozytensubpopulationen.	40
Abbildung 5: Gatingstrategien zur Definition der Subpopulationen der CD4 ⁺ -T-Zellen. 41	
Abbildung 6: Exemplarisches Gating der MV der Thrombozyten, Endothelzellen und Leukozytensubpopulationen.	43
Abbildung 7: Repräsentative Gates der Zytokine im Plasma mit Kaluza analysis.	46
Abbildung 8: Verteilung der THP-1-Proben auf 12-Well-Platten.	47
Abbildung 9: Repräsentatives Gating der polarisierten Makrophagen	49
Abbildung 10: Biomarker des „Olink cardiometabolic panels“	51
Abbildung 11: Veränderungen der MetS Parameter bei ExMET über die gesamte Kohorte von Baseline zu Follow-Up	54
Abbildung 12: Veränderungen der MetS-Parameter und deren Korrelationen mit Spearman's r.	55
Abbildung 13: Veränderungen der Immunzellen über die Trainingsperiode.	57
Abbildung 14: Korrelationen mit Spearman's r absoluter Werten beider Messzeitpunkte zwischen MetS- und Leukozytenparametern.	58
Abbildung 15: Veränderungen der Plasmaproteine nach ExMET-Training und Korrelationen mit Spearman's r zwischen klinischen Parametern, Leukozyten und Plasmaproteinen.	60
Abbildung 16: Clusteranalyse mit tSNE der erweiterten ExMET-OptimEx-Kohorte.	62
Abbildung 17: Vergleich der Absolutwerte beider Messzeitpunkte der immunometabolischen Parameter aus durchflusszytometrischen Messungen sowie PEA der drei Cluster.	64
Abbildung 18: Vergleich der Trainingsadhärenz der ExMET-Kohorte.....	66
Abbildung 19: Vergleich von IL-7R und CES1 zwischen den drei Clustern.	68
Abbildung 20: Vergleich der Veränderungen der immunometabolischen Parameter aus durchflusszytometrischen Messungen sowie PEA der drei Cluster.	69
Abbildung 21: Zusammenfassung der immunometabolischen Charakterisierung der drei definierten MetS-Cluster.	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Metabolisches Syndrom: Definition nach IDF 2006	18
Tabelle 2: Zusammenfassung der Rolle der untersuchten Leukozyten bei chronischer Inflammation	22
Tabelle 3: Basale Charakteristika der 24 randomisierten ExMET-Patient:innen.....	35
Tabelle 4: Übersicht der gemessenen Zytokine mit ihrem Ursprung und ausgewählter Wirkungen	45
Tabelle 5: Makrophagenpolarisierung durch Zytokine und charakteristische Oberflächenmarker.....	48
Tabelle 6: Verteilung der Medikamenteneinnahme in den verschiedenen Clustern bei Baseline (BL) und Follow-Up (FU).....	67
Tabelle 7: Prozentuale Verteilung der Patient:innen der Trainingsgruppen auf die drei Cluster.....	67

Abstract (deutsch)

Hintergrund: Die Prävalenz des Metabolischen Syndroms (MetS) als kardiovaskuläres Risikocluster basierend auf einem chronisch inflammatorischen Status steigt weltweit an. Regelmäßiges physisches Training zeigte positive Effekte auf das kardiovaskuläre Outcome. Indes ist nicht hinreichend geklärt, welche Trainingsprotokolle zu empfehlen sind und wie dadurch das immunometabolische Profil beeinflusst wird.

Methodik: Bei 24 Patient:innen mit MetS, die im Rahmen der Studie ExMET für vier Monate drei verschiedene Trainingsprogramme absolvierten, erfolgte die vergleichende Charakterisierung des immunometabolischen Profils. Randomisiert in drei Gruppen wurde entweder ein Protokoll mit moderatem kontinuierlichen Training mit hohem Volumen (MCT), Training hoher Intensität und niedrigem Volumen (loHIIT) oder hoher Intensität und hohem Volumen (hiHIIT) befolgt. MetS-definierende Kriterien wie Taillenumfang, Blutdruck, Triglyzeride (TG), High-density Lipoprotein (HDL) und Nüchternplasmaglucoase (NPG) sowie die physische Fitness wurden zu Beginn und nach 16 Wochen Training gemessen. Der inflammatorische Status wurde durch die durchflusszytometrische Messung der Anzahl und Morphologie der Leukozyten sowie Markern ihrer Aktivität beurteilt. Plasmaproteine mit kardiometabolischer Relevanz wurden mittels Proximity Extension Assay bestimmt. Die statistischen Analysen des klinischen Outcomes erfolgten anhand einer erweiterten Studienpopulation durch 38 Patient:innen mit MetS der Studie OptimEx, die entweder 12 Wochen MCT oder hiHIIT absolvierten.

Ergebnisse: Physische Fitness, nicht aber zentrale Adipositas oder andere MetS-definierende Faktoren, zeigte eine signifikante Verbesserung nach der 4-monatigen Trainingsperiode der ExMET-Kohorte ohne Unterschiede durch die Trainingsprotokolle. In der OptimEx-Kohorte verbesserten sich zusätzlich NPG, TG, HDL und der Taillenumfang. Die Verbesserung der VO₂peak im Laufe des Trainings war nicht mit kardio-metabolischen Verbesserungen assoziiert und kann so nicht als Indikator zur Verbesserung des MetS dienen. Vielmehr zeigte sich, dass individuelle Verbesserungen der klinischen Faktoren des MetS mit Anzahl und Aktivierungsstatus von Leukozyten sowie Plasmakonzentrationen kardiometabolisch relevanter Proteine assoziiert sind. Die Anzahl und der Aktivierungsstatus der Immunzellen war nach der Trainingsperiode verändert. Die Antwort der erweiterten MetS-Kohorte erlaubte die Identifikation von drei Clustern, die sich durch immunometabolische Profile definieren:

Cluster 1 mit der geringsten Krankheitslast, Cluster 2 als hyperlipidämisches und Cluster 3 als hyperglykämisches Cluster. In jedem Cluster wurden verschiedene Antwortmuster identifiziert.

Schlussfolgerung: Individuelle immunometabolische Profile könnten die Antwort auf physisches Training determinieren. Die identifizierten Muster betonen die Bedeutung einer genauen Einschätzung der Patient:innen, um optimierte personalisierte Therapien empfehlen zu können.

Abstract (english)

Background: The prevalence of Metabolic Syndrome (MetS) as a cluster of cardiovascular risk factors based on a chronic inflammatory status keeps increasing worldwide. Regular physical exercise training has shown positive effects on the cardiovascular outcome. However, which training protocols should be recommended and how they influence the immunometabolic profile is not clear.

Methods: In 24 patients with MetS participating in the ExMET study, who performed 4 months of 3 different exercise training programmes, the comparing characterisation of immunometabolic profiles was conducted. Randomised into one of three groups patients followed either a moderate continuous training protocol (MCT), low volume-high intensity interval training (loHIIT) or high volume high intensity interval training (hiHIIT) protocols. MetS-defining criteria including waist circumference, blood pressure, triglycerides (TG), high-density-lipoprotein (HDL) and fasting glucose as well as physical fitness were assessed at baseline and after 16 weeks of training. The inflammatory status was assessed by flow cytometric measurements of leucocyte counts, morphology and markers of activation. Plasma proteins with cardiometabolic relevance were measured by proximity extension assay. Statistical analysis of the clinical outcome was performed using an extended population including 38 patients with MetS from the OptimEx study, who performed either MCT or hiHIIT for 12 weeks.

Results: Physical fitness, but not central obesity or other MetS-defining characteristics significantly improved during the 4-months exercise period in the ExMET cohort. In the OptimEx cohort, also fasting glucose, TG, HDL and the waist circumference improved. Training-associated improvement of VO_2 peak was not associated with cardiometabolic improvements, so it cannot be used as an indicator for the improvement of MetS. In fact, individual improvements of MetS-criteria were associated with the count and status of activation of leucocytes as well as plasma concentrations of proteins with cardiometabolic relevance. However, the count and status of activation of leucocytes was changed after the exercise training period. Responses within the expanded MetS cohort allowed the identification of three clusters: Cluster 1 with the lowest disease burden, cluster 2 as a hyperlipidemic and cluster 3 as hyperglycemic cluster. Within each cluster, different response patterns were identified.

Conclusion: Individual immunometabolic profiles might determine the response to exercise training. The identified patterns underline the importance of a profound patient assessment to recommend optimised personalised therapies.

1 Einleitung

1.1 Metabolisches Syndrom

Das Metabolische Syndrom (MetS) ist ein Komplex aus interagierenden kardiovaskulären Risikofaktoren, der mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung kardiovaskulärer Krankheiten (cardiovascular diseases, CVD) und Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) einhergeht (1, 2). CVD bleiben weltweit eine große Belastung und eine der Haupttodesursachen mit etwa 422,7 Millionen Krankheitsfällen und 17,92 Millionen Todesfällen im Jahr 2015 (3). 2017 waren etwa 425 Millionen Menschen zwischen 20 und 79 Jahren an T2DM erkrankt. Bis 2045 soll diese Zahl auf 629 Millionen steigen (4). Die genaue Prävalenz des MetS selbst ist nicht eindeutig, da die Kriterien je nach Gesellschaft und Land leicht variieren, geschätzt wird sie auf über 20 % weltweit (5). Nach einer gemeinsamen Definition der International Diabetes Federation (IDF), dem National Heart, Lung and Blood Institute, der American Heart Association (AHA) u.a. von 2009 ist das MetS definiert als ein Symptomkomplex aus mindestens drei der folgenden fünf Kriterien: Erhöhter Taillenumfang, erhöhte Triglyzeride (TG), erniedrigtes High-density Lipoprotein (HDL), erhöhter Nüchternplasmaglukose (NPG) oder arterielle Hypertonie (2). Die genauen Grenzwerte unterscheiden sich hier je nach Region (2).

Tabelle 1: **Metabolisches Syndrom: Definition nach IDF 2006** (6)

Zentrale Adipositas	Taillenumfang > 94 cm (m), > 80 cm (w) oder BMI > 30 kg/m ²
plus mind. zwei der folgenden Kriterien	
Triglyzeride	> 150 mg/dL oder Therapie
HDL Cholesterol	< 40 mg/dL (m), < 50 mg/dL (w) oder Therapie
Blutdruck	Systolisch > 130 mmHg oder diastolisch > 85 mmHg
Nüchternplasmaglukose	> 100 mg/dL oder diagnostizierter T2DM

Die IDF stellt nach ihrer Definition von 2006 die abdominelle Adipositas mit einem Taillenumfang über 94 cm bei Männern und 80 cm bei Frauen oder einen BMI über 30 kg/m² in Europa als zentralen Faktor mit mindestens zwei von vier weiteren Faktoren des MetS dar (6). Diese Definition wurde in dieser Arbeit bei der Auswahl der Probanden berücksichtigt (Tabelle 1).

Das MetS entsteht als Folge einer positiven Energiebilanz bei hyperkalorischer und fettreicher Ernährung bei Bewegungsarmut mit einer Ansammlung v.a. viszeralen Fettgewebes (2, 6). Es kommt zur metabolischen Dysregulation.

Die Entwicklung und Fortschreitung der metabolischen Dysfunktion beruhen auf einem chronisch inflammatorischen Status. Bei abdomineller Adipositas liegt vermehrt dysfunktionales viszerale Fettgewebe vor. Durch die Überernährung wird die Speicherkapazität der Adipozyten überschritten und das Endoplasmatische Reticulum wird gestresst (7). Die Adipozyten nehmen weniger Glucose auf und die Abgabe von Fettsäuren ist erhöht (8). Die Fettsäuren haben eine toxische Wirkung auf das Fettgewebe selbst und führen auch in anderen Geweben zur Organschädigung (9). Hier ist insbesondere die Leber zu benennen (9).

Das Fettgewebe ist durchsetzt mit Makrophagen, die mit den Adipozyten interagieren. Dabei dominieren physiologisch antiinflammatorische M2-Makrophagen (10). M2-Makrophagen sezernieren die antiinflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-10 (11). IL-10 hält mit die Insulinsensitivität im Fettgewebe aufrecht (12). Dabei scheint es den Abbau von Insulinrezeptoren und Glucose-Transporter-4 durch das proinflammatorische TNF- α zu verhindern (11). Außerdem scheinen M2-Makrophagen die Lipolyse der Adipozyten aufrecht zu erhalten (13).

Die Menge der Makrophagen steigt proportional mit dem Ausmaß der Adipositas. So liegt der Anteil an Makrophagen im Fettgewebe bei Normalgewichtigen bei ca. 10 %, bei extrem adipösen Menschen kann der Anteil auf über 50 % steigen (14). Die dominierende Polarisation als M2-Makrophagen verändert sich hin zu überwiegend proinflammatorischen M1-Makrophagen (10). M1-Makrophagen sezernieren proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-6 und IL-12 sowie Reaktive Sauerstoffspezies (11). Sie beeinflussen die endokrine Funktion der Adipozyten. Diese sezernieren Adipokine, die die Inflammation weiter fördern (15). Das Adipokin Leptin aktiviert dabei Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems und hat Eigenschaften eines proinflammatorischen Zytokins (15). Viel beschriebene Adipokine, die die chronische Inflammation fördern, sind auch TNF- α und IL-6, von ihnen sind einige pathophysiologische Mechanismen untersucht (16). So wurde beispielsweise im Mausmodell gezeigt, dass bei ausgeschaltetem IL-6-Rezeptor- α eine vermehrte Endotoxizität von Lipopolysacchariden (LPS) zu beobachten und die Expression von

IL-4-Rezeptoren auf Makrophagen vermindert ist (17). Damit wird die durch IL-4 getriggerte antiinflammatorische M2-Polarisation vermindert (17). TNF- α fördert wie bereits erwähnt die Insulinresistenz (11). Allerdings scheint IL-6 als Myokin aus Muskelzellen die Glucosetoleranz und den Lipidstoffwechsel zu verbessern (18, 19).

Das Fettgewebe ist physiologisch vorwiegend mit regulatorischen T-Zellen durchsetzt, die das antiinflammatorische Zytokin IL-10 sezernieren und mit einer höheren Insulinsensitivität assoziiert sind (20). Bei chronischer Inflammation im Fettgewebe wird auch das adaptive Immunsystem aktiviert. Es kommt zur T-Zell-Proliferation mit einer relativen Reduktion der naiven und regulatorischen T-Zellen und Vermehrung der T_H1-Effektorzellen mit einer weiteren Erhöhung von IFN- γ (20). Bei adipösen Mäusen wurde zudem die Erhöhung der zytotoxischen T-Zellen beobachtet (21). Diese wiederum sind mit einer weiteren Vermehrung der Makrophagen im Fettgewebe und einer erhöhten Insulinresistenz assoziiert (21). So könnten auch T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Initiierung und Progression der chronischen Inflammation spielen. Die Funktionen der verschiedenen Leukozyten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Auch in der Leber führt die Lipotoxizität zu einer chronischen Inflammation bis hin zu der Entwicklung einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (non alcoholic fatty liver disease, NAFLD) mit Beeinträchtigung der Leberfunktionen. In der Leber werden freie Fettsäuren, die bei MetS vermehrt aus den Adipozyten freigesetzt werden, in TG umgewandelt und als Very-low-density Lipoprotein (VLDL) freigesetzt. Das Überangebot an freien Fettsäuren und Glucose, die ebenfalls in TG umgewandelt wird, führt zu einer intrazellulären Akkumulation von TG und erhöhten Plasmakonzentrationen von TG und VLDL sowie deren Remnants. Die Insulinresistenz fördert diese Umwandlungen zusätzlich. (9, 22, 23)

Des Weiteren führt das Überangebot an TG bei der Nahrungsaufnahme zu erhöhten Konzentrationen von Chylomikronen und deren Remnants (24). All diese Lipoproteine werden unter dem Begriff *Triglyzeridreiche Lipoproteine* (TGRL) zusammengefasst (24). TGRL tragen durch ihre eigene proinflammatorische Wirkung zur Aufrechterhaltung des chronisch inflammatorischen Status bei (25). Insgesamt entsteht also systemisch ein chronisch inflammatorischer Status, der u.a. endotheliale Dysfunktion, die Synthese von toxischen Lipidkomponenten und Insulinresistenz fördert. Ob und in welchem Ausmaß diese pathologische Kaskade ausgelöst wird, ist individuell verschieden und von

genetischen Komponenten abhängig (26). Der Begriff des heterogenen Krankheitsbilds MetS ist in der Wissenschaft stetig im Wandel und wird auch als *Insulinresistenzsyndrom* bezeichnet (27).

1.2 Kardiovaskuläre Folgen des Metabolischen Syndroms

Das MetS beinhaltet gleich mehrere Risikofaktoren für die Entwicklung von Atherosklerose und Koronarer Herzkrankheit und geht häufiger mit schwereren Verläufen einher (28). Der chronisch inflammatorische Status beeinträchtigt das vaskuläre Endothel noch vor dem Leber- und Skelettmuskelgewebe (29). Durch eine Reihe entzündlicher Prozesse mit Entstehung einer endothelialen Dysfunktion mit Permeabilitätssteigerung der Gefäße entstehen atherosklerotische Plaques (30, 31). Physiologisch sezernieren die Endothelzellen Stickstoffmonoxid, welches zur Relaxierung der glatten Gefäßmuskulatur führt, die Thrombozytenaggregation verhindert und die Expression von Adhäsionsmolekülen inhibiert (32). Bei endothelialer Dysfunktion ist diese Stickstoffmonoxidfreisetzung vermindert, die Adhäsion von Leukozyten und Plättchen wird ermöglicht (30). Die TGRL haben eine direkte proinflammatorische Wirkung auf das Endothel, auf die Makrophagen in der Gefäßwand und auf die glatten Muskelzellen und tragen zur Plaquentstehung bei (24).

Neben der metabolischen Dysregulation stellen auch hämodynamische Faktoren ein Risiko dar. Leukozyten, v.a. Monozyten und T-Zellen, wandern nun in die Gefäßwand ein und sezernieren proinflammatorische Zytokine, sodass es zu einem chronischen Prozess von Inflammation und fibrotischem Umbau kommt (30). Monozyten entwickeln sich zu Makrophagen, die über ungehemmte Scavenger-Rezeptoren oxidiertes Low-density Lipoprotein (LDL) phagozytieren und so zu Schaumzellen werden, die sich in der Gefäßwand ansammeln (33). TGRL sind hier als Lieferanten der Lipide zu betrachten (24). Von Makrophagen aktiviert, stimulieren T-Lymphozyten die Proliferation glatter Muskulatur (34). Nach Vaneyss und Vorp (2007) entsteht eine Plaque mit entzündlich nekrotischem Kern, der von glatten Muskelzellen und einer fibrotischen Kapsel eingeschlossen wird. Solche Plaques engen einerseits das Gefäßlumen ein, zum anderen besteht die Gefahr der Plaqueruptur, die zum ischämischen Infarkt führen kann. Insbesondere sind Koronargefäße, die abdominale Aorta sowie die Bifurkation der Arteria carotis betroffen. (31)

Bei koronarem Befall führen die entstehenden Ischämien bei einem meist zusätzlich chronisch druckbelasteten hypertrophierten Herzen zu Gewebeverlusten des Myokards. Dadurch wird die Pumpfähigkeit des Herzens reduziert und das Herzminutenvolumen sinkt. Die daraus resultierende periphere Minderversorgung führen zu der verminderten muskulären Leistungsfähigkeit und der schnellen körperlichen Erschöpfung, es entsteht eine Herzinsuffizienz. (35)

Tabelle 2: Zusammenfassung der Rolle der untersuchten Leukozyten bei chronischer Inflammation (10-34, 36)

Zelle	Cluster of Differentiation	Rolle in chronischer Inflammation
Leukozyten	CD45 ⁺	Inflammation, Resolution
Neutrophile	CD16 ⁺⁺ SSC-H ^{hi}	proinflammatorisch, MV-Ausschüttung in Resolution
NK-T-Zellen	CD16 ⁺ CD14 ⁻ CD3 ⁺	proinflammatorisch
NK-Zellen	CD16 ⁺ CD14 ⁻ CD3 ⁻	proinflammatorisch
Klassisch aktivierte Monozyten	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	proinflammatorisch, chronische Inflammation, dysfunktionales Fettgewebe, proatherosklerotisch
Alternativ aktivierte Monozyten	CD14 ⁺ CD16 ⁺	antiinflammatorisch Resolution
Intermediäre Monozyten	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	proinflammatorisch
Regulatorische CD4⁺ T-Zellen	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD127 ^{lo} CD25 ⁺	Regulation T _H -Zellen Resolution (36)
Effektor CD4⁺ T-Zellen	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD127 ⁻ CD25 ⁻	T _H 1 (proinflammatorisch) T _H 2 (antiinflammatorisch) T _H 17 (proinflammatorisch, Neutrophilenrekrutierung)
Naive/Gedächtnis CD4⁺ T-Zellen	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD127 ⁺ CD25 ^{lo/-}	erhöht bei Resolution
Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	proinflammatorisch

1.3 Mikrovesikel und ihre Rolle bei Metabolischem Syndrom

Mikrovesikel (MV) sind Vesikel verschiedener Zellen definiert durch ihre Größe von 100 bis 1000 nm (37). Sie enthalten Moleküle, wie beispielsweise miRNAs und andere Proteine, die sie zu Zellen transportieren können (38). Damit scheinen sie eine wichtige Rolle in der interzellulären Kommunikation zu spielen (38). Sie werden vorwiegend von gestressten, also inflammatorisch aktivierten Zellen gebildet und können so als Marker der Immunzellaktivierung dienen (39). Sie entstehen durch membranöses Abknospen von einer Ursprungszelle (39). An ihrer Oberfläche tragen sie die typischen Oberflächenmarker ihrer Ursprungszelle und Phosphatidylserin (40). Identifizierte Trigger für die Freisetzung von MV sind Hypoxie, Scherstress an Gefäßwänden, Inflammation, Training, kardiovaskulärer Stress und fettreiche Ernährung (41). Bei chronischen Krankheiten mit inflammatorischer Komponente lassen sich erhöhte MV-Level nachweisen (42). Sie finden sich insbesondere bei Patient:innen mit kardiovaskulären Risikofaktoren und Metabolischem Syndrom (33).

1.4 Therapieoptionen beim Metabolischen Syndrom

Die aktuelle Therapie des MetS besteht im klinischen Alltag v.a. aus der medikamentösen Einstellung des Blutdrucks und der Lipide sowie ggf. der Behandlung des T2DM. In verschiedenen Leitlinien werden in beiden Fällen eine konsequente Lebensstilveränderung mit Reduktion der Kalorienzufuhr und vermehrter körperlicher Aktivität empfohlen, da das evidenzbasiert gute therapeutische Effekte habe. (43–45)

Insbesondere die Entstehung kardiovaskulärer Folgeerkrankungen und eines T2DM ließen sich so vermindern. Allerdings fordern diese Ansätze eine hohe Adhärenz bzw. Motivation der Patient:innen, eine lebenslange Verhaltensänderung durchzuführen, und bedürfen der Berücksichtigung von Komorbiditäten. (46, 47)

1.5 Einfluss von Training auf das Metabolische Syndrom

Es hat sich bereits gezeigt, dass Sport den Verlauf des MetS positiv beeinflussen und das kardiometabolische Risiko senken kann. Regelmäßiges Training führt dabei zur Gewichtsreduktion mit Rückgang der zentralen Adipositas und zur Verbesserung der kardiorespiratorischen Fitness, der Plasmalipide, der kardiovaskulären Funktion sowie der Glucosetoleranz (5, 45, 48). Regelmäßige physische Aktivität führt zur Senkung der Mortalität bei Menschen mit T2DM (49).

Einfluss auf den Trainingsausgang haben mehrere Parameter wie Trainingsfrequenz,

-dauer, -intensität und -art (50). Welche dieser Modalitäten bei Patient:innen mit kardiovaskulären Risikofaktoren nun am besten geeignet sind, ist noch nicht hinreichend geklärt. Wünschenswert wäre hierbei ein Konzept, das für die Patient:innen einfach und verständlich ist, ihre intrinsische Motivation anspricht und gleichzeitig zu sichtbaren Erfolgen führt, um eine bestmögliche Adhärenz zu erreichen (51).

Die kardiorespiratorische Fitness wird oft durch die maximal mögliche Sauerstoffaufnahme, VO_{2max} , gemessen. VO_{2max} beschreibt dabei ein Plateau, das bei Ausbelastung erreicht wird und nicht mehr gesteigert werden kann (52). Da die Patient:innen selten diesen Status erreichen, findet die sogenannte VO_{2peak} zunehmend Beachtung. Sie bezeichnet die Sauerstoffaufnahme zum Zeitpunkt der maximal erreichten Belastung (52). Sie kann als Absolutwert in $[mlO_2/min]$, relativ zum Körpergewicht in $[mlO_2/min*kg]$ oder in $[\%]$ des individuell berechneten Voraussagewertes angegeben werden (53). Wenn nicht anders bezeichnet, wird im Folgenden die Einheit $[mlO_2/min*kg]$ für VO_{2peak} verwendet.

Zur Bestimmung der Trainingsintensität wird üblicherweise die maximale Auslastung anhand der errechneten maximalen Herzfrequenz (HR_{max}) bestimmt. Im Training wird dann ein bestimmter prozentualer Anteil der HR_{max} als Intensität festgelegt, allerdings findet die Verwendung eines prozentualen Anteils der Herzfrequenzreserve (heart rate reserve, HRR) mehr und mehr Anerkennung. Vorteil dieses Parameters ist, dass bei Patient:innen mit geringer Reserve und hoher Ruhfrequenz nicht die Gefahr besteht, dass die Zielfrequenz zu niedrig ist (50). Nach aktuellen Leitlinien wird Patient:innen mit kardiometabolischem Risikoprofil ein moderates kontinuierliches Trainingsprogramm mit max. 50% Auslastung der HR_{max} empfohlen (54, 55). Dabei gilt das Prinzip, dass die Häufigkeit des Trainings wichtiger ist, als dabei eine hohe Intensität oder auch Volumen zu erreichen (51, 52). Die Reviews und Metaanalysen von Ostman et al. (2017) sowie Weston et al. (2014) zeigten, dass zusätzlich hochintensive Trainingsphasen zur Verbesserung verschiedener klinischer Parameter, vor allem aber der VO_{2peak} führen können (5, 56). Viele Studien beschäftigen sich jetzt mit dem Vergleich der Effekte von hoch-intensivem Intervall-Training (HIIT) und moderatem kontinuierlichen Training (Moderate Continuous Training, MCT) (56-65). Es zeigt sich unabhängig vom Trainingsregime meist eine Verbesserung der kardiorespiratorischen Fitness, die klinischen Effekte variieren allerdings sehr stark.

Der Erfolg des Trainings ist auch von den individuellen Eigenschaften der Patient:innen abhängig. Genetik und Epigenetik, Alter und Geschlecht spielen eine Rolle (66–71). Auch eine koordinierte Ernährungsintervention im Sinne einer eher protein- und ballaststoffreichen Ernährung mit Reduktion wenig konjugierter Fettsäuren und Kohlenhydraten ist von Bedeutung (72–75). Nach einer Metaanalyse ist Diät entscheidend für die Gewichtsreduktion, kann aber durch Training noch verbessert werden (76). Nicht zu vergessen ist die Frage nach der praktischen Durchführbarkeit von Trainingsprogrammen aufgrund von z.B. Komorbiditäten (77, 78). Auch die Zielsetzung und Motivation kann bei Patient:innen individuell stark variieren und sollte unbedingt bei der Planung der Lifestyle-Veränderungen Beachtung finden (78). Als Goldstandard wird bei Trainingsprogrammen die VO_2 peak als Surrogatparameter für die kardiorespiratorische Fitness und damit den Erfolg des Trainings herangezogen (79). Die Verwendung dieses Parameters findet ihren Ursprung eher im Leistungssport, daher ist seine Allgemeingültigkeit bei all den genannten Einflussfaktoren insbesondere bei älteren multimorbiden Patient:innen fraglich (80). Insgesamt sollte ein möglichst individualisiertes Trainingsprogramm für alle Patient:innen erarbeitet werden.

1.6 Training und Inflammation

Da Inflammation also eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des MetS und CVD spielt, sollen nun auch die Einflüsse des Trainings auf die Inflammation betrachtet werden. Hier gilt es, zwischen den akuten Effekten direkt nach einer Trainingseinheit und den langfristigen Effekten bei regelmäßigem Training zu unterscheiden. In dieser Arbeit werden die Effekte von regelmäßigem Training untersucht.

Langfristiges Training führt zu erhöhten Konzentrationen von IL-4, IL-6 und IL-10, die z.B. über die Inhibierung von TNF- α und IL-1-Rezeptor- α antiinflammatorisch wirken (81, 82). So zeigten sich bei Ratten mit Herzinsuffizienz nach acht Wochen Training erhöhte IL-10- und verminderte TNF- α -Konzentrationen im Skelettmuskel (81). Auch bei Menschen zeigte sich in verschiedenen Studien eine Abnahme an TNF- α bei chronischem Training, während IL-6 erhalten blieb (83). Dabei haben die Unterschiede in den Trainingsregimes zwar Einfluss auf die VO_2 peak, nicht aber auf die Zytokinlevel (83). Interessant ist, dass IL-6 als Myokin eher protektiv, als Zytokin aber proinflammatorisch wirkt (82).

Möglicherweise sind diese Veränderungen der Zytokinlevel durch die Herabregulierung der sie ausschüttenden Immunzellen bedingt. So wurde gezeigt, dass bei physischer Aktivität der Anteil an CD14^{pos}CD16^{pos} Monozyten sowie die durch LPS-stimulierte TNF- α -Produktion vermindert sind (84). Nach 12-wöchigem Training zeigte sich eine Reduktion von zytotoxischen CD8^{pos}-T-Zellen bei einer Vermehrung der regulatorischen CD4^{pos}CD25^{pos}-T-Zellen (85). Eine Studie, in der ältere Patient:innen für sechs Monate Kraft- oder aerobes Training absolvierten, zeigte erhöhte CD3^{pos}-, CD4^{pos}- und CD8^{pos}-T-Zell-Level und erhöhtes IL-10, während die CD4/CD8-T-Zell-Ratio, IL-6 und TNF- α vermindert waren (86). Bei langfristigem aeroben Training wurde auch eine Verringerung der Ansammlung von inflammatorisch aktivierten Leukozyten um Lymphgefäße beobachtet, wodurch sich ihre durch Adipositas geförderte Dysfunktion wieder besserte (87). Es gibt viele Studien, die Veränderungen in Leukozyten belegen, die Mechanismen sind weitgehend ungeklärt, auch wenn es Ansätze dazu gibt. Es wurde mittels MicroArray gezeigt, dass langfristiges Training zu antiinflammatorischen Veränderungen auf transkriptioneller Ebene der Leukozyten im peripheren Blut führen können (88). Krafttraining über zwei Monate hat bei acht jungen Männern die DNA-Methylierung von Leukozyten in mehreren Regionen beeinflusst (89). Diese Beispiele zeigen, dass körperliches Training zu epigenetischen Veränderungen führen kann.

Nach dem bisherigen Kenntnisstand zeigt sich also, dass Inflammation in der Pathogenese kardiovaskulärer und metabolischer Krankheiten eine zentrale Rolle einnimmt. Körperliche Aktivität und regelmäßiges Training haben kardiovaskulär und metabolisch positive Effekte und wirken zudem antiinflammatorisch. Allerdings sind die inflammatorischen Mechanismen noch nicht hinreichend definiert.

1.7 Resolution der Inflammation

Bisher versucht man, in kardiovaskulären Präventionsprogrammen und Therapien antiinflammatorische Effekte zu verstärken und proinflammatorische Effekte zu reduzieren. Es entwickelt sich allerdings ein neues Verständnis, nach dem sich proinflammatorisch und antiinflammatorisch nicht einfach als gut und schlecht voneinander abgrenzen lassen.

Teil inflammatorischer Mechanismen sind auch die sogenannten „pro-resolving“, also behebende Prozesse. Diese sind notwendig, um beschädigtes Gewebe zu reparieren und Funktionen aufrecht zu erhalten. Wichtig ist hierbei die Reduktion der

Leukozytenrekrutierung, die Anregung der Efferozytose und die Reparatur von Geweben und Gefäßen. Teil der „pro-resolving“ Inflammation sind M2-Makrophagen, bestimmte Lipidmediatoren, Proteine und Signalgase. Diese Mediatoren könnten auch therapeutisch nutzbar sein. (90)

Bei einem Ungleichgewicht zwischen den verschiedenen Mediatoren kommt es zur Erhaltung einer chronischen Inflammation. Dies führt bei den atherosklerotischen Plaques zur Größenzunahme. Die Normalisierung des Ungleichgewichts könnte die Plaqueprogression aufhalten. Auf molekularer Ebene könnte die pro-resolving Inflammation angeregt werden. (91)

Beim Übergang zur Resolution der Inflammation steigt der Anteil der M2-Makrophagen an. Sie senden antiinflammatorische Signale und sind hauptsächlich für die Efferozytose verantwortlich (90). Auch Neutrophile sind an der Resolution beteiligt, indem sie antiinflammatorische Signale senden. Sie geben auch MV ab, die das Protein Annexin A1 und Phosphatidylserin tragen, wodurch die weitere Neutrophilenrekrutierung reduziert wird, die M2-Polarisierung der Makrophagen und deren Efferozytose gefördert und Gewebsreparatur angeregt wird (92).

Bei den T-Zellen ist der Shift hin zu Treg-Zellen relevant. Sie scheinen über eine Inhibierung von IL13 und damit einem Shift der Makrophagen hin zu einem M2-Phänotyp zur Resolution der Inflammation beizutragen (90, 93).

Inflammation ist ein vielschichtiger und komplexer Prozess, in dem verschiedene regulatorische sowie pro- und antiinflammatorische Faktoren des Immunsystems ineinandergreifen oder auch gegeneinander arbeiten. Daher ist es wichtig, ein genaueres Verständnis für die verschiedenen Mechanismen der Inflammation zu erarbeiten.

Das Metabolische Syndrom ist ein Cluster aus kardiovaskulären Risikofaktoren, das mit erhöhter Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen einhergeht. Pathophysiologisch führt ein Lebensstil mit positiver Energiebilanz zur zentralen Adipositas mit dysfunktionalem Fettgewebe, was einen sich selbst erhaltenden chronisch inflammatorischen Status auslöst. Die chronische Inflammation verstärkt wiederum das Risikoprofil und es entsteht eine sich selbst erhaltene Risikospirale. An den Mechanismen hinter diesen Zusammenhängen wird viel geforscht. Auch in dieser Arbeit geht es um die Entwicklung eines genaueren Verständnisses.

1.8 Ziel der Arbeit

Basierend auf den genannten Vorarbeiten nehmen wir an, dass Patient:innen mit MetS in Abhängigkeit ihrer basalen Charakteristika und Komorbiditäten unterschiedlich von Trainingsinterventionen und weiteren Therapiemaßnahmen profitieren. Weiterhin nehmen wir an, dass immunozytäre Faktoren eine große Rolle in der Entstehung und Erhaltung, aber auch Resolution des MetS spielen. Die Verbesserungen der kardiometabolischen Parameter durch Training könnten mit deren Einflüssen auf das Leukozytenprofil assoziiert sein.

In diesem Kontext möchten wir untersuchen, welche Veränderungen des Leukozytenprofils universell bei allen Patient:innen und allen Trainingsformen auftreten und welche spezifischen Unterschiede sich abhängig von den Patient:innencharakteristika und der Trainingsform zeigen. Zudem möchten wir untersuchen, welche Veränderungen des Leukozytenprofils mit welchen Veränderungen der klinischen Parameter inklusive der körperlichen Leistungsfähigkeit assoziieren (Abbildung 1).

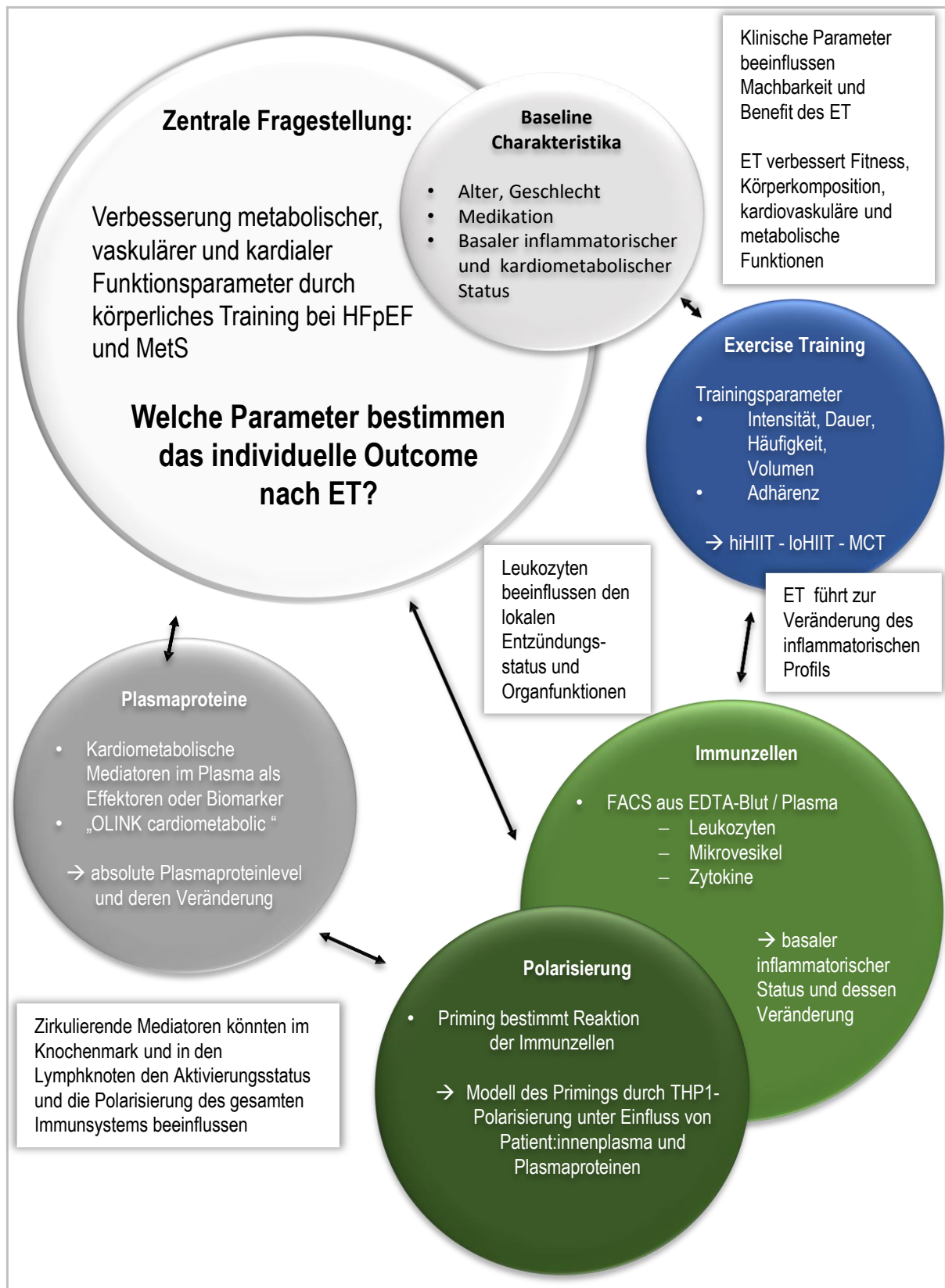


Abbildung 1: **Schematische Darstellung der Fragestellung und des Studiendesigns.** MetS = Metabolisches Syndrom, HFpEF = Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion, HIIT = hoch-intensives Intervalltraining; hi=4 Intervalle, lo=1 Intervall, MCT = moderates kontinuierliches Training, ET = Exercise Training

2 Material

2.1 Geräte

- Attune NxT acoustic flow cytometer (Life Technologies, cat-no. A24858)
 - Attune debubble solution (Life Technologies, cat-no. A10496)
 - Attune focusing fluid (Life Technologies, cat-no. 4488621)
 - Attune shutdown solution (Life Technologies, cat-no. A24975)
 - Attune wash solution (Life Technologies, cat-no. A24974)
- Mikroskop (Motic AE2000 Binokular)
- Neubauer Zählkammer mit 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm² (Hecht Assistant)
- Zentrifuge (Beckman Coulter Allegra X-30R)
- Zentrifuge (Eppendorf 5424 R)

2.2 Programme

- Attune NxT Software (Version 2.6)
- Excel (Version Microsoft 365 Apps for Enterprise)
- Kaluza analysis (Version 2.1)
- R (Version 3.6.0)
- R studio (Version 1.3.959)

2.3 Gefäße und Werkzeuge

- 6-Well-Platten, TC-behandelt (VWR, cat-no. 734-2323P)
- 12-Well-Platten, TC-behandelt (VWR, cat-no. 734-2324P)
- 96-Well Platte, TC-behandelt (VWR, cat-no. 734-2327P)
- ACD-Monovette für 8,5 ml (BD Life Sciences, cat-no. 366645)
- EDTA-Vacutainer (BD Life Sciences, cat-no. 367862)
- FACS tubes (Kisker Biotech, cat-no. 390595)
- Kulturf Flaschen (VWR, cat-no. 734-2785P)
- Pipetten 5 ml (VWR, cat-no. 734-0350)
- Pipetten 10 ml (VWR, cat-no. 734-0352)
- Pipetten 25 ml (VWR, cat-no. 734-0347)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml (Kisker Biotech, cat-no. 048048)
- Zentrifugenröhrchen 15 ml (Falcon, cat-no. 734-0451)
- Zentrifugenröhrchen 50 ml (Falcon, cat-no. 734-0448)

2.4 Chemikalien

- Bleach: 13% Natriumhypochlorid in destilliertem Wasser
- Cell Staining Buffer (CSB)
 - PBS-Pufferlösung mit 10% fetalem Kälberserum und NaN_3 zur Immunofluoreszenzfärbung (BioLegend, cat-no. 420201)
- Cytometric Bead Array System (CBA), BD™ Biosciences
 - Assay diluent (BD™ Biosciences, cat-no. 560104)
 - Human IFN- γ Flex Set mit Capture bead diluent for serum/plasma und Detection reagent diluent (BD™ Biosciences, cat-no. 558269)
 - Human IL-10 Flex Set mit Capture bead diluent for serum/plasma und Detection reagent diluent (BD™ Biosciences, cat-no. 558274)
 - Human IL-13 Flex Set mit Capture bead diluent for serum/plasma und Detection reagent diluent (BD™ Biosciences, cat-no. 558450)
 - Human IL-1 β Flex Set mit Capture bead diluent for serum/plasma und Detection reagent diluent (BD™ Biosciences, cat-no. 558279)
 - Human IL-4 Flex Set mit Capture bead diluent for serum/plasma und Detection reagent diluent (BD™ Biosciences, cat-no. 558272)
 - Human IL-6 Flex Set mit Capture bead diluent for serum/plasma und Detection reagent diluent (BD™ Biosciences, cat-no. 558276)
 - Human IL-8 Flex Set mit Capture bead diluent for serum/plasma und Detection reagent diluent (BD™ Biosciences, cat-no. 558277)
 - Human TNF Flex Set mit Capture bead diluent for serum/plasma und Detection reagent diluent (BD™ Biosciences, cat-no. 560112)
 - Wash buffer (BD™ Biosciences, cat-no. 560105)
- Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (PBS)
 - modifiziert ohne Calciumchlorid und Magnesiumchlorid, steril filtriert, geeignet für Zellkultur, Endotoxin getestet (Sigma, cat-no. D8537)
- EDTA (Versen): 1%; w/v in PBS; w/o Ca^{2+} ; w/o Mg^{2+} (Biochrom, cat-no. L2113)
- FACS-Fixierlösung: PBS mit 1% Paraformaldehyd (PFA)
- Fluoreszenz-Antikörper
 - AnxV-PerCP/Cy5 (BioLegend, cat-no. 640936)
 - CD3-PE/Cy7 (BioLegend, cat-no. 300316)
 - CD4-Alexa 488 (BioLegend, cat-no. 317420)

- CD8-BV510 (BioLegend, cat-no. 301048)
- CD14-BV421 (BioLegend, cat-no. 301830)
- CD16-Alexa 647 (BioLegend, cat-no. 302020)
- CD25-Alexa 700 (BioLegend, cat-no. 302622)
- CD41-APC/Cy7 (BioLegend, cat-no. 303716)
- CD45-BV711 (BioLegend, cat-no. 304050)
- CD66b-Alexa 700 (BioLegend, cat-no. 305114)
- CD86-Pacific Blue (BioLegend, cat-no. 305423)
- CD127-BV605 (BioLegend, cat-no. 351334)
- CD144-PE (BioLegend, cat-no. 348506)
- CD163-BV605 (BioLegend, cat-no. 333616)
- CD206-Alexa 488 (BioLegend, cat-no. 321114)
- IFN- γ 100ng/ml in H₂O (PeproTech, cat-no. 300-02)
- IL-4 10ng/ μ l in H₂O (PeproTech, cat-no. 200-04)
- IL-10 10ng/ μ l in H₂O (PeproTech, cat-no. 200-10)
- LPS 10ng/ μ l in H₂O (Zur Verfügung gestellt von E. Na - Kardiologie, Charité Universitätsmedizin Berlin)
- Monozyten der THP1-Zelllinie (Zur Verfügung gestellt von Dr. A. Kratzer - Kardiologie, Charité Universitätsmedizin Berlin)
- Patient:innenproben
 - Plasmaproben: 3 Aliquots à 500 – 1200 μ l pro Patient:in und Zeitpunkt
 - EDTA-Blut: 300 μ l pro Patient:in und Zeitpunkt
- Phorbol 12-Myristat-13-Acetat-Lösung (PMA)
- RPMI Medium 1640 mit 4,5 g/L D-Glucose, 2,383 g/L HEPES Buffer, L-Glutamine, 1,5g/L Natrium Bicarbonate, 110 mg/L Natrium Pyruvate (Gibco by Life Technologies, cat-no. A1049101)
- RPMI Medium 1640 mit L-Glutamine (Gibco by Life Technologies, cat-no. 11879020)

3 Methoden

3.1 Studiendesign und Patient:innenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine explorative Grundlagenstudie entstanden aus einer Kooperation der Klinik für Kardiologie am Campus Benjamin Franklin der Charité Universitätsmedizin Berlin und dem Zentrum für Präventive Sportmedizin und Sportkardiologie der Technischen Universität München im Rahmen eines Shared Expertise Projektes des DZHK auf Grundlage der prospektiv angelegten klinischen Studie ExMET (94). Des Weiteren wurden uns freundlicherweise Daten der OptimEx-Studie aus dem Studienzentrum des Zentrums für Präventive Sportmedizin und Sportkardiologie der Technischen Universität München zur Auswertung übermittelt (95).

An der Charité führten wir mittels Durchflusszytometrie die vergleichende Charakterisierung der Veränderung des Leukozytenprofils und deren MV als Aktivierungsmarker sowie von Zytokinen als Marker des inflammatorischen Status mit kardiovaskulären Zielparametern unter dem Einfluss verschiedener langfristiger Trainingsprogramme durch. Weiterhin untersuchten wir, ob das Patient:innenplasma die Polarisation von Makrophagen beeinflusst. Abschließend erfolgte die Suche nach möglichen Mediatoren der beobachteten Veränderungen und deren Wirkung auf die Makrophagenpolarisierung.

An 24 Patient:innen mit Metabolischem Syndrom wurden durch die Kooperationspartner der TU München im Rahmen der multizentrischen ExMET-Studie der Einfluss dreier verschiedener Trainingsprogramme am Spiroergometer auf klinische Parameter untersucht (96). An der Charité haben wir die Veränderungen des immunometabolischen Profils der Patient:innen aus Blut- und Plasmaproben analysiert und im Kontext der klinischen Ergebnisse ausgewertet.

Eingeschlossen wurden Patient:innen mit Metabolischem Syndrom nach den IDF Kriterien (6) im Alter von 30 bis 70 Jahren. Ausschlusskriterien sind klinisch instabile kardio-metabolische Konditionen, die einer intensivierten medikamentösen oder interventionellen Behandlung bedürfen, ein Myokardinfarkt in den letzten vier Wochen und neurologische oder orthopädische Störungen, durch die das Training nicht durchführbar ist. Weiterhin wurden Patient:innen ausgeschlossen, die weniger als 60% der Trainingssessions absolviert haben. Ein Patient hat die Studie aus persönlichen

Gründen abgebrochen. Bei drei Patient:innen scheint es Fehler in der Leukozytenfärbung gegeben zu haben. In alle Auswertungen wurden am Ende 24 Patient:innen eingeschlossen (Abbildung 2).

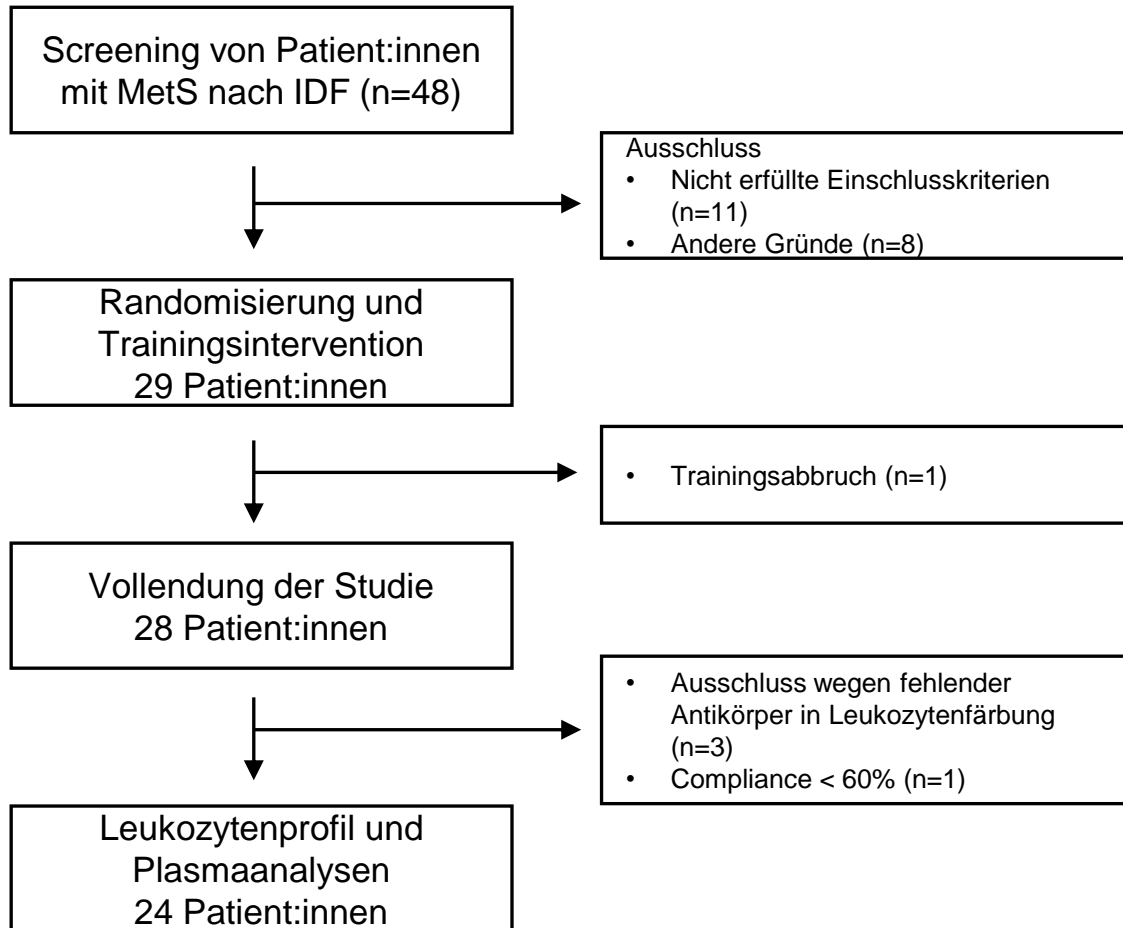


Abbildung 2: Ein- und Ausschluss der Patient:innen bei ExMET.

Die Patient:innen wurden in drei verschiedene Trainingsgruppen randomisiert (Tabelle 3). Die ersten beiden Gruppen bilden als zwei Varianten eines hochintensiven Intervalltrainings (HIIT) die Interventionsgruppen. Die dritte Gruppe absolviert das Trainingsprogramm nach aktuellen Leitlinien (76) und bildet damit die Kontrollgruppe.

Die erste Gruppe absolvierte ein high-volume high-intensity-interval Training (hiHIIT). Dabei gab es drei überwachte Trainingseinheiten pro Woche, die jeweils 38 min dauerten. Als Basis wurde eine mittlere Auslastung mit 35-50 % der HRreserve eingehalten. Dabei gab es vier hochintensive Intervalle von 4 min mit 80-90 % der HRreserve.

Tabelle 3: **Basale Charakteristika der 24 randomisierten ExMET-Patient:innen.**

dia = diastolisch, HIIT = hoch-intensives Intervalltraining (hi = 4 Intervalle, lo = 1 Intervall), MCT = moderates kontinuierliches Training, NPG = Nüchternplasmagluucose, sys = systolisch.

Eigenschaften der Patient:innen	Gesamt	MCT	loHIIT	hiHIIT
Gesamt	24	10	9	5
Alter (Durchschnitt in Jahren ± STD)	60,9 ± 4,6	61,3 ± 4,6	60,8 ± 5,4	60,4 ± 4,1
Männer/Frauen	16/8	7/3	6/3	3/2
Erhöhter Taillenumfang (Durchschnitt in cm ± STD)	24 (105,7±9,9)	10 (101,1±7,7)	9 (107,0±11,5)	5 (112,6±7,1)
Erhöhte Triglyzeride (Durchschnitt in mg/dl ± STD)	8 (136,4±46,8)	2 (123,3±54,6)	4 (145,4±43,9)	2 (146,4±35,6)
Blutdruck (Durchschnitt in mmHg ± STD)	sys: 132±15 dia: 85±9	sys: 136±16 dia: 86±7	sys: 127±11 dias 84±8	sys: 131±21 dia: 85±15
Erniedrigtes HDL (Durchschnitt in mg/dl ± STD)	7 (49,8±11,5)	2 (51,2±10,9)	3 (51,1±14)	2 (44,4±7,8)
Erhöhter NPG (Durchschnitt in mg/dl ± STD)	21 (112,5±19,9)	9 (117,8±25,2)	8 (111,3±16,0)	4 (104,2±13,6)
Medikamente (n (% pro Gruppe))				
AT₁-Rezeptorblocker	11 (45,8%)	3 (3,0%)	4 (44,4%)	4 (80,0%)
β-Blocker	7 (29,2%)	2 (2,0%)	3 (33,3%)	2 (40,0%)
Statin	11 (45,8%)	4 (4,0%)	4 (44,4%)	3 (60,0%)
Metformin	20 (8,3%)	1 (1,0%)	1 (11,1%)	0 (0,0%)
Insulin	20 (8,3%)	1 (1,0%)	1 (11,1%)	0 (0,0%)

Die zweite Gruppe führte ein low-volume, high-intensity-interval Training (loHIIT) durch. Dabei gab es ebenfalls drei überwachte Trainingseinheiten pro Woche, die aber jeweils nur 19 min dauerten. Auch hier war die Basis eine mittlere Auslastung mit 35-50 % der HRreserve. Dazu kam dann nur ein Intervall von 4 min mit 80-90 % der HRreserve.

Des Weiteren wurden uns klinische Daten von 38 Patient:innen der Studie OptimEx übermittelt. OptimEx ist eine randomisierte kontrollierte prospektive multizentrische Studie, die Effekte von körperlichem Training bei Patient:innen mit Herzinsuffizienz bei erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion (HFpEF) untersucht (93). Es wurden 180 Patient:innen mit stabiler HFpEF, die seit mindestens 6 Wochen medikamentös optimal eingestellt und über 40 Jahre alt sind, eingeschlossen. Ausgeschlossen wurden Patient:innen mit eingeschränkter Ejektionsfraktion und Zeichen der Instabilität, auch aufgrund von Komorbiditäten. Die Probanden wurden in zwei Interventionsgruppen, die ein dreimonatiges Trainingsprogramm absolvierten, und eine Kontrollgruppe randomisiert. Wir erhielten freundlicherweise die klinischen Daten von den 38 Patient:innen mit Metabolischem Syndrom, die den klinischen Einschlusskriterien der ExMET-Studie entsprachen.

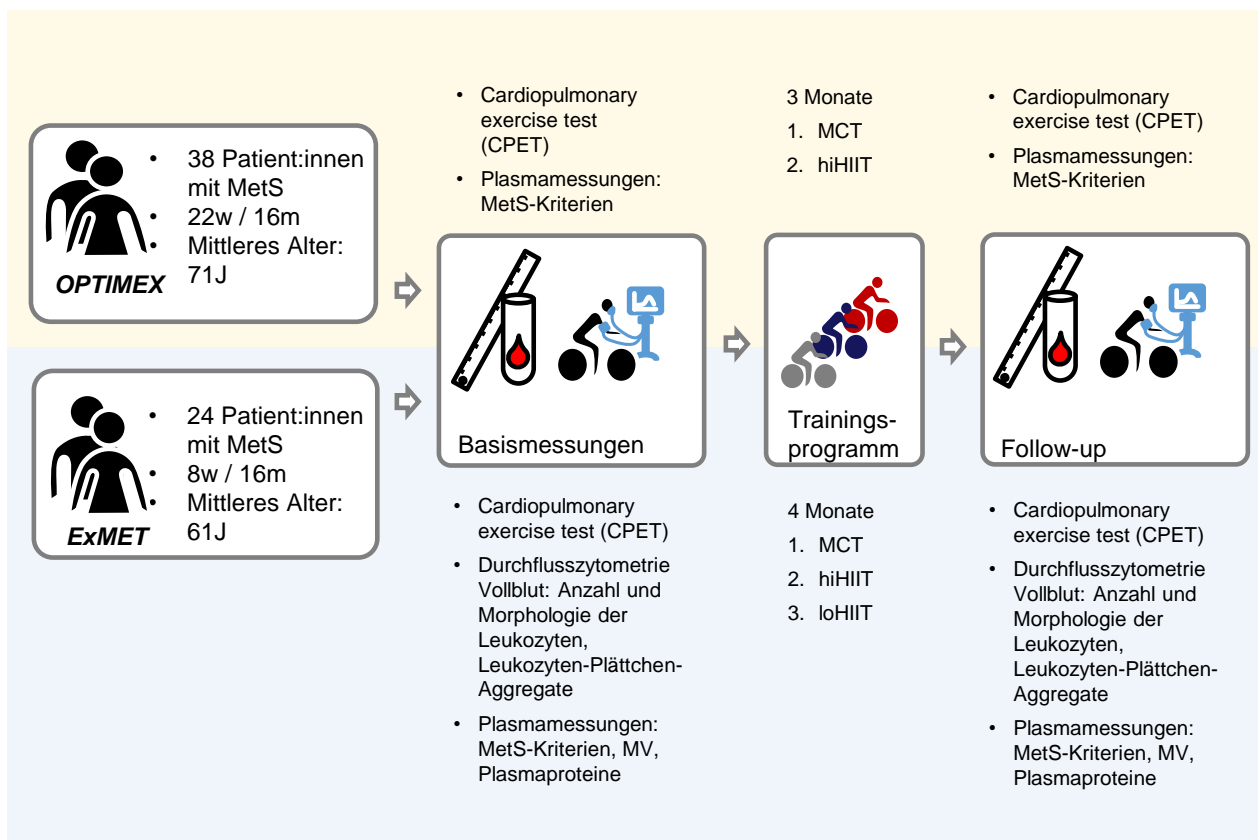


Abbildung 3: **Schematische Darstellung der Studiendesigns von OptimEx und ExMET.** Darstellung der 38 bzw. 24 bei uns eingeschlossenen Patient:innen. MetS = Metabolisches Syndrom, J = Jahre, w = weiblich, m = männlich, HIIT = hoch-intensives Intervalltraining (hi = 4 Intervalle, lo = 1 Intervall), MCT = moderates kontinuierliches Training, MV = Mikrovesikel

Die erste Interventionsgruppe absolvierte ein regelmäßiges Training moderater Intensität. Diese Patient:innen trainierten 5 Mal pro Woche am Spiroergometer für 40 min bei 50-60 % des $VO_2\text{max}$ und 60-70 % der maximalen Herzfrequenz. Sie entsprechen damit der MCT-Gruppe der ExMET-Studie.

Die zweite Interventionsgruppe absolvierte ein hochintensives Intervalltraining. Es bestand aus drei 38 min dauernden Trainingseinheiten pro Woche mit einer 10-minütigen Aufwärmungsphase und dann vier hochintensiven Intervallen mit 80-90% der $VO_2\text{max}$ und 90-95 % der maximalen Herzfrequenz. Zwischen den Intervallen bestanden 3-minütige Pausen mit moderater Intensität. Damit entsprechen sie der hiHIIT-Gruppe der ExMET-Studie.

Abbildung 3 fasst die in dieser Arbeit untersuchten Studiengruppen zusammen.

3.2 Untersuchung und Probengewinnung

In beiden Studien gab es zwei Messzeitpunkte. Eine Basisuntersuchung vor Beginn und eine Abschlussuntersuchung nach Vollendung der Trainingsprogramme nach drei (OptimEx) bzw. vier (ExMET) Monaten. Dabei wurden der Trainingszustand und das kardiometabolische Risiko anhand der Definitionskriterien des MetS und der $VO_2\text{peak}$ in den Studienzentren unserer Kooperationspartner erfasst (Abbildung 3).

Weiterhin erfolgten bei den Patient:innen der ExMET-Studie zu beiden Zeitpunkten vor dem Training und 2-3 Tage danach Blutentnahmen, die der Messung des inflammatorischen Profils, der Analyse der Plasmaproteine und der Analyse des Einflusses des Plasmas auf die Polarisierung von Makrophagen dienten. Zur Blutentnahme und -färbung wurde stets das gleiche Protokoll verwendet. Es wurden jeweils 8,5 ml Blut in eine ACD-Monovette und in ein EDTA-Röhrchen entnommen.

Das EDTA-Blut wurde direkt für die Leukozytencharakterisierung weiterverarbeitet, während aus den ACD-Monovetten Plasma isoliert wurde, das zur späteren Untersuchung verwahrt wurde.

Direkt nach Entnahme wurden die ACD-Monovetten bei 1500 x rcf bei Raumtemperatur (RT) für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde der klare Überstand in ein 15 ml Falcon-Röhrchen transferiert. Dabei wurde die Zellschicht nicht berührt. Das gewonnene Plasma wurde bei 2000 x rcf für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in Reaktionsgefäße transferiert. Das Plasma sollte gelblicher Farbe sein, um eine

Hämolyse auszuschließen. Die Proben wurden in Aliquots à 500 – 1200 µl bei -80°C eingefroren.

3.3 Leukozytencharakterisierung

3.3.1 Färbung der Leukozyten

Das EDTA-Blut wurde frisch nach der Abnahme gefärbt. Dazu wurden je 100 µl Blut in zwei Reaktionsgefäße gegeben. Eine Probe wurde anschließend mit einer Antikörperlösung gefärbt, die andere diente als ungefärbte Negativkontrolle. Die Antikörperlösung wurde zuvor in einem separaten Röhrchen vorbereitet. Dazu wurden entsprechend der Anzahl der Proben pro Tag ein Antikörper-Master-Mix erstellt. Pro Patient:in wurden 50 µl „cell staining buffer“ (CSB) mit je 1 µl der spezifischen Antikörper gegen CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD25, CD41, CD45 und CD127 mit 10 % Überschuss zusammengefügt.

Zur Färbung wurden 50 µl der Antikörperlösung in das erste Reaktionsgefäß gegeben. Zur Negativkontrolle wurden 50 µl CSB hinzugefügt. Beide Röhrchen wurden fest geschlossen und geschüttelt und anschließend 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurde zu beiden Röhrchen jeweils 900 µl Fixierlösung („FACS fix“) hinzugegeben und gemischt. Anschließend wurden die Proben zur Messung gekühlt am selben Tag nach Berlin versandt. Die nachfolgenden Untersuchungen erfolgten dann bei uns an der Charité.

3.3.2 Messung der Leukozyten

Hier erfolgte am Folgetag die durchflusszytometrische Messung der Leukozytenpopulationen des gefärbten EDTA-Blutes. Alle Messungen erfolgten blind. Die Entblindung erfolgte erst nach Eingabe aller Daten. Zunächst wurde sichergestellt, dass die Proben gekühlt, aber ungefroren eingetroffen waren. Dann wurden jeweils 300 µl der Probe in 1200 µl PBS verdünnt. Davon wurden dann jeweils 1000 µl im Durchflusszytometer gemessen. Zwischen zwei Messungen erfolgten stets zwei Waschungen mit Bleach und Pufferlösung. Am Zytometer wurde täglich mithilfe von vorgefertigten Beads mit definierter Fluoreszenzintensität die Genauigkeit der Detektoren dokumentiert. Bei den Messungen wurde auf CD45 getriggert. Dies erlaubte die Messung im Vollblut, ohne vorherige Separation der mononukleären Leukozyten über einen Dichtegradienten.

3.3.3 Gating der Leukozyten

Die Messungen wurden mit der Software „Kaluza analysis“ ausgewertet. Pro Patient:in wurde für beide Messzeitpunkte dasselbe Protokoll verwendet. Ein möglicher Fehler bei leichten Adjustierungen würde sich so auf beide Zeitpunkte auswirken und die Ergebnisse nicht verfälschen. Die Gatingstrategie ist exemplarisch in Abbildung 4 dargestellt.

Beim Gating wurden im ersten Schritt Breite versus Höhe des side scatter Impulses aufgetragen, um doppelte von einzelnen Zellen zu unterscheiden und so die Verfälschung durch gleichzeitig die Detektoren passierende Zellen als zweifach gewertete Events zu verhindern. Aus diesem Gate wurden dann die einzelnen CD45^{pos} Zellen als Leukozyten definiert. Anschließend wurden die Gates so gesetzt, dass sich gegenseitig ausschließende Merkmale gegeneinander aufgetragen wurden, um weiter doppelte Events zu eliminieren.

Die CD45^{pos}CD14^{pos}CD8^{neg}CD3^{neg} Treffer wurden als Monozyten definiert. Diese konnten dann noch je nach Intensität der Marker CD14 und CD16 in klassisch, intermediär und alternativ aktivierte Monozytenpopulationen unterteilt werden.

Weiterhin wurden aus den Leukozyten die CD3^{pos}CD14^{neg}CD16^{neg} mit niedriger Granularität die T-Zellen definiert. Diese wiederum konnten in CD8^{pos}-zytotoxische und CD4^{pos}-Helfer-T-Zellen unterteilt werden. Aus den Helfer-T-Zellen konnten weiterhin die Populationen der CD127^{low}CD25^{pos} regulatorischen T-Zellen, der CD127^{neg}CD25^{neg}-Effektor-T-Zellen und der CD127^{pos}CD25^{low/neg} naiven bzw. Gedächtnis-T-Zellen definiert werden.

Die Definition dieser drei T-Zell-Untergruppen wurde bereits in der Literatur als schwierig beschrieben (97). Die als essentiell beschriebenen Oberflächenmarker CD127, CD25 und CD4 wurden alle gefärbt, FoxP3, welches die Definition erleichtert, ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht färben, da es eine Permeabilisierung der Zellmembran und mehrere Waschschriffe erfordert hätte (97). Dies wiederum wäre nicht vereinbar mit dem quantitativen Ansatz der hier gewählten „no lyse-no wash“ Methode. Unsere Färbung gibt folglich nur einen sehr groben Überblick über die T-Zell-Untergruppen, aus finanziellen und technischen Gründen konnte aber nur dieses Antikörperpanel definiert werden. Da Literaturarbeiten darauf hindeuteten, dass

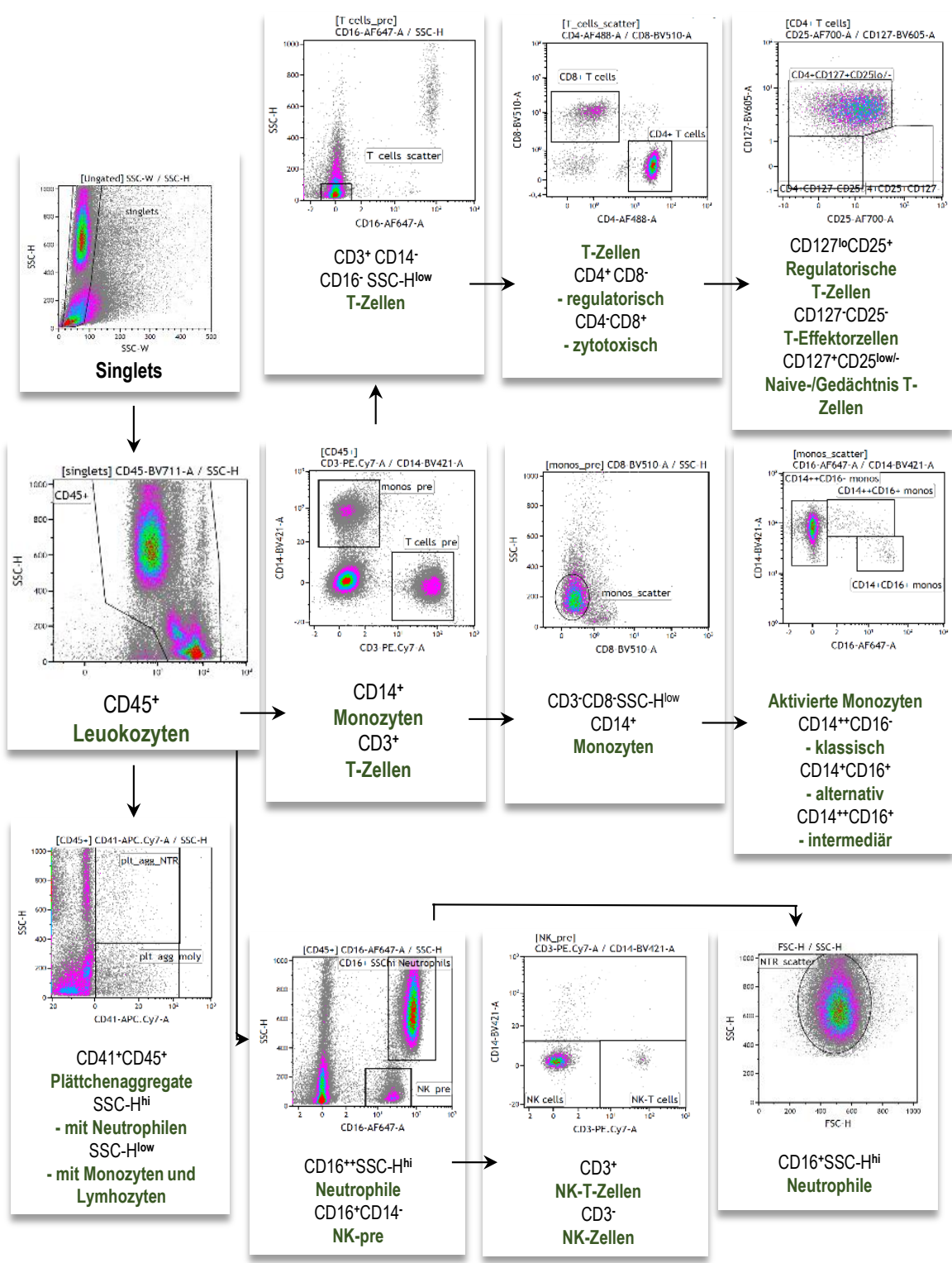


Abbildung 4: Exemplarisches Gating der Leukozytensubpopulationen.

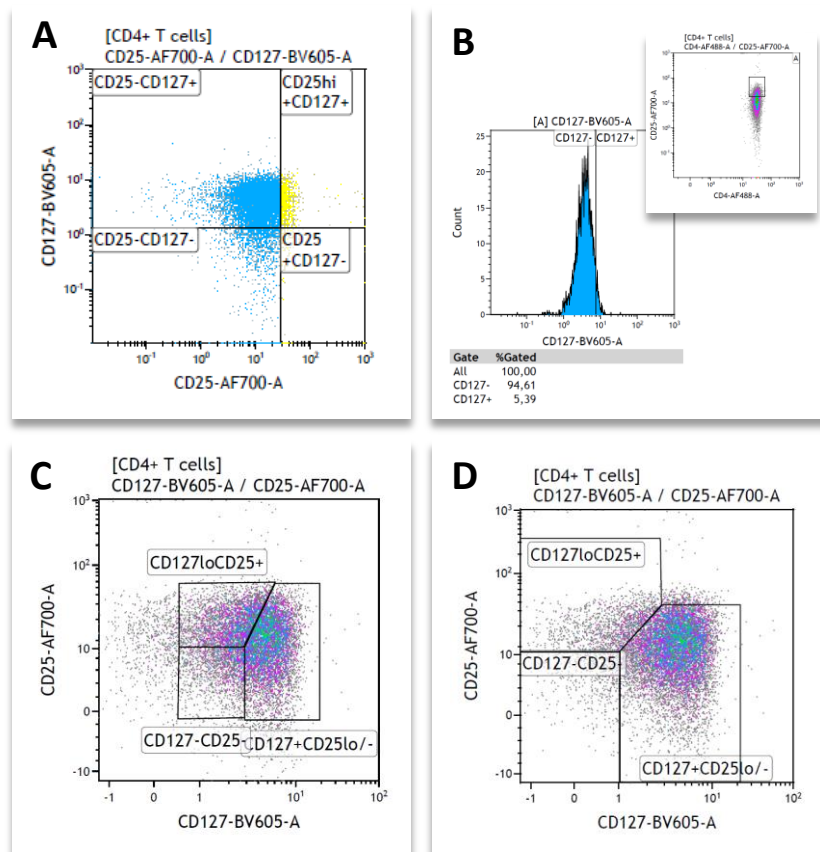


Abbildung 5: **Gatingstrategien zur Definition der Subpopulationen der CD4⁺-T-Zellen.**

A: Gating mit Quadranten von CD4⁺-T-Zellen nach CD25/CD127

B: Gating mittels Histogramms: In einem DotPlot wurden CD4⁺CD25^{high}-T-Zellen definiert. Diese wurden in einem Histogramm nach CD127 dargestellt. Die Zellen wurden bis zu einem Cutoff von 5% als CD127^{low/-} definiert.

C: Gating mit Polygons

D: Gating mit Polygons: Gates angepasst mittels FMO-Kontrollen

Treg-Zellen (CD25^{pos}) möglicherweise eine bedeutende Rolle in der chronischen Inflammation spielen (98), haben wir uns für die Kombination CD127-vs-CD25 entschieden. Aufgrund des seltenen Vorkommens von Treg-Zellen waren die Populationswolken leider nicht sehr deutlich abzugrenzen. Über sogenannte fluorescence-minus-one-Kontrollen (FMO) wurden bestmöglich die Abgrenzungen zu CD127- und CD25-negativen Bereichen gezogen. Bei FMO-Kontrollen handelt es sich um Gegenproben, bei der alle Antikörper außer dem zu definierenden gefärbt werden, um so in der Durchflusszytometrie die Überlappungen herauszurechnen. Weiterhin wurde sich an den angegebenen Gating-Strategien aus der Literatur sowie den Herstellerangaben mit Einfügen von Polygons orientiert (98–100). In anderen Beispielen aus der Literatur wurden auch Quadranten (97, 101) und das Gating über Histogramme,

indem aus $CD4^{pos}CD25^{high}$ definierten Zellen die ersten 95% als $CD127^{low/neg}$ definiert wurden (102), beschrieben. Diese Strategien haben für unsere Messungen nicht gut funktioniert. Bei dem Gating mittels Quadranten war die Abgrenzung insbesondere zwischen $CD25^{pos}$ und $CD25^{low/neg}$ nicht gut zu treffen. Die Definition über übliche prozentuale Anteile der Populationen war nicht überzeugend, da einerseits die $CD25$ -Intensitäten zu stark schwankten und andererseits so die Relationen der drei Populationen nicht ergebnisoffen analysiert würden (Abbildung 5).

Weiterhin wurden aus den Leukozyten Gates für $CD16^{pos}CD14^{neg}CD3^{neg}$ -NK-Zellen und $CD16^{pos}CD14^{neg}CD3^{pos}$ -NK-T-Zellen erstellt. Die $CD41^{pos}CD45^{pos}$ Treffer wurden als Plättchenaggregate mit Neutrophilen ($SSC-H^{hi}$), Monozyten oder Lymphozyten ($SSC-H^{low}$) definiert.

3.4 Charakterisierung der MV

3.4.1 Färbung der MV

Zur Bestimmung der MV wurde das bei $-80^{\circ}C$ eingefrorene Plasma aufgetaut und mit fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen $CD3$, $CD4$, $CD8$, $CD14$, $CD16$, $CD25$, $CD41$, $CD45$, $CD127$ und $CD144$ sowie Annexin V gefärbt.

Dazu wurde das Plasma nach dem Auftauen zunächst bei 1500 rcf und $4^{\circ}C$ für 10 min zentrifugiert. Dann wurden 100 μ l des Überstands in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, ohne das Pellet zu berühren.

Zur Färbung wurde dann ein Master Mix aus Antikörpern in Annexin Puffer mit $CaCl_2$ erstellt. Für den Puffer wurden 5 ml Annexin Puffer mit 100 μ l 1 M $CaCl_2$ doppelt filtriert. Dann wurden für jede zu färbende Probe je 5 μ l Puffer sowie je 5 μ l von jedem Antikörper zusammengefügt. Der Master Mix wurde dann für 20 min bei 16 000 rcf und $4^{\circ}C$ zentrifugiert, um Aggregate zu pelletieren.

Zu jeder Plasmaprobe (100 μ L) wurde dann 55 μ l der Antikörpermischung hinzugegeben sowie 400 μ l Annexin Puffer. Die Proben wurden gemischt und anschließend für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert.

Anschließend wurden die MV-Profile der Plasmaproben durchflusszytometrisch mit einer Geschwindigkeit von 25 μ l/min mit 10 min pro Probe gemessen.

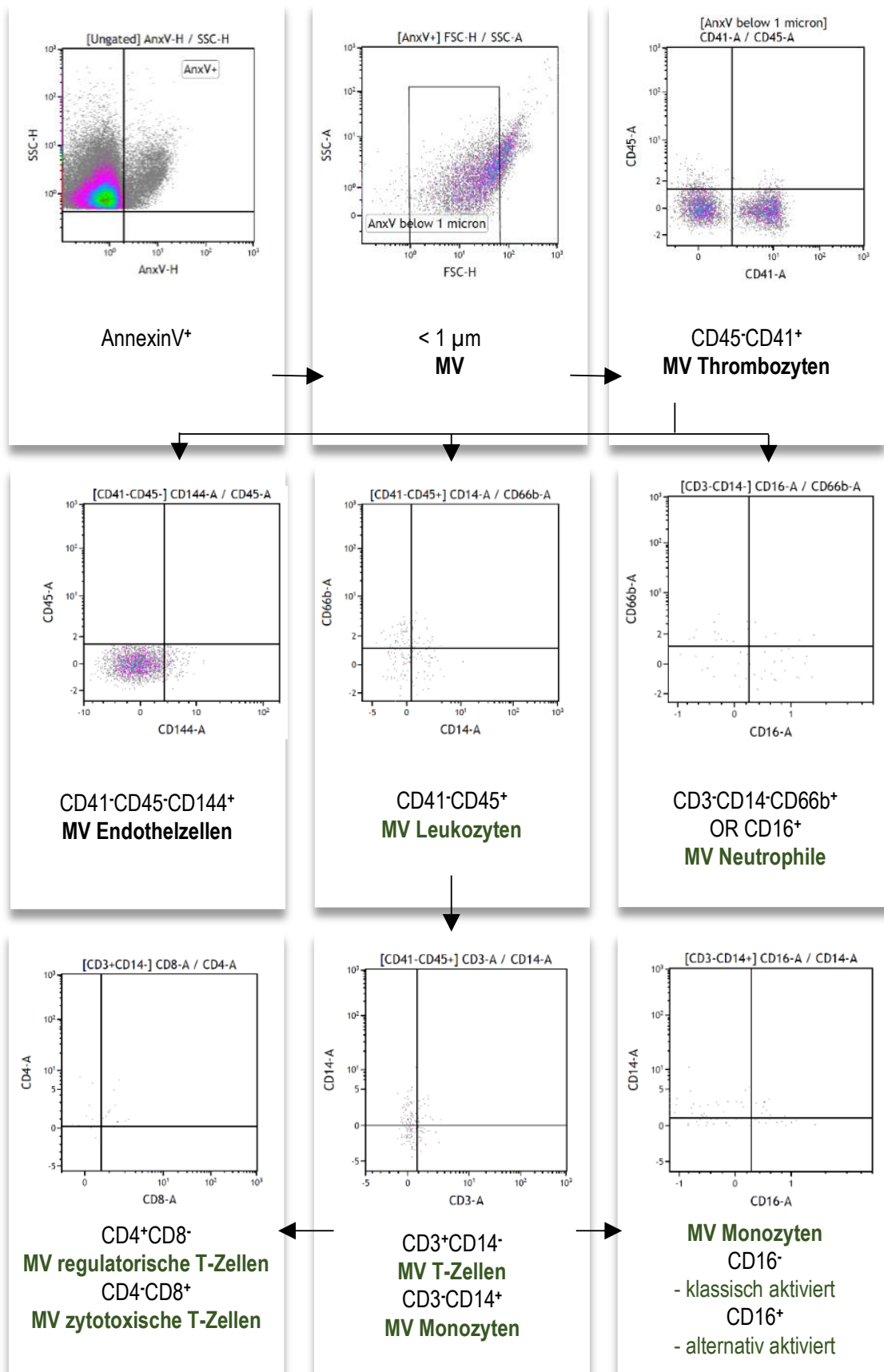


Abbildung 6: Exemplarisches Gating der MV der Thrombozyten, Endothelzellen und Leukozytensubpopulationen. MV = Mikrovesikel

3.4.2 Gating der MV

Die Messungen wurden mit der Software „Kaluza analysis“ ausgewertet. Beim Gating wurden im ersten Schritt über den SSC-A und Annexin V die einzelnen Treffer, Singlets, bestimmt. Die Annexin V^{pos} Singlets mit einer Größe unter 1 µm wurden als MV definiert. Den CD41^{neg}CD45^{neg}CD144^{pos} MV wurde ein endothelialer Ursprung zugeordnet. Die CD41^{neg}CD45^{pos} Treffer wurden als leukozytäre MV definiert. Weiterhin wurden die verschiedenen Subpopulationen der leukozytären Ursprungszellen der MV definiert. So wurden CD8^{pos} zytotoxische T-Zellen, CD4^{pos} regulatorische T-Zellen, bei denen weiterhin der Marker CD127 bestimmt wurde, CD14^{pos} Monozyten mit alternativer und klassischer Aktivierung sowie CD66b^{pos} bzw. CD16^{pos} Neutrophile als Ursprungszellen der detektierten MV definiert. Die Gatingstrategie ist exemplarisch in Abbildung 6 dargestellt.

3.5 Zytokinmessung mittels Cytometric Bead Assay

Zur genaueren Charakterisierung der Leukozytenaktivierung wurden die Zytokine im Plasma gemessen. Dazu wurde das Flex Set des Cytometric Bead Assay (CBA) der Firma BD Biosciences verwendet. Dabei wurden die Zytokine an Capture Beads gebunden, die in einem zweiten Schritt mittels Detection Reagents gefärbt wurden, sodass sie durchflusszytometrisch gemessen werden konnten. Gemessen wurden IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-6, IL-8, IL-1β, IL-13 und TNF-α. Diese Zytokine wurden gewählt, da sie typische Marker der Gefäßinflammation und Atherosklerose sind oder eine Rolle bei der Makrophagenpolarisation spielen (Tabelle 4).

Zu Beginn wurde eine Standardkurve mit den Standards der CBA Flex Sets erstellt. Dazu wurden die sogenannten „Spheres“ der Standards in 4 ml Assay Diluent durch Pipettieren gelöst und für 15 min bei RT inkubiert. Daraus wurde dann eine Verdünnungsreihe mit einer maximalen Verdünnung von 1:256 sowie eine Negativkontrolle mit ausschließlich Assay Diluent erstellt. Dann wurden die Capture Beads für die Proben vorbereitet. Dazu wurden 0,5 µl pro Plasmaprobe der entsprechenden Capture Beads in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Zum Waschen wurden 500 µl Wash Buffer hinzugefügt und bei 200 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 50 µl pro Plasmaprobe Capture Bead Lösung für Serum oder Plasma gelöst und anschließend 15 min bei RT inkubiert. Die Plasmaproben wurden bei 1500 rcf und 4°C für 10 min zentrifugiert. Es wurden je 50 µl des Überstands in Röhrchen gegeben.

Tabelle 4: **Übersicht der gemessenen Zytokine mit ihrem Ursprung und ausgewählter Wirkungen**

Modifiziert nach Tabellen aus *Grundwissen Immunologie (2019)*, S. 315-18, und *Janeway Immunobiologie (2018)*, S. 1069-72, 75 (103, 104).

Zytokine	Produzierende Zellen	Wirkungen (ausgewählt)
IFN-γ	T-Zellen NK-Zellen Neutrophile ILC1-Zellen Intraepithliale Lymphozyten	Induziert klassische Makrophagenaktivierung zu Typ M1 Erhöhte Expression von MHC-Molekülen und Komponenten des Antigenprozessierungssystems IG-Klassenwechsel Hemmt T _H 2- und T _H 17-Zellen
IL-1β	Makrophagen nach Inflammasomaktivierung Epithelzellen	Fieber, T-Zell-Aktivierung, Makrophagenaktivierung Typisch bei Gefäßinflammation und Atherosklerose
IL-4	T-Zellen Mastzellen ILC2	B-Zell-Aktivierung, IgE-Wechsel, induziert Differenzierung zu T _H 2-Zellen Induziert alternative Makrophagenpolarisation zu Typ M2a
IL-6	T-Zellen Makrophagen Endothelzellen Muskelzellen Adipozyten	Wachstum und Differenzierung von T- und B-Zellen Chronische Inflammation Akute Phase Proteine Fieber
IL-8 (CXCL8)	multipel	Chemokin: chemotaktisch für Neutrophile, Basophile, T-Zellen Proinflammatorisch Proatherosklerotisch
IL-10	Makrophagen Dendritische Zellen T- und B-Zellen	Wirksamer Inhibitor von Makrophagenfunktionen Induziert alternative Makrophagenpolarisation zu Typ M2c
IL-13	T-Zellen ILC2-Zellen	Induziert alternative Makrophagenpolarisation zu Typ M2a Hemmt Produktion inflammatorischer Zytokine durch Makrophagen Hemmt T _H 1-Zellen Wachstum und Differenzierung der B-Zellen Allergien, Asthma
TNF-α	Makrophagen NK-Zellen T-Zellen Adipozyten	proinflammatorisch Endothelaktivierung Typisch bei Gefäßinflammation und Atherosklerose

Zu jedem Röhrchen wurden dann 50 µl der Capture Bead Lösung gegeben, vorsichtig gemischt und bei RT für eine Stunde inkubiert. Zwischenzeitlich wurden die entsprechenden PE Detection Reagents in gleicher Konzentration wie die Capture Beads zusammengefügt.

Zu jedem Teströhrchen wurden dann 50 µl der Detection Reagent Lösung gegeben und bei RT zwei Stunden inkubiert. Dann wurden die Proben mit je 1 ml Wash Buffer gewaschen und die Pellets anschließend in je 300 µl Wash Buffer gelöst. Die Proben wurden noch am selben Tag durchflusszytometrisch am Attune NxT acoustic flow cytometer gemessen.

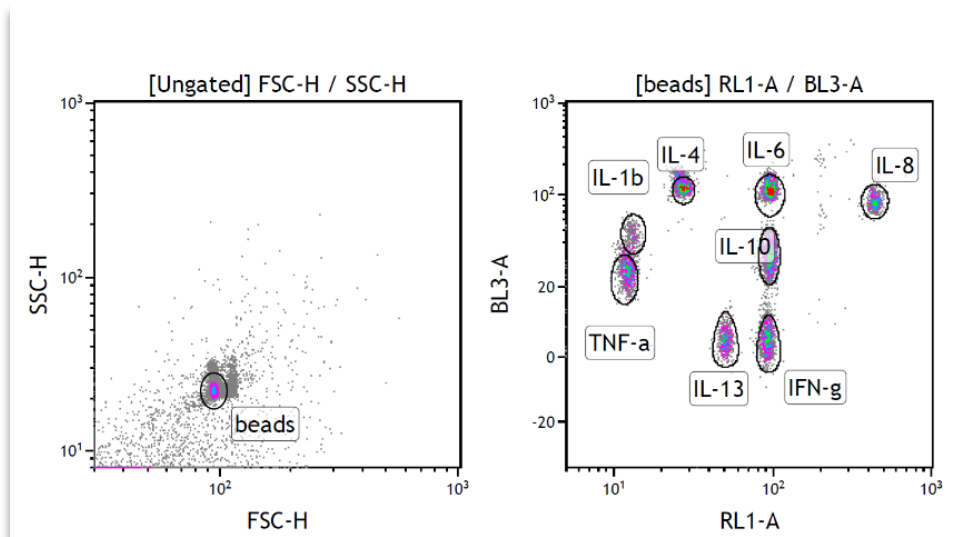


Abbildung 7: **Repräsentative Gates der Zytokine im Plasma mit Kaluza analysis.**

Die Auswertung erfolgte mit Kaluza Analysis. Die Gatingstrategie ist exemplarisch in Abbildung 7 dargestellt. Die Einzelbeads wurden zunächst über den SSC-H und den FSC-H definiert. Die einzelnen Zytokine wurden dann über ihre Position im BL3-A und RL1-A Plot mithilfe der Angaben des Herstellers identifiziert. Die eigentliche gebundene Zytokinmenge wurde mithilfe der Intensität des PE-gebundenen Detektionsantikörpers im Kanal BL2 ermittelt (Median). Zur genauen Quantifizierung wurde die Standardkurve verwendet.

3.6 Untersuchung der Differenzierung von THP1-Zellen zu Makrophagen unter dem Einfluss von Plasma

Monozyten der THP1-Zelllinie wurden in Kulturmedium Gibco RPMI 1640 mit 5% FCS, 7,5 mM HEPES, 0,5 mM Pyruvat und 1% Penicillin/Streptomycin mit je 1×10^6 Zellen pro 5 ml Medium kultiviert. Pro Patient:in wurden 1,7 ml der Zellen in ein Well einer 6-Well-Platte gegeben und mit 170 μ l der entsprechenden Plasmaprobe versetzt bzw. mit 170 μ l FCS zu den Wells für die Kontrollen. Die Zellen wurden dann für drei Tage bei 37°C inkubiert.

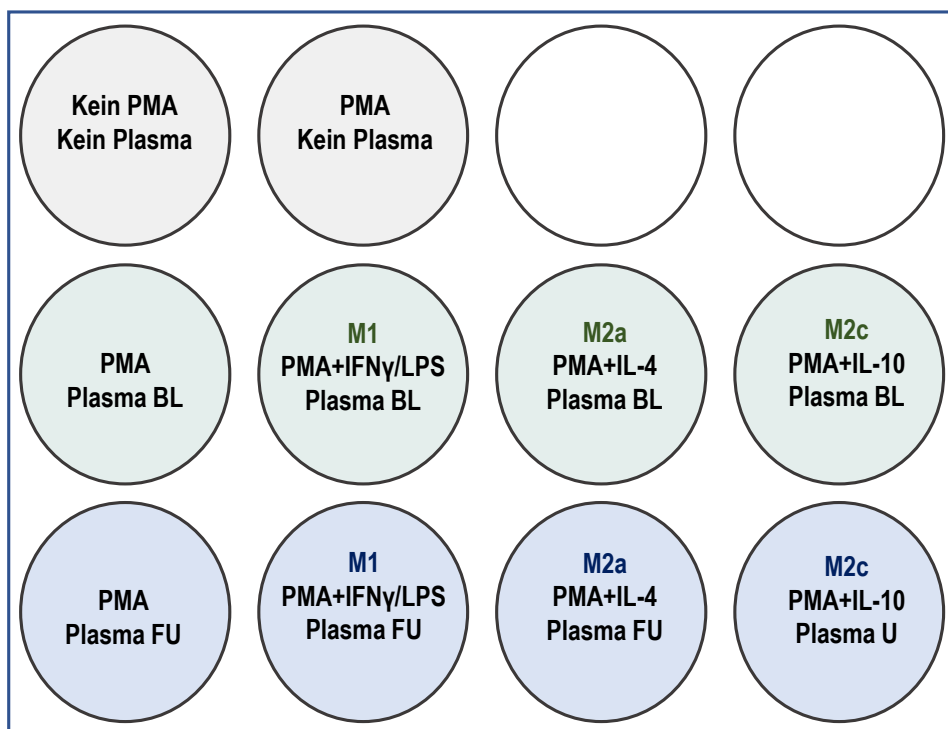


Abbildung 8: **Verteilung der THP-1-Proben auf 12-Well-Platten.**
BL = Baseline, FU = Follow-Up, IFN γ = Interferon- γ , IL = Interleukin,
LPS = Lipopolysaccharid, PMA = Phorbol 12-Myristat-13-Acetat-Lösung.

Anschließend wurden die Zellen den Wells entnommen und in 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben und bei 300 xg und RT für 10 min zentrifugiert. Die Pellets wurden in 4 ml RPMI Medium gelöst. Diese wurden dann auf 12 Well Platten mit 1 ml/Well verteilt, sodass es pro Patient:in 4 Wells gab. Zu jedem Well wurden dann 10 μ l Phorbol 12-Myristat-13-Acetat-Lösung (PMA) in einer Verdünnung von 1:123 hinzugegeben und

dann für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Pro Platte gab es eine Kontrolle ohne Plasma mit PMA und eine Kontrolle ohne Plasma und ohne PMA (Abbildung 8).

Die Platten wurden dann bei 300 x g bei RT für 10 min zentrifugiert. Das alte Medium wurde entfernt und frisches Medium sowie 100 µl des Patient:innenplasmas hinzugefügt. Dieses wurde zuvor bei 1500 rcf bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert.

Tabelle 5: **Makrophagenpolarisierung durch Zytokine und charakteristische Oberflächenmarker.** (105–108)

Zytokine	Polarisierung	Oberflächenmarker
IFN-γ + LPS	M1-Polarisierung	CD86 ⁺ , CD206 ⁻ , CD163 ⁻
IL-4	M2a-Polarisierung	CD163 ⁺ , CD206 ⁺ , CD86 ⁻
IL-10	M2c- Polarisierung	CD163 ⁺ , CD206 ⁻ , CD86 ⁻

Zu den Wells aller Patient:innen wurden dann 1 µl von 10 ng/µl LPS und 10 µl von 100 ng/µl IFNγ zur M1-Polarisierung, 2 µl von 10 ng/µl IL-4 zur M2a-Polarisierung oder 2 µl von 10 ng/µl IL-10 zur M2c-Polarisierung gegeben bzw. eines als Kontrolle belassen (Tabelle 5). Die Zellen wurden erneut über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zum Ernten der Zellen wurde das Medium mit den nicht-adhären Zellen verworfen und die Wells dann noch einmal mit 500 µl PBS mit 2 mM EDTA gewaschen. Dann wurden die Wells mit 500 µl 1:1 Trypsin/EDTA in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter Spülung mit PBS mit 2 mM EDTA in FCS gesammelt. Es erfolgte eine Sichtkontrolle unter dem Mikroskop. Falls noch viele Zellen hafteten, wurden die Schritte zum Lösen wiederholt.

Dann wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt. Dazu wurde ein Master Mix mit 1 µl AK in 100 µl PBS und 2 mM EDTA und 2 % FCS pro Probe hergestellt. Es wurden spezifische Antikörper gegen CD45, CD86, CD 163 und CD206 verwendet.

Die Makrophagen wurden bei 300 x g bei RT für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann mit 100 µl des Master Mix gelöst. Die Proben wurden dann für 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde dann in 300 µl FACS-Fix gelöst und bei 4°C im Dunkeln bis zur Messung verwahrt.

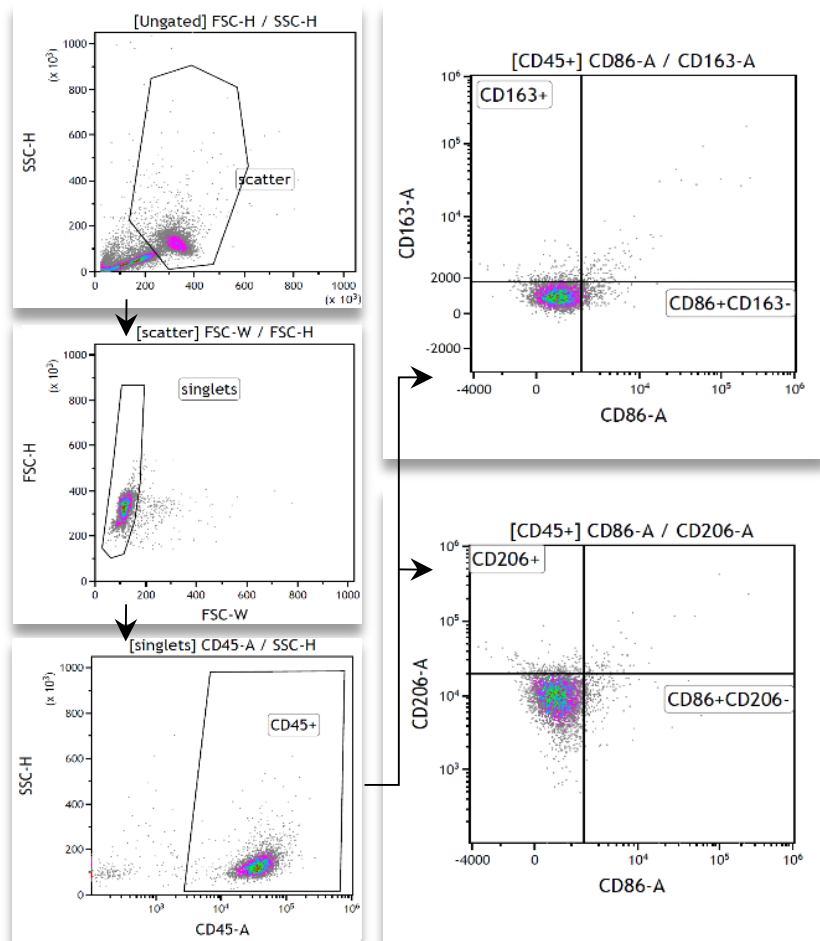


Abbildung 9: **Repräsentatives Gating der polarisierten Makrophagen.**

Die Proben wurden am Durchflusszytometer gemessen. Es wurden 100 µl jeder Probe gemessen. Es erfolgten stets Waschungen mit Bleach und PBS zwischen zwei Messungen.

Die Messungen wurden dann mittels Kaluza Analysis analysiert. Die Gatingstrategie ist exemplarisch in Abbildung 9 dargestellt. Es erfolgte zunächst die Festlegung der Singlets über die Größe mittels FSC und SSC. Dann wurden die CD45^{pos}-Singlets als

Leukozyten definiert. Aus diesem Gate ließen sich dann mit den Markern CD163, CD206 und CD86 die verschiedenen aktivierten Makrophagen definieren.

Die M1-Makrophagen wurden als CD86^{pos}, aber CD206^{neg} und CD163^{neg} definiert. Die M2a-Makrophagen wurden als CD163^{pos} und CD206^{pos}, aber CD86^{neg} definiert. Die M2c-Makrophagen wurden als ausschließlich CD163^{pos} definiert (Tabelle 5).

3.7 Proximity Extension Assay: Bestimmung der Plasmaproteine

Plasmaproben von 10 µl pro Patient:in und Zeitpunkt wurden zur Durchführung eines Proximity Extension Assays (PEA) zu dem externen Dienstleister Olink nach Stockholm geschickt. Mithilfe des Assays „Olink Cardiometabolic“ konnten die nachfolgend aufgelisteten kardiometabolischen Parameter gemessen werden (Abbildung 10). Das PEA beruht auf einer quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR). Pro Analyten werden zwei spezifische Antikörper verwendet, die je mit einem einzelsträngigen Oligonukleotid gekoppelt sind. Wird ein Analyt von beiden spezifischen Antikörpern erkannt, können die Einzelstränge hybridisieren und in einem qPCR-Ansatz amplifiziert werden und so sehr spezifisch auch niedrig-abundante Analyten quantitativ detektieren.

3.8 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der pseudonymisierten Daten wurde MicrosoftExcel und R verwendet. Die Kontrolle der Plausibilität und Qualität der sowohl der klinischen Daten als auch der FACS-Ergebnisse erfolgte mit MicrosoftExcel. Die Berechnungen und graphische Darstellung der Ergebnisse mit R und R-Studio erfolgten unter Verwendung der Libraries *factoextra* (Abbildungen 11-20), *writexl* (Abbildungen 11-20), *Hmisc* (Abbildungen 11-20), *ggplot2* (Abbildungen 11-20), *RColorBrewer* (Abbildungen 11-20), *DescTools* (Abbildung 11), *scaled* (Abbildung 11), *PairedData* (Abbildung 11), *corrplot* (Abbildungen 12, 14, 15), *network* (Abbildungen 14, 15), *igraph* (Abbildungen 14, 15), *gridextra* (Abbildung 16), *Rtsne* (Abbildung 16), *cluster* (Abbildung 16), *Nbclust* (Abbildung 16), *clustree* (Abbildung 16) und *mice* (Abbildung 16). Weitere Graphen wurden mit Excel erstellt (Volcano Plots, Abbildungen 14 und 15). Die Graphen wurden zudem mit PowerPoint bearbeitet (Linienstärke, -form und -farbe). Bei dem explorativen Charakter der Studie wurden Ergebnisse mit einem p-Wert von niedriger als 0,05 als statistisch signifikant bezeichnet und wie folgt gekennzeichnet: p<0,05 (*), p < 0,01 (**), p<0,001 (***).

Biomarker des Olink Cardimetabolic PEA

Angiogenin (ANG)
 Angiopoietin-related protein 3 (ANGPTL3)
 Apolipoprotein M (APOM)
 Beta-Ala-His dipeptidase (CNDP1)
 Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1 (ST6GAL1)
 C-C motif chemokine 14 (CCL14)
 C-C motif chemokine 18 (CCL18)
 C-C motif chemokine 5 (CCL5)
 Cadherin-1 (CDH1)
 Carbonic anhydrase 1 (CA1)
 Carbonic anhydrase 3 (CA3)
 Carbonic anhydrase 4 (CA4)
 Cartilage acidic protein 1 (CRTAC1)
 Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)
 CD59 glycoprotein (CD59)
 Coagulation factor VII (F7)
 Coagulation factor XI (F11)
 Collagen alpha-1(XVIII) chain (COL18A1)
 Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 1 (C1QTNF1)
 Complement C2 (C2)
 Complement factor H-related protein 5 (CFHR5)
 Complement receptor type 2 (CR2)
 Cystatin-C (CST3)
 Dipeptidyl peptidase 4 (DPP4)
 EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1)
 Endoglin (ENG)
 Fetuin-B (FETUB)
 Ficolin-2 (FCN2)
 Glutaminy-peptide cyclotransferase (QPCT)
 Granulysin (GNLY)
 Growth arrest-specific protein 6 (GAS6)
 Hepatocyte growth factor receptor (MET)
 Ig lambda-2 chain C regions (IGLC2)
 Insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP3)
 Insulin-like growth factor-binding protein 6 (IGFBP6)
 Integrin alpha-M (ITGAM)
 Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1)
 Intercellular adhesion molecule 3 (ICAM3)
 Interleukin-7 receptor subunit alpha (IL7R)
 L-selectin (SELL)
 Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2 (LTBP2)
 Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 1 (LILRB1)
 Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 2 (LILRB2)
 Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 5 (LILRB5)
 Lithostathine-1-alpha (REG1A)
 Liver carboxylesterase 1 (CES1)
 Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-a (FCGR2A)
 Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-B (FCGR3B/CD16)
 Lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1 (LYVE1)
 Lysosomal Pro-X carboxypeptidase (PRCP)
 Mannose-binding protein C (MBL2)
 Mast/stem cell growth factor receptor Kit (KIT)
 Membrane cofactor protein (CD46)
 Membrane primary amine oxidase (AOC3)
 Metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP1)
 Microfibrillar-associated protein 5 (MFAP5)
 Multiple epidermal growth factor-like domains protein 9 (MEGF9)
 Neural cell adhesion molecule 1 (NCAM1)
 Neural cell adhesion molecule L1-like protein (CHL1)
 Neurogenic locus notch homolog protein 1 (NOTCH1)
 Neuropilin-1 (NRP1)
 Neutrophil defensin 1 (DEFA1)
 Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (LCN2)
 Nidogen-1 (NID1)
 Oncostatin-M-specific receptor subunit beta (OSMR)
 Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase (PAM)
 Phospholipid transfer protein (PLTP)
 Plasma serine protease inhibitor (SERPINA5)
 Platelet glycoprotein Ib alpha chain (GP1BA)
 Platelet-activating factor acetylhydrolase (PLA2G7)
 Plexin-B2 (PLXNB2)
 Procollagen C-endopeptidase enhancer 1 (PCOLCE)
 Prolyl endopeptidase FAP (FAP)
 Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S (PTPRS)
 Regenerating islet-derived protein 3-alpha (REG3A)
 Serum amyloid A-4 protein (SAA4)
 SPARC-like protein 1 (SPARCL1)
 Superoxide dismutase [Cu-Zn] (SOD1)
 T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 4 (TIMD4)
 Tenascin (TNC)
 Tenascin-X (TNXB)
 Thrombospondin-4 (THBS4)
 Thyroxine-binding globulin (SERPINA7)
 Transcobalamin-2 (TCN2)
 Transforming growth factor beta receptor type 3 (TGFB3)
 Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 (TGFB1)
 Trypsin-2 (PRSS2)
 Tyrosine-protein kinase receptor Tie-1 (TIE1)
 Uromodulin (UMOD)
 Vascular cell adhesion protein 1 (VCAM1)
 Vasorin (VASN)
 Vitamin K-dependent protein C (PROC)

Abbildung 10: **Biomarker des „Olink cardiometabolic panels“**. Liste der 86 Biomarker, die mittels PEA gemessen wurden. (109)

Zur Untersuchung der Veränderungen wurden n-fold-Werte der klinischen und immunometabolischen Parameter als Quotient von Follow-Up zu Baseline für alle Patient:innen einzeln mit Microsoft Excel berechnet. Bei R wurde der gepaarte Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und die Benjamin-Hochberg-Adjustierung für alle Parameter durchgeführt, die gleichzeitig untersucht wurden. Anschließend wurden die Mediane der n-fold Veränderungen der einzelnen Parameter bei Microsoft Excel berechnet und graphisch gegen die jeweiligen adjustierten p-Werte aufgetragen.

Weiterhin erfolgten Korrelationsanalysen mit Spearman's r zwischen den klinischen Veränderungen über die Trainingsperiode einerseits und den absoluten Werten beider Messzeitpunkte, um Korrelationen zwischen inflammatorischem Status, Plasmaproteinen und klinischen Parametern zu untersuchen. Die Spearman-Korrelationen wurden mit R berechnet. Hier erfolgte die Benjamini-Hochberg-Adjustierung auf Multiples Testen. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Aus den Korrelationen wurden mit R Netzwerke gezeichnet.

Anschließend erfolgte eine Reduzierung der 7 für die Definition des MetS verwendeten Parameter (systolischer Blutdruck, diastolischer Blutdruck, Taillenumfang, HDL, Cholesteroll, Triglyzeride, NPG) und der VO_2 peak in $mlO_2/min \cdot kg$ Körpergewicht auf eine 2-dimensionale Matrix mittels T-distributed Stochastic Neighbour Embedding (t-SNE) mit R unter Verwendung der absoluten Werte beider Messzeitpunkte. Dabei wurden drei Cluster identifiziert. Zum Vergleich der drei Cluster wurden mit R Boxplots mit Medianen der absoluten Werte und der n-fold-Werte gezeichnet. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Clustern wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem LSD-Post-hoc-Test überprüft. Hier wurde ein $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden voraussichtlich unter dem Titel „**Immune changes associated to individual responses to exercise training in patients with metabolic syndrome**“ zur Publikation eingereicht.

Insgesamt konnten zur klinischen Auswertung Daten der 24 Patient:innen der ExMET-Studie und 38 Patient:innen der OptimEx -Studie verwendet werden. Es wurden 6 Experimente mit Vollblut- und Plasmaproben von 24 Patient:innen der ExMET-Studie zur Analyse immunologischer Parameter und Plasmaproteinkonzentrationen durchgeführt. Im Folgenden werden die klinischen Veränderungen des MetS nach der Trainingsperiode betrachtet und in Korrelationen zu immunometabolischen Parametern dargestellt.

4.1 Die individuelle Verbesserung der VO₂peak ist kein Indikator für die Verbesserung des MetS

Nach 16 Wochen supervidiertem Training der 24 Patient:innen der ExMET-Studie zeigt sich eine Verbesserung der VO₂peak zum Ausgangswert von $23,7 \pm 5,7$ ml/(min*kg) auf $25,8 \pm 7,1$ ml/(min*kg) als Marker der physischen Fitness über die gesamte Kohorte. Das betraf sowohl die absolute als auch die relative Verbesserung in Bezug auf Körpergewicht und den individuellen Voraussagewert. Zwischen den Trainingsprogrammen gab es dabei keine signifikanten Unterschiede. Es zeigten sich allerdings keine signifikante Verbesserung der MetS-definierenden Faktoren über die gesamte Kohorte (Abbildung 11 und Abbildung 12A). Die Patient:innen reagierten klinisch sehr unterschiedlich auf das Training (Abbildung 11). Dies legte eine individuellere Betrachtung der Veränderungen nahe.

In der Korrelationsmatrix nach Spearman wurde untersucht, ob die individuelle Verbesserung der VO₂peak mit individuellen Veränderungen der kardiovaskulären Risikofaktoren in Zusammenhang steht. Es zeigte sich ausschließlich, dass die Verbesserung der VO₂peak in [mlO₂/min*kg] mit einer Reduktion der NPG und einem verminderten diastolischen Blutdruck korreliert (Abbildung 12B). Bei Adjustierung auf multiples Testen konnten sich aber auch diese Korrelationen nicht bestätigen lassen. Auch bei den OptimEx-Patient:innen zeigte sich eine signifikante Verbesserung der VO₂peak. Diese Patient:innen zeigten außerdem eine signifikante Verbesserung der

TG, NPG, HDL und des Taillenumfangs (Abbildung 12C). Auch hier zeigte sich aber keine Korrelation zwischen der VO_2 peak -Verbesserung und den Verbesserungen der MetS-Faktoren (Abbildung 12D).

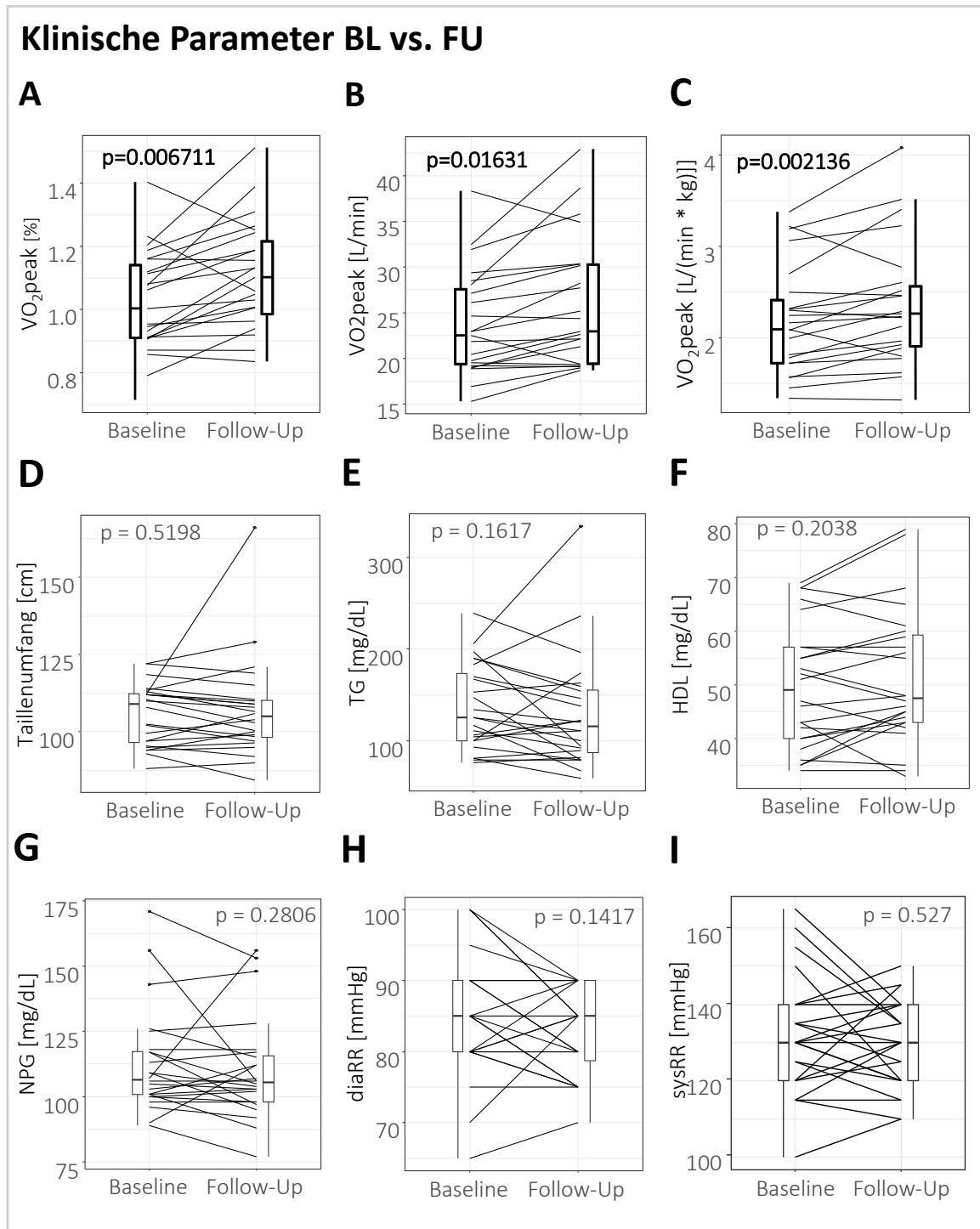


Abbildung 11: Veränderungen der MetS Parameter bei ExMET über die gesamte Kohorte von Baseline zu Follow-Up.

TG = Triglyzeride, NPG = Nüchternplasmaglucose, diaRR = diastolischer Blutdruck, sysRR = systolischer Blutdruck

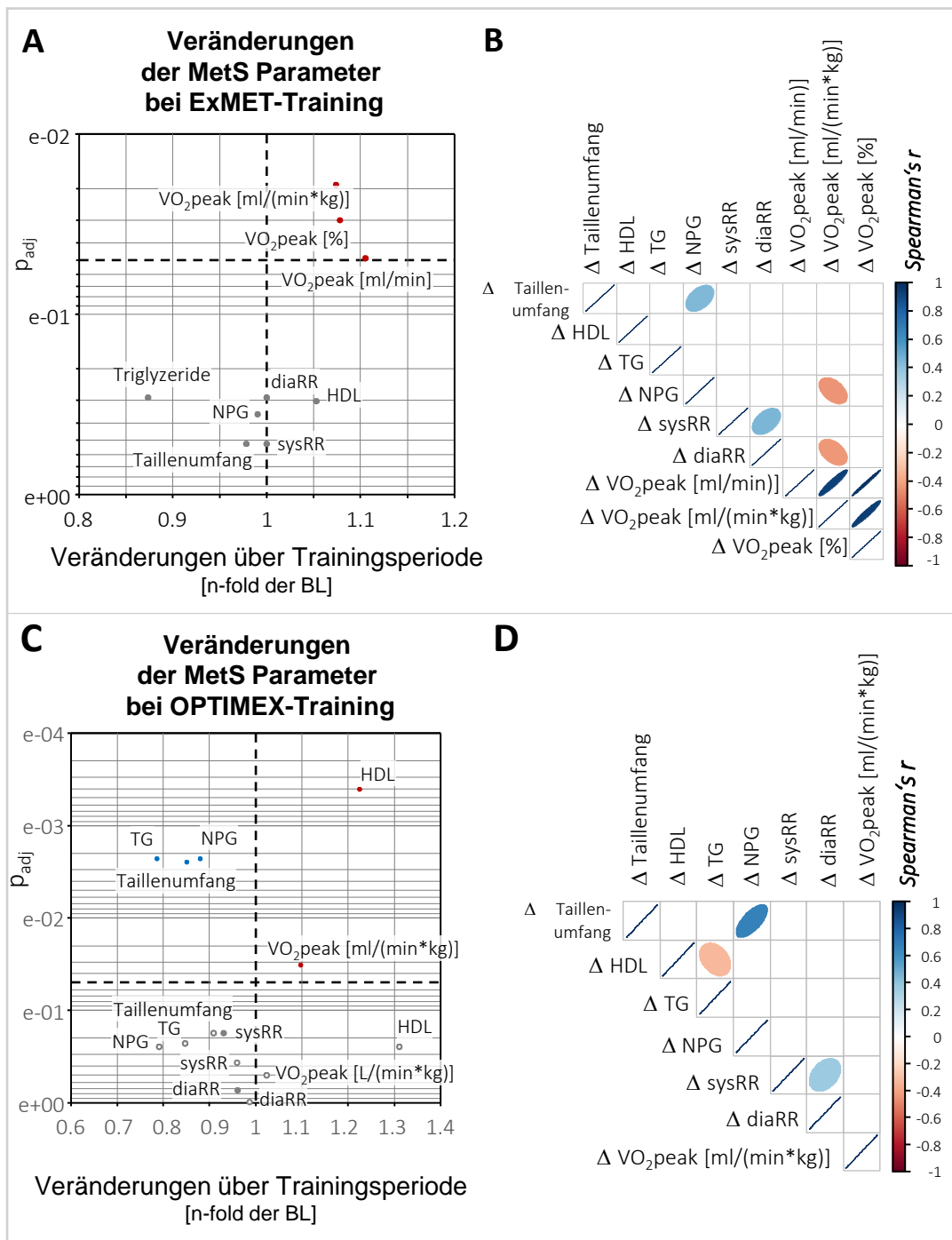


Abbildung 12: **Veränderungen der MetS-Parameter und deren Korrelationen mit Spearman's r .** **A:** Veränderungen der MetS Parameter bei ExMET über die gesamte Kohorte: Alleinige signifikante Verbesserung von VO_2peak nach 4-monatigem Training. Keine Verbesserung der MetS-Parameter. **B:** Dargestellte Korrelationen von Δ VO_2peak [ml/(min*kg)] zu Δ NPG und Δ diastolischer Blutdruck lassen sich nicht nach Korrektur für multiples Testen bestätigen. **C:** Veränderungen der MetS Parameter bei OptimEx über die gesamte Kohorte: Reduktion von TG, NPG und Taillenumfang, Erhöhung von HDL und VO_2peak nach 3-monatigem Training (HIIT oder MCT, gefüllte Kreise). Kontrollgruppe ohne Training (leere Kreise) zeigt keine signifikanten Veränderungen. **D:** Δ VO_2peak [ml/(min*kg)] der Interventionsgruppen zeigt keine Korrelationen zu MetS-Parametern. Δ = n-fold der BL, BL = Baseline, diaRR = diastolischer Blutdruck, NPG = Nüchternplasmaglukose, sysRR = systolischer Blutdruck, TG = Triglyzeride.

Das Training hat in beiden Studien zur Verbesserung der VO_2 peak geführt. Es zeigen sich zwar auch Korrelationen der VO_2 peak zu unterschiedlichen klinischen Parametern auf individueller Ebene, als Indikator zur Verbesserung des MetS über die gesamte Kohorte kann die VO_2 peak allerdings nicht herangezogen werden.

4.2 Individuelle Verbesserungen kardiometabolischer Zielparameter sind mit der Anzahl und Aktivierung von Leukozyten sowie der Plasmaproteinkonzentrationen assoziiert.

4.2.1 Veränderungen der Anzahl und Aktivierung von Leukozyten

Da Inflammation bei der Entstehung und Erhaltung des MetS eine große Rolle spielt, wurden Leukozyten und ihre Subpopulationen anhand ihrer Anzahl pro ml Blut, ihrer Größe und ihres putativen Aktivierungsstatus (Granularität, Aggregation mit Thrombozyten und MV-Ausschüttung) ausschließlich bei den Patient:innen der ExMET-Studie analysiert, da von Patient:innen der OPTIMEX Studie kein entsprechendes Material vorhanden war (Abbildung 13).

Es zeigte sich deutlich eine Reduktion der absoluten Leukozytenzahlen sowohl der gesamten $CD45^{pos}$ -Zellen als auch bei Aufteilung in Neutrophile, $CD14^{hi}CD16^{neg}$ "klassische" und $CD14^{hi}CD16^{pos}$ "intermediäre" Monozyten, NK-Zellen und $CD25^{neg}CD127^{neg}$ Effektor- und $CD25^{pos}CD127^{neg}$ regulatorischen T-Zellen von Beginn bis Ende des Trainingsprogramms (Abbildung 13).

Bei den Aktivierungsmarkern zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse zwischen den Zelltypen. Die Granularität der NK-Zellen und der NK-T-Zellen reduzierte sich im Verlauf, während die Granularität der Neutrophilen sowie der klassisch aktivierten $CD14^{hi}CD16^{neg}$ -Monozyten zunahm. Bei den klassisch aktivierten und intermediären Monozyten, den $CD25^{neg}CD127^{pos}$ naiven/zentralen T-Gedächtniszellen und $CD25^{neg}CD127^{pos}CD4^{pos}$ -T-Effektorzellen, $CD8^{pos}$ zytotoxischen T-Zellen, den NK- und NK-T-Zellen und Neutrophilen zeigte sich eine leichte Größenzunahme im Follow-Up (Abbildung 13). Obwohl sich die absoluten Zahlen der Thrombozytenaggregate mit Leukozytensubpopulationen verringerten, zeigte sich in Relation zu der reduzierten Gesamtleukozytenzahl ein Anstieg der Aggregationsneigung. Auch bei der Ausschüttung leukozytärer MV zeigte sich eine Erhöhung der MV-Ausschüttung

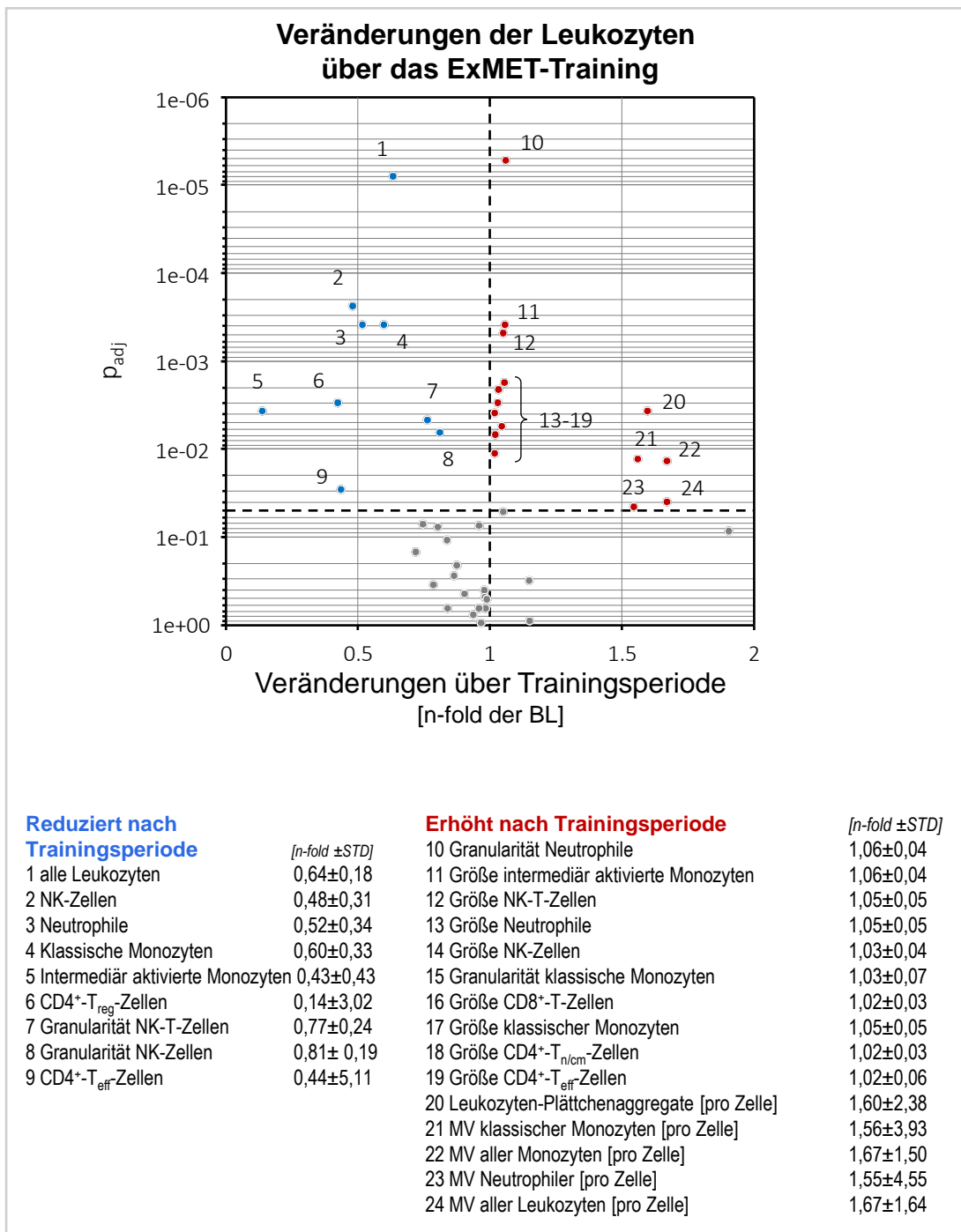


Abbildung 13: **Veränderungen der Immunzellen über die Trainingsperiode.** Gesamtleukozyten, NK-Zellen, Neutrophile, klassisch und intermediär aktivierte Monozyten, CD4⁺T_{reg}- und CD4⁺T_{eff}-Zellen, sowie die Granularität von NK- und NK-T-Zellen waren nach 4 Monaten Training reduziert (blau). Erhöht waren die Granularität von Neutrophilen und klassisch aktivierten Monozyten und die Größe der NK-, NK-T-, CD8⁺T-, CD4⁺T_{n/cm}-, CD4⁺T_{eff}-Zellen, der Neutrophilen und klassischen Monozyten. Weiterhin stieg die Anzahl der Leukozyten-Plättchenaggregate und der MV mehrerer Leukozytensubpopulationen (rot). MV = Mikrovesikel, STD = Standardabweichung

pro Zelle, während sich keine Veränderung der absoluten MV über die Trainingsperiode ergab (Abbildung 13). Zudem zeigte sich eine Reduktion endothelialer MV (Abbildung 13). Bei den Zelltypen, in denen sich keine signifikanten Unterschiede zeigten, sind ebenfalls wie bei den klinischen Parametern deutliche individuelle Unterschiede zu erkennen (Abbildung 13).

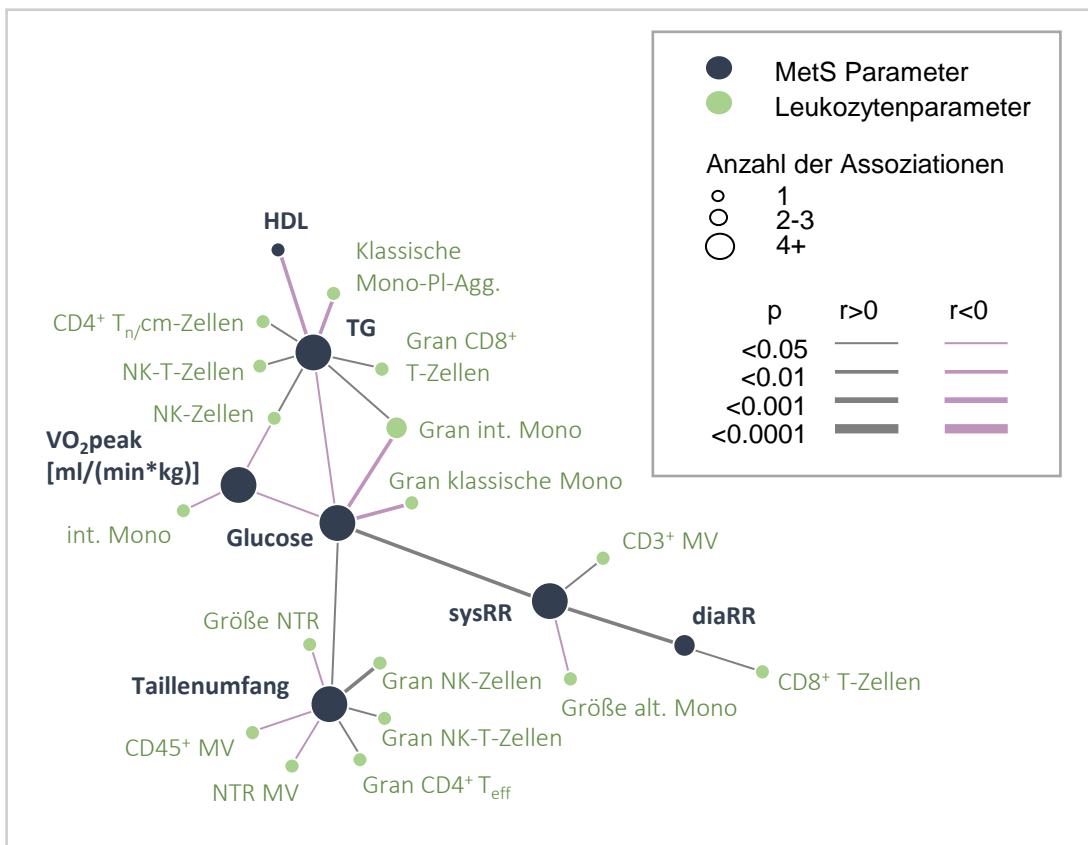


Abbildung 14: **Korrelationen mit Spearman's r absoluter Werten beider Messzeitpunkte zwischen MetS- und Leukozytenparametern.** Die Größe der Kreise zeigt die Anzahl der Assoziationen, die Strichstärke den p-Wert an. Positive Korrelationen sind grau, negative Korrelationen violett dargestellt.

alt. = alternativ, diaRR = diastolischer Blutdruck, Gran = Granularität, int. = intermediär, Mono = Monozyten, MV = Mikrovessel, NTR = Neutrophile, Pl-Agg. = Plättchenaggregate, sysRR = systolischer Blutdruck.

Weiterhin wurden die individuellen Korrelationen der Leukozytenparameter zu den klinischen Parametern über die gesamte Kohorte betrachtet. VO₂peak in [mlO₂/min*kg] zeigte eine negative Korrelation zur Anzahl der intermediär aktivierten Monozyten und der NK-Zellen (Abbildung 14). Die Triglyzeridlevel im Plasma korrelierten hingegen positiv mit der Anzahl an NK- und NK-T-Zellen sowie mit der Granularität der

CD8^{pos}-T-Zellen und der intermediär aktivierten Monozyten. Negativ sind sie mit Aggregaten aus klassischen Monozyten mit Thrombozyten assoziiert. Eine direkte Korrelation der TG zu VO₂peak zeigte sich hier nicht (Abbildung 14). Die Abnahme der Granularität der CD25^{neg}CD127^{neg}CD4^{pos} Effektor-T-Zellen, NK-Zellen und NK-T-Zellen korrelierte mit einer Abnahme des Taillenumfangs als Maß der zentralen Adipositas (Abbildung 14). Ein geringerer Taillenumfang war mit einer Erhöhung der CD45^{pos}-MV, Neutrophilen-MV und der Größe der Neutrophilen assoziiert. CD3^{pos}-T-Zell-MV, die Größe alternativ aktivierter Monozyten und die CD8^{pos}-T-Zellzahl sind mit dem Blutdruck korreliert (Abbildung 14).

4.2.2 Veränderungen der Plasmaproteinkonzentrationen

In der Gesamtkohorte zeigten sich von Trainingsbeginn zu Trainingsende keine signifikanten Veränderungen der Zytokinlevel im Plasma. In der Analyse von 86 Plasmaproteinen mit kardiometabolischer Relevanz mittels PEA zeigte sich eine signifikante Reduktion der Carboxylesterase 1 (CES1) sowie ein Anstieg des löslichen Interleukin-7-Rezeptors (IL-7R) in der gesamten Kohorte (Abbildung 15A). In den individuellen Korrelationsanalysen über die gesamte Kohorte zeigte sich keine Assoziationen von IL-7R zu anderen Parametern. CES1 war positiv mit den TG und negativ mit VO₂peak und der Größe der T-Effektorzellen korreliert (Abbildung 15B). Weiterhin zeigten sich einige Korrelationen zwischen Plasmaproteinkonzentrationen, klinischen und leukozytären Parametern (Abbildung 15B).

Da die Unterschiede in der Makrophagenpolarisierung eine bedeutende Rolle in der chronischen Inflammation des MetS spielen, wurden mögliche Unterschiede im Vergleich von Beginn zu Ende der Trainingsintervention in der Makrophagenpolarisierung untersucht. Dazu wurden THP-1 Monozyten zu Makrophagen differenziert und mit Plasma der Patient:innen kultiviert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Polarisierungsmarker CD86, CD163 und CD206. Die Induzierbarkeit des M2c Markers CD206 durch IL-4 war jedoch assoziiert mit geringeren Plasmaspiegeln von CA1 und PLXNB2, sowie höheren Plasmaspiegeln von TNF-a, NCAM1, MET, GNLY, NRP1 und CES1 (Abbildung 15B).

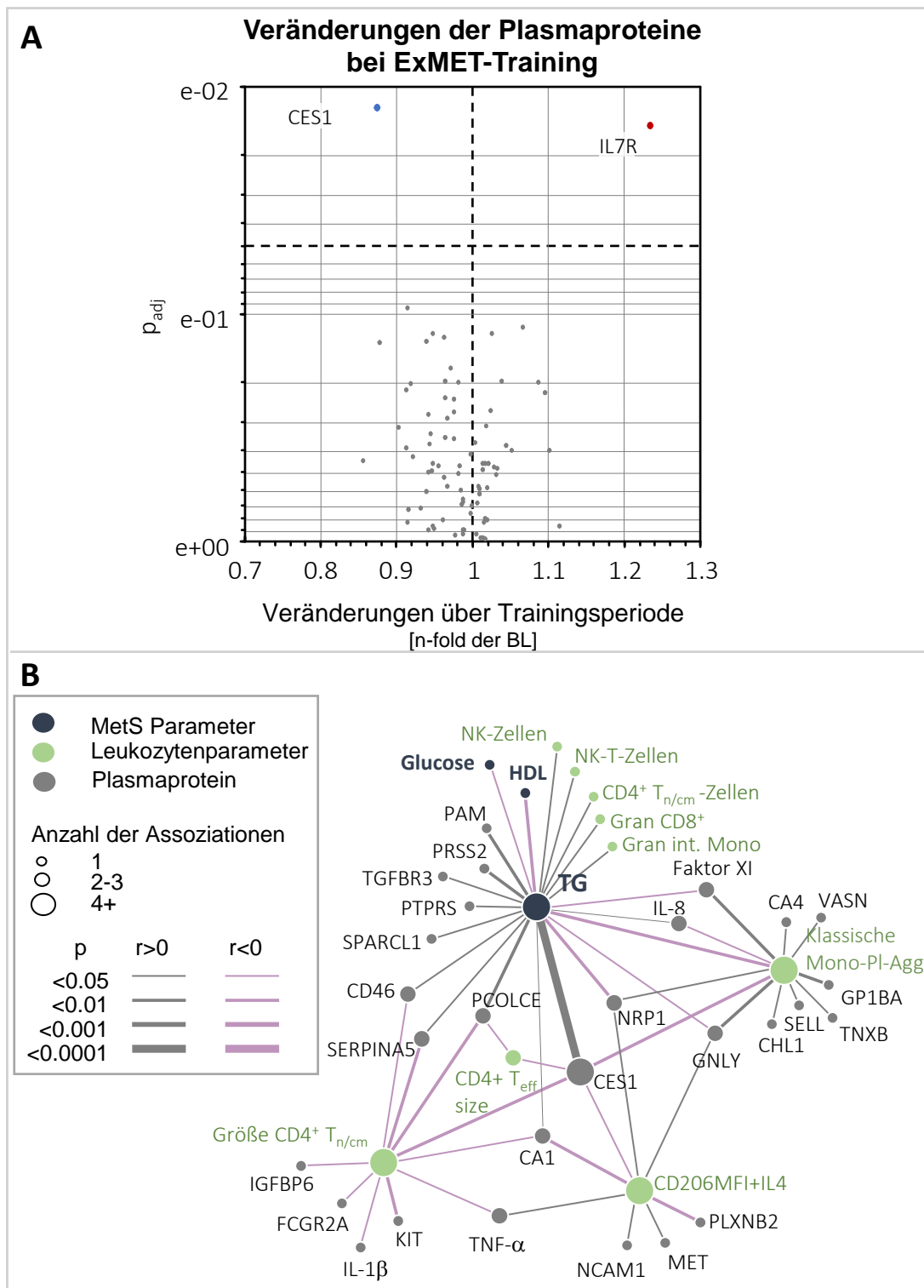


Abbildung 15: **A: Veränderungen der Plasmaproteine nach ExMET-Training.** Relative Erhöhung von IL-7R und Reduktion von CES1. Sonstige Plasmaproteine zeigen keine signifikanten Veränderungen. **B: Korrelationen mit Spearman's r zwischen klinischen Parametern, Leukozyten und Plasmaproteinen.** Die Größe der Kreise zeigt die Anzahl der Assoziationen, die Strichstärke den p-Wert an. Positive Korrelationen sind grau, negative Korrelationen violett dargestellt.

CES1= Carboxylesterase 1, Gran = Granularität, IL-7R = Interleukin-7-Rezeptor, int. = intermediär, Mono = Monozyten, PI-Agg. = Plättchenaggregate, TG = Triglyzeride.

4.3 Durch das kardiometabolische Outcome lassen sich drei verschiedene Cluster von Patient:innen identifizieren

Bei den Analysen über die gesamte Kohorte zeigte sich, dass ein bestimmtes Trainingsprogramm oder die Verbesserung der Fitness nicht notwendigerweise zur Besserung einzelner klinischer Parameter führt. Die Veränderungen der einzelnen Parameter waren sehr heterogen. Es zeigten sich individuelle Korrelationen zwischen klinischen Parametern, leukozytären Parametern und Plasmaproteinkonzentrationen. So stellte sich die Frage, ob bestimmte individuelle kardiometabolische oder immunozytäre Profile bestimmen bzw. als Marker anzeigen können, welche Patient:innen vom Training profitieren. Diese Theorie würde damit einhergehen, dass das MetS als Ansammlung individueller kardiovaskulärer Risikofaktoren definiert ist. Welche davon erfüllt werden, ist individuell. Es erfolgte eine individuellere Betrachtung der Patient:innen der OptimEx- und der ExMET-Studie durch eine Clusteranalyse mittels t-stochastic neighbourhood embedding (t-SNE) nach MetS-Kriterien. Dabei wurden drei Cluster definiert, die sich hauptsächlich in Lipiden, Glucose und Taillenumfang unterschieden, nicht aber in Blutdruck und VO_2 peak (Abbildung 16A-I). Cluster 1 lässt sich hier mit relativ geringem Taillenumfang, TG und NPG sowie höherem HDL als das Cluster mit der geringsten Krankheitslast beschreiben. Cluster 2 lässt sich als dyslipidämisch mit niedrigstem HDL und höchsten TG kategorisieren, während das Cluster 3 als hyperglykämisch mit dem höchsten NPG zu benennen ist.

Die Cluster wurden aus der Gesamtkohorte der Patient:innen der Studien OptimEx und ExMET ermittelt, sind aber auch bei alleiniger Betrachtung der ExMET-Patient:innen als repräsentative Stichprobe der Gesamtkohorte gültig. Die immunometabolischen Messungen konnten ausschließlich an den ExMET-Patient:innen erfolgen. Es erfolgt die Beschreibung der Cluster der ExMET-Kohorte.

4.3.1 MetS-Cluster 1

Die Patient:innen in Cluster 1 hatten einen geringeren Taillenumfang, geringere TG und höheres HDL als die Patient:innen in Cluster 2 (Abbildung 17A-C). Zudem zeigten sich hier höhere Apolipoprotein M-Level, passend zu dem höheren HDL (Abbildung 17G). Weiterhin hatten diese Patient:innen niedrigere Insulinkonzentrationen als die der anderen Cluster, aber höheres LDL (Abbildung 17E-F). Cluster 1 zeigt zudem geringere Level von Carboanhydrase 3 (CA3), Cadherin 1 (CDH1) und Lithostathine-1-alpha

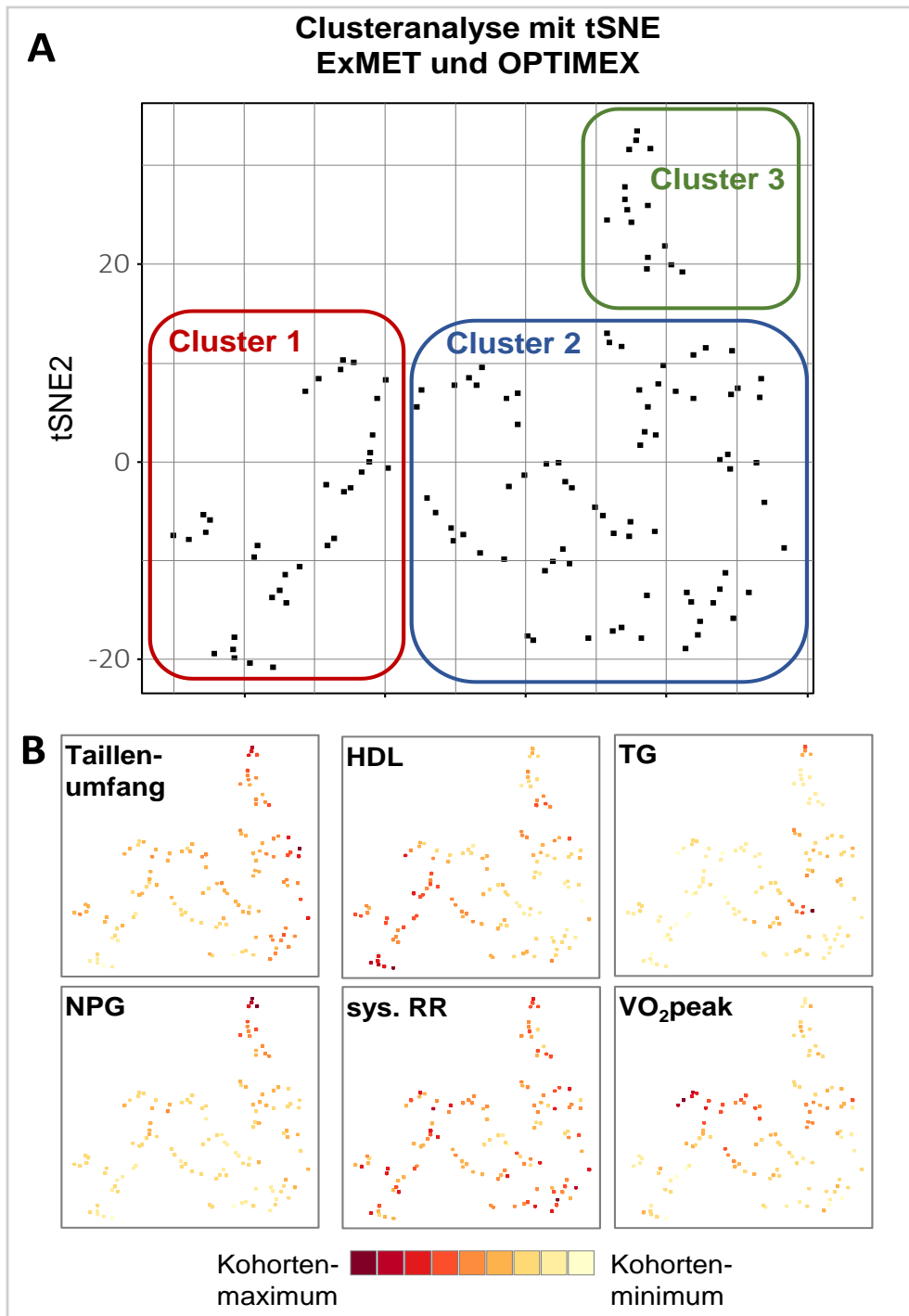
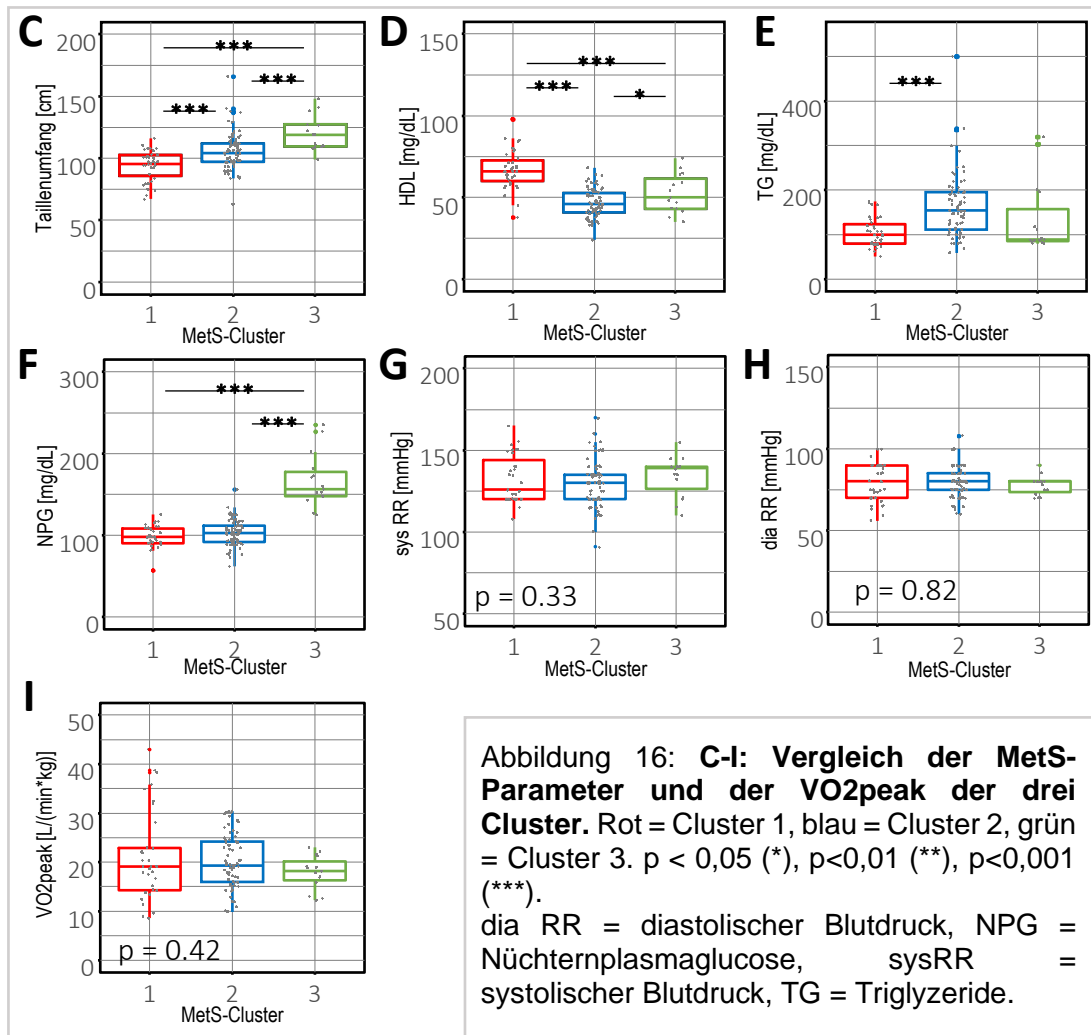


Abbildung 16: **Clusteranalyse mit tSNE der erweiterten ExMET-OptimEx-Kohorte.**
A: Identifizierung dreier Cluster anhand der MetS-Parameter (Taillenumfang, HDL, TG, PG, systolischer Blutdruck) und der Fitness gemessen an VO_2 peak. **B:** Darstellung der Verteilung der clusterdefinierenden Parameter bei der tSNE-Analyse. Dunkle Kreise symbolisieren die höheren Werte innerhalb der Kohorte, helle Kreise niedrigere Werte. NPG = Nüchternplasmaglucoese, sysRR = systolischer Blutdruck, TG = Triglyzeride.



(REG1A) zu Cluster 2 (Abbildung 17K-M). Dieses Cluster scheint die geringste Krankheitslast aufzuweisen. Sie nahmen mehr Trainingsmöglichkeiten wahr als die Patient:innen der anderen Cluster (Abbildung 18).

4.3.2 MetS-Cluster 2

Das Cluster 2 zeichnet sich durch niedrigere HDL-Spiegel und einen höheren Taillenumfang im Vergleich zu Cluster 1 mit höheren TG aus, die NPG-Werte sind allerdings niedriger als in Cluster 3 (Abbildung 17A-D). Die Anzahl an zirkulierenden NK-Zellen und die Granularität der CD8^{pos}-T-Zellen war höher als in den anderen Clustern. Zudem waren erhöhte Level an Carboanhydrase 1 (CA1), Peptidyl-glycin alpha-amidating Monooxygenase (PAM), Plexin-B2 (PLXNB2), Thrombospondin-4 (THBS4), IL-8, β -Galactosid-alpha-2,6-sialyltransferase 1 (ST6GAL1) und Trypsin 2 (PRSS2) zu messen (Abbildung 17N-T).

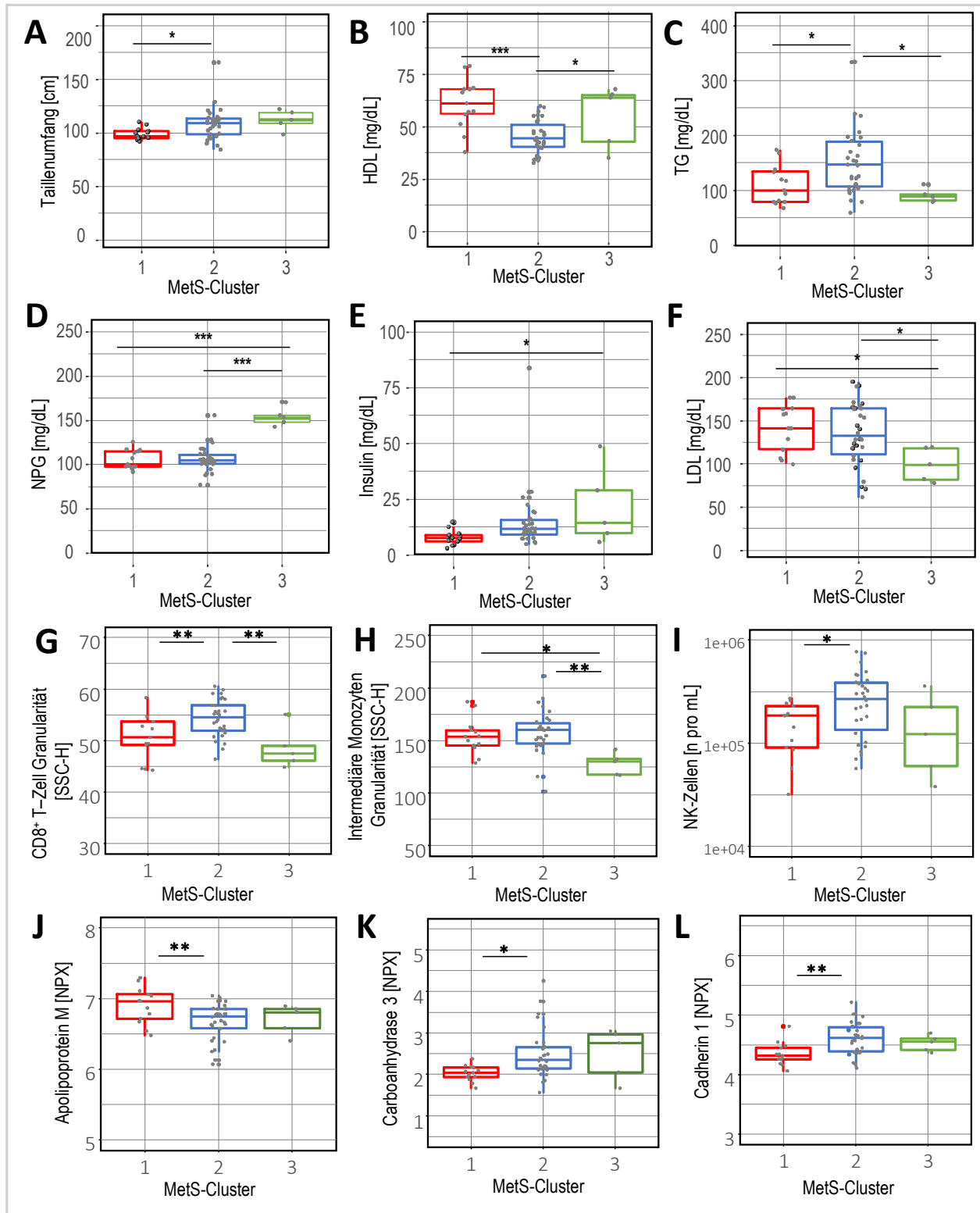


Abbildung 17 A-L: Vergleich der Absolutwerte beider Messzeitpunkte der immunometabolischen Parameter aus durchflusszytometrischen Messungen sowie PEA der drei Cluster. Rot = Cluster 1, blau = Cluster 2, grün = Cluster 3. Nur signifikante Unterschiede dargestellt. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). NPG = Nüchternplasmaglucoe, TG = Triglyzeride

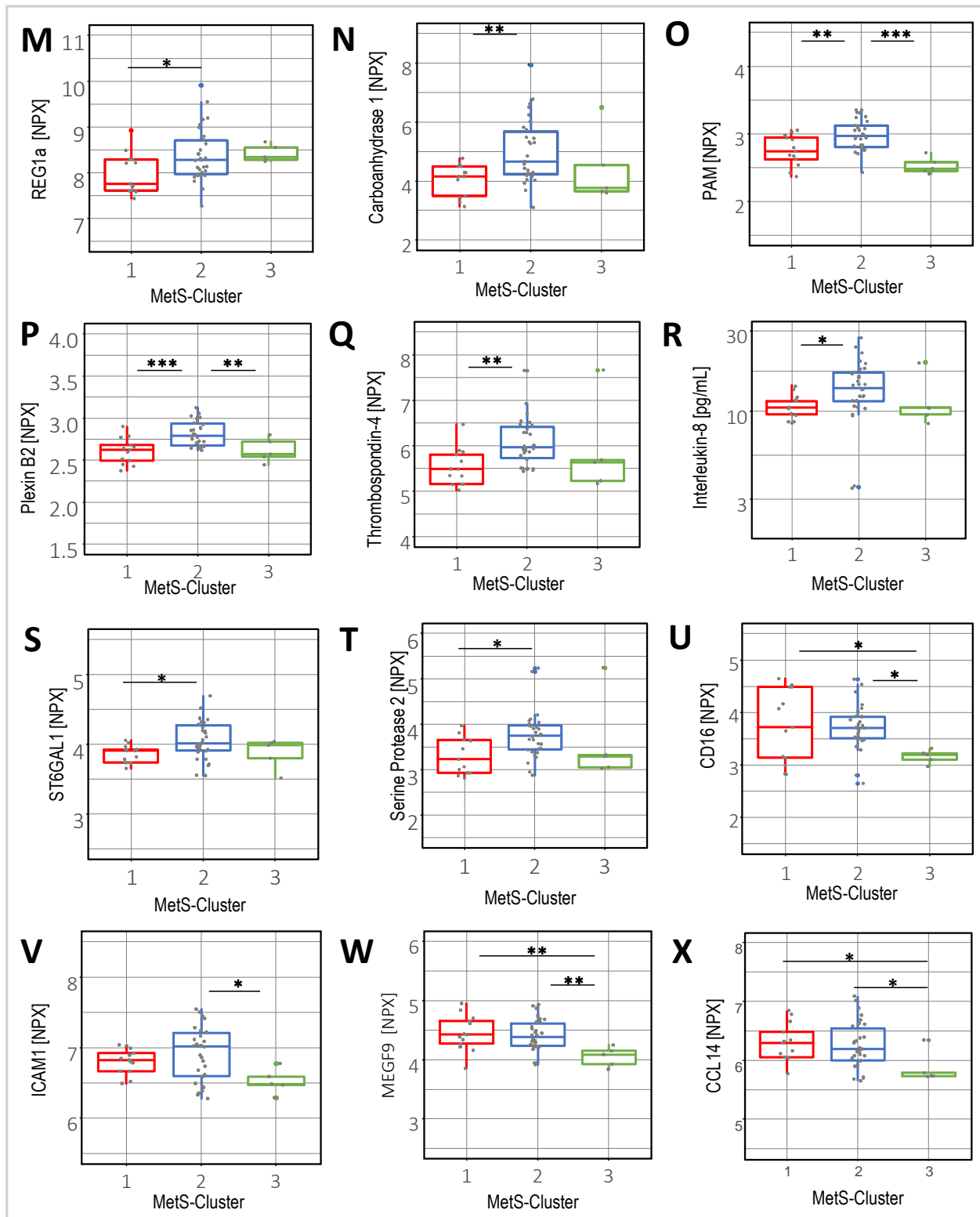


Abbildung 17 **M-X: Vergleich der Absolutwerte beider Messzeitpunkte der immunometabolischen Parameter aus durchflusszytometrischen Messungen sowie PEA der drei Cluster.** Rot = Cluster 1, blau = Cluster 2, grün = Cluster 3. Nur signifikante Unterschiede dargestellt. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

CCL14 = C-C motif chemokine 14, CD16 = Fc- γ -Rezeptor IIIb, ICAM1 = Intercellular adhesion molecule 1, MEGF9 = Multiple epidermal growth factor-like domains protein 9, PAM = Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase, REG1A = Lithostathine-1-alpha, ST6GAL1 = Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1

4.3.3 MetS-Cluster 3

Hier zeigten die Patient:innen die höchsten Level an NPG und Fasteninsulin und nehmen als einziges Cluster Metformin und Insulin ein (Tabelle 6), wiesen aber die niedrigsten LDL-Cholesteroll-Levels auf (Abbildung 17D-F). Bei den leukozytären Parametern zeigte sich die niedrigste Granularität der klassischen und intermediär aktivierten Monozyten (Abbildung 17G-H). Auch die Konzentrationen von Fc- γ -Rezeptor IIIb (FCGR3B/CD16), löslichem Interzellulärem Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), multiple epidermal growth factor-like domains protein 9 (MEGF9) und C-C motif chemokine 14 (CCL14) waren in diesem Cluster am geringsten, was auf eine geringere Aktivierung myeloider Zellen im Vergleich zu Cluster 2 hinweisen könnte (Abbildung 17U-X).

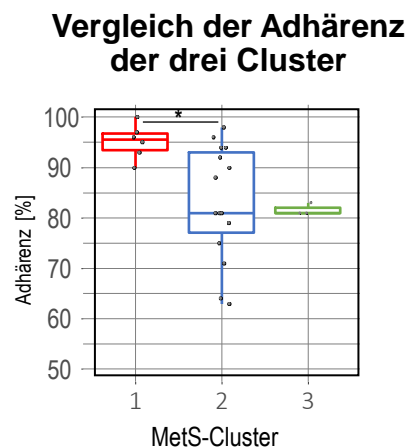


Abbildung 18: **Vergleich der Trainingsadhärenz der ExMET-Kohorte in den drei Clustern.** $p < 0,05$ (*)

Zusammenfassend kann man also drei Cluster erkennen: In Cluster 1 sind die Risikofaktoren des MetS am geringsten ausgeprägt. Die Patient:innen sind im Vergleich schlanker und haben vergleichsweise sowohl gute NPG- als auch Lipidwerte und haben die höchste Trainingsadhärenz (Abbildung 18). Cluster 2 zeichnet sich durch einen besseren Glucosemetabolismus im Vergleich zu Cluster 3, aber schlechtere Lipidwerte aus. Die Patient:innen haben einen höheren Taillenumfang als die Patient:innen in Cluster 1. Cluster 3 hat bessere Lipidwerte, aber schlechtere NPG-Level und die Patient:innen haben den höchsten Taillenumfang. In der ExMET-Kohorte wechselte lediglich ein Patient das Cluster über die Trainingsperiode von Cluster 1 zu Cluster 3.

Tabelle 6: **Verteilung der Medikamenteneinnahme in den verschiedenen Clustern bei Baseline (BL) und Follow-Up (FU) in %.** Nur in Cluster drei werden Metformin und Insulin eingenommen; $p < 0,05$ (*).

Medikamente in % der Patient:innen		Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	
AT₁-Blocker	BL	42,9	46,7	50,0	
	FU	66,7	53,3	33,3	
β-Blocker	BL	0,0	40,0	50,0	
	FU	0,0	40,0	33,3	
Statin	BL	42,9	40,0	100,0	
	FU	33,3	26,7	66,7	
Metformin	BL	0,0	0,0	100,0	*
	FU	0,0	0,0	66,7	
Insulin	BL	0,0	0,0	100,0	*
	FU	0,0	0,0	66,7	

Dies ist bei FU in Cluster 3 der einzige Patient, der nicht Metformin und Insulin einnimmt (Tabelle 6). Die drei Cluster entsprechen nicht den verschiedenen Trainingsgruppen und unterscheiden sich nicht in den verschiedenen Trainingsparametern (Tabelle 7). Veränderungen der Zellgröße, -granularität, -aggregation mit Plättchen und die Abgabe von MV war sehr heterogen innerhalb der Cluster und zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Clustern.

Tabelle 7: **Prozentuale Verteilung der Patient:innen der Trainingsgruppen auf die drei Cluster.**

	1HIIT [% der Cluster]	4HIIT [% der Cluster]	MCT [% der Cluster]
Cluster 1	33,33	16,67	50,00
Cluster 2	40,00	26,67	33,33
Cluster 3	33,33	0,00	66,67

In Cluster 2 zeigte sich bei den Patient:innen wie auch über die gesamte Kohorte die Tendenz einer Reduktion der Anzahl der NK-Zellen. In Cluster 3 war diese Reduktion sogar noch stärker zu beobachten (Abbildung 20A). Zu Beginn hatten Patient:innen in Cluster 2 relativ hohe Werte an Insulin-like growth factor-binding proteine 6 (IGFBP6) und PLXNB2, in Cluster 1 und 3 waren sie niedrig. Von BL zu FU stiegen diese Konzentrationen in Cluster 1 und 3 an, während sie in Cluster 2 sanken, die

Konzentrationen glichen sich also über die Trainingsperiode an (Abbildung 20B-C). Die Konzentrationen von IL-7R stiegen sehr stark in Cluster 3, nicht aber in Cluster 1 und 2 (Abbildung 19B). CES1-Plasmalevel unterschieden sich weder zwischen den Clustern, noch veränderten sie sich über die Trainingsperiode (Abbildung 19C-D).

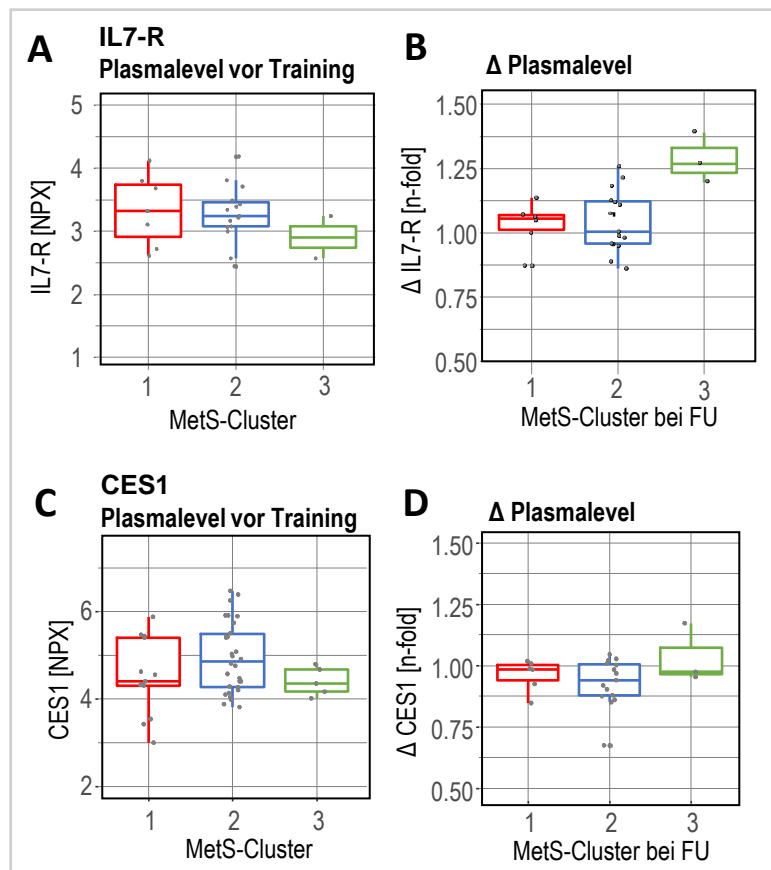


Abbildung 19: **Vergleich von IL-7R und CES1 zwischen den drei Clustern. A und C:** Vergleich der absoluten Plasmakonzentrationen beider Messzeitpunkte zwischen den drei Clustern. **D und E:** Vergleich der Veränderungen von Baseline zu Follow-Up zwischen den drei Clustern. Rot = Cluster 1, blau = Cluster 2, grün = Cluster 3. $p < 0,01$ (*), $p < 0,001$ (**), $p < 0,0001$ (***)). Oberhalb: P-Werte der Veränderungen von Baseline zu Follow-Up. Δ = n-fold der BL, BL = Baseline, FU = Follow-Up, CES1= Carboxylesterase 1, IL-7R = Interleukin-7-Rezeptor

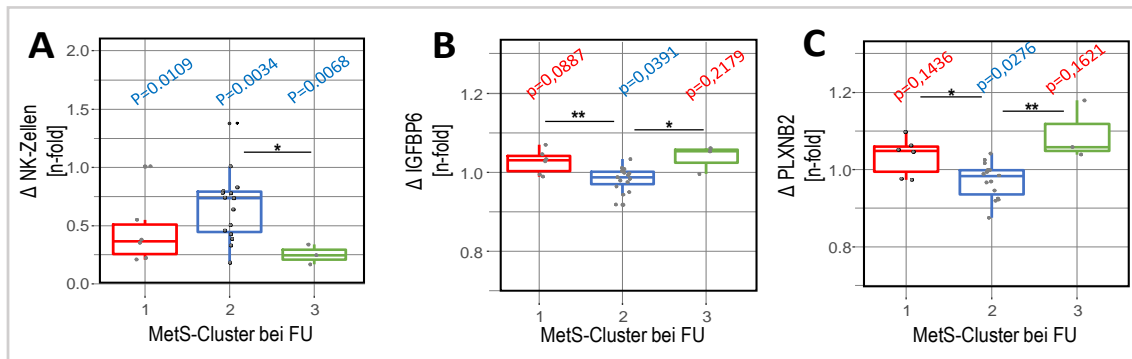
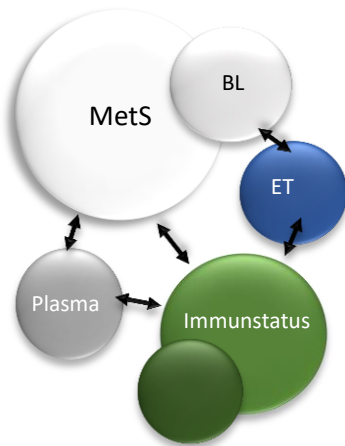


Abbildung 20: **Vergleich der Veränderungen der immunometabolischen Parameter aus durchflusszytometrischen Messungen sowie PEA der drei Cluster.** Rot = Cluster 1, blau = Cluster 2, grün = Cluster 3. Nur signifikante Unterschiede dargestellt. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). Oberhalb: P-Werte der Veränderungen von Baseline zu Follow-Up. Δ = n-fold der BL, BL = Baseline, FU = Follow-Up, Insulin-like growth factor-binding proteine 6 = IGFBP6, Plexin-B2 = PLXNB2

Das Training führte insgesamt zu einer Reduktion der Leukozyten und damit der inflammatorischen Last. Die Verbesserung der MetS-definierenden Faktoren war in dieser Studie allerdings nicht vom Trainingsprogramm abhängig. In dieser Studie zeigen wir Ansätze zur Bestimmung individueller immunometabolischer Profile, die anzeigen könnten, welche Patient:innen in welcher Weise von einer personalisierten Therapie mit Trainingsintervention profitieren können. Diese immunometabolische Charakterisierung ist in Abbildung 21 zusammengefasst.

Immunometabolische Cluster



Patient:innen mit MetS

Cluster 1

Cluster 2: dyslipidämisch

Cluster 3: hyperglykämisch

MetS-definierende Parameter

Taillenumfang ↑
HDL ↑
TG =
NPG =

Taillenumfang ↑ ↑
HDL ↓
TG ↑
NPG =

Taillenumfang ↑ ↑ ↑
HDL ↘
TG =
NPG ↑

Leukozytäre Parameter

NK-Zellen ↑
CD8+ Granularität ↑

Granularität klassischer und intermediär aktivierter Monozyten ↓

Plasmaproteinmarker

apo M ↑
CA3 ↓
CDH1 ↓
REG1A ↓

CA1 ↑
PAM ↑
PLXNB2 ↑
PRSS2 ↑
ST6GAL 1 ↑
THBS4 ↑
IL-8 ↑

CD16 ↓
MEGF9 ↓
ICAM1 ↓
CCL14 ↓

Abbildung 21: Zusammenfassung der immunometabolischen Charakterisierung der drei definierten MetS-Cluster.

Veränderungen von Baseline zu Follow-Up: ‚=‘ = gleich, ↑ = erhöht, ↓ = erniedrigt, ↘ = tendenziell erniedrigt.

BL = Baseline, CA1 = Carboanhydrase 1, CA3 = Carboanhydrase 3, CCL14 = C-C motif chemokine 14, CD16 = Fc-γ-Rezeptor IIIb, CDH1 = Cadherin-1, ET = Exercise Training, ICAM1 = Intercellular adhesion molecule 1, IL-8 = Interleukin 8, MEGF9 = Multiple epidermal growth factor-like domains protein 9, NPG = Nüchternplasmaglucose, PAM = Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase, PLXNB2 = Plexin-B2, PRSS2 = Trypsin-2, REG1A = Lithostathine-1-alpha, ST6GAL1 = Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1, TG = Triglyzeride, THBS4 = Thrombospondin-4

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Nach unseren Ergebnissen wird das Outcome nach 16 Wochen supervidierter Trainingsintervention durch individuelle immunometabolische Profile der Patient:innen bestimmt. Unabhängig von den Unterschieden der Trainingsprogramme konnten alle Gruppen ihre individuelle VO_2 peak verbessern. Diese war nicht mit kardio-metabolischen Verbesserungen assoziiert und kann daher nicht als Indikator zur Verbesserung des MetS dienen. Vielmehr zeigte sich, dass individuelle Verbesserungen der klinischen Faktoren des MetS mit Veränderungen der Anzahl und Aktivierung von Leukozyten sowie der Plasmaproteinkonzentrationen kardiometabolisch relevanter Proteine assoziiert sind. Die Anzahl und der Aktivierungsstatus der Immunzellen ließ sich allerdings durch Training beeinflussen. Es ließen sich drei Cluster von Patient:innen identifizieren, die sich durch immunometabolische Profile definieren: Cluster 1 als Cluster mit der geringsten Krankheitslast, Cluster 2 als hyperlipidämisches und Cluster 3 als hyperglykämisches Cluster (Abbildung 21).

Zu den Limitationen der Studie ist klar die geringe Fallzahl zu benennen. Außerdem sind in unseren Ergebnissen hauptsächlich deskriptiv. Sie ermöglicht es aber, einige Hypothesen zu generieren. Diese können orientierend für zukünftige Studien sein.

5.2 Die individuelle Verbesserung der VO_2 peak ist kein Indikator für die Verbesserung des MetS

VO_2 peak ist als Maß für den Trainingserfolg etabliert. Die VO_2 peak bezeichnet die im Training maximal erreichte Belastung, bei einer längeren erfolgreichen Trainingsperiode sollte diese maximale Kapazität sich erhöhen (52). Daher sollten weitere Faktoren, die durch Training verändert sind, mit der VO_2 peak korrelieren. Bei unseren Patient:innen ist die VO_2 peak zwar angestiegen, d.h. die Patient:innen haben ihre Fitness verbessert, trotzdem konnten sie ihre Krankheitslast kaum senken. Unsere Ergebnisse kontrastieren teilweise mit den Daten früherer Studien, die bereits den Effekt von Training auf das MetS gezeigt haben (5, 45, 48, 49). Das führt uns zu der Annahme, dass das kardiometabolische Outcome noch stärker von individuellen Faktoren abhängt und deshalb die VO_2 peak nicht als direkter Indikator für die Verbesserung des MetS herangezogen werden kann. Genetik und Epigenetik, Ernährung, auch mit Berücksichtigung des Zeitpunkts der Nahrungsaufnahme im Verhältnis zur zirkadianen Rhythmik, allgemeiner Lebensstil unter Betrachtung des Stresslevels und den damit

einhergehenden adrenergen Stimulationen und sowie die Medikation spielen eine große Rolle (66–71). In den folgenden Experimenten wurden insbesondere die immunometabolischen Profile unserer Patient:innen untersucht.

5.3 Individuelle Verbesserungen kardiometabolischer Zielparameter sind mit der Anzahl und Aktivierung von Leukozyten sowie der Plasmaproteinkonzentrationen assoziiert

5.3.1 Veränderungen der Leukozyten von Baseline zu Follow-up über die gesamte Kohorte

Über die gesamte Kohorte zeigte sich eine signifikante Reduktion der Gesamtleukozytenzahl sowie diverser Untergruppen (Neutrophile, CD14^{hi}CD16^{neg} “klassische” und CD14^{hi}CD16^{pos} “intermediäre” Monozyten, NK-Zellen und CD25^{neg}CD127^{neg} Effektor- und CD25^{pos}CD127^{neg} regulatorischen T-Zellen).

Nahrendorf et al. (2019) zeigten kürzlich, dass freiwilliges Training zu reduzierter Leukozytenzahl führt, dies aber im Mausmodell. Dies zeigten sie für die Gesamtleukozytenzahl und auch die Unterformen B-Zellen, CD4^{pos}T-Zellen, CD8^{pos}T-Zellen, Monozyten, Neutrophile, Eosinophile und NK-Zellen. Sie stellten das in Zusammenhang mit einer reduzierten hämatopoetischen Aktivität. Es würden weniger hämatopoetische Progenitorzellen aus dem Knochenmark mobilisiert und auch weniger myeloide und lymphoide Kolonien aus ihnen gebildet. Insbesondere die nächtliche Leukozytenproduktion sei reduziert. Auch die Konzentration an Plättchen im peripheren Blut wäre verringert, die Zahl der Erythrozyten blieb unbeeinflusst. Trotz der geringeren Leukozytenzahl zeigte sich, dass die akute Rekrutierung zur Krankheitsabwehr verbessert sei. (110)

Einen Teil dieser Beobachtungen konnten wir am Menschen bestätigen. Allerdings haben wir nicht in allen Leukozytensubpopulationen Unterschiede gesehen. Dies könnte aber darauf zurückzuführen sein, dass das Mausmodell homogener ist als unsere Studiengruppe. Das MetS zeichnet sich per definitionem durch eine heterogene Patient:innengruppe aus. Auch könnte es Unterschiede dadurch geben, dass in Nahrendorfs Studie die Möglichkeit des Trainings entzogen wurde, während unsere Patient:innen neu damit begannen und zuvor über viele Jahre hinweg einen eher inaktiven Lebensstil führten. Die grundlegende These, dass Training zur Reduktion der chronischen Leukozytose mit dem bekannten Risiko für diverse non-communicable

Diseases führt, bestätigt sich hier aber. Auch in früheren Studien wurde bereits eine Tendenz zur Senkung der Leukozytenzahl beschrieben (87, 110, 111). Bei sehr hoher Trainingsintensität bzw. sehr hohem Trainingsvolumen ist sogar von einer Immunsuppression mit erhöhter Krankheitssuszeptibilität die Rede (112). Die antiinflammatorischen Effekte durch kardiorespiratorische Fitness könnten durch die Reduktion der abdominalen Adipositas und damit einer Reduktion der inflammatorischen Trigger bedingt sein (113). Dieser Zusammenhang zur Gewichtsreduktion ließ sich hier allerdings nicht reproduzieren.

Interessant sind hier auch noch einmal die akuten Effekte nach einer einzelnen Trainingseinheit. Auch akut, also 1-2 Stunden nach dem Training, lassen sich starke Reduktionen der Leukozyten beobachten, allerdings nach einem kurzen initialen Anstieg. Dies ist somit nicht als Immunsuppression, sondern vielmehr als eine akute Umverteilung in das periphere Gewebe zu betrachten (114). Durch langfristiges Training reduziert sich so bspw. die Zahl der NK-Zellen, während des Trainings kommt es allerdings zu einer akuten Mobilisierung der NK-Zellen, die dann z.B. bei Karzinompatient:innen das Tumorgewebe infiltrieren (115).

Bei Betrachtung der Leukozytensubpopulationen fällt auf, dass tatsächlich v.a. proinflammatorische Zellen wie Neutrophile, bei welchen direkte proinflammatorische Effekte durch bspw. NETs bei chronisch inflammatorischen Krankheiten beschrieben wurden (116), klassisch aktivierte proinflammatorische Monozyten und T-Zellen, bei denen sich die T-Effektorzellen reduzieren, zu denen die proinflammatorischen T_H1 - und T_H17 -Zellen gehören (104), nach den 4 Monaten Training reduziert sind (Abbildung 13). Dies könnte einen Übergang in die Resolution der Inflammation bedeuten.

Neben den Konzentrationen haben wir auch die folgenden Surrogatparameter für den Aktivierungsstatus der Leukozyten gemessen: Granularität, Größe, Aggregationsneigung und Ausschüttung von MV (39, 117, 118). Insgesamt sind die gemessenen Unterschiede sehr gering und in Anbetracht der kleinen Studienpopulation nicht zu stark zu bewerten. Möglicherweise könnten die relativ geringen Effekte aber auch dadurch zu erklären sein, dass gerade Zellgröße und Granularität sich generell nur in einem geringen Fenster verändern können, ohne dass die Zellfunktion darunter leidet. Dies würde auch zu unserem Langzeitsetting passen. Im Folgenden werden einige mögliche Hypothesen diskutiert.

Die Granularität der NK-Zellen und der NK-T-Zellen reduzierte sich im Verlauf leicht, passend zu einer reduzierten pro-inflammatorischen Wirkung (Abbildung 13). Ihre Größe nahm leicht zu. Bei einer Größenzunahme durch erhöhte Produktion von Entzündungsmediatoren, sollte, bedingt durch Ansammlung intrazellulärer Granula, gleichzeitig eine erhöhte Granularität detektierbar sein (119). Die Größenzunahme könnte durch eine hohe Lebenszeit der Zellen durch nicht stattgefundenen Aktivierung zu erklären sein. Bisherige Daten zu der Veränderung der Zytotoxizität von NK-Zellen durch Training sind sehr heterogen und ihre Vergleichbarkeit durch methodische Unterschiede limitiert. Niedrigere Katecholaminlevel bei trainierten Personen könnten aber zu einer Reduktion der Toxizität der NK-Zellen beitragen (120).

Die Größe und Granularität der Neutrophilen nahmen leicht zu (Abbildung 13). Die Rolle der Neutrophilen bei chronischer Inflammation und Gewebsreparatur wird als sehr paradox beschrieben (121). Neutrophile spielen eine wichtige Rolle bei der chronischen Inflammation, senden aber auch antiinflammatorische Signale bei der Resolution aus (92). Nach Bashant et al. (2019) könnte eine Größenabnahme bei akuter Aktivierung von Neutrophilen ihre Migration verbessern (122). Größen- und Granularitätszunahme würden sich hier folglich sowohl als Zeichen erhöhter proinflammatorischer Aktivität, erhöhter Resolving-Aktivität oder auch als geringere Aktivierung als Zeichen für hohes Zellalter interpretieren lassen.

Auch bei den klassisch aktivierten Monozyten nahm die Granularität geringfügig zu (Abbildung 13). Bei den klassisch und intermediär aktivierten Monozyten zeigte sich eine leichte Größenzunahme. Der gesteigerte Aktivierungsstatus der Makrophagenvorläufer bei gleichzeitig reduzierter Leukozytenzahl könnte im Zusammenhang mit einer verbesserten Efferozytose stehen (123). Allerdings könnte auch hier die Größenzunahme auf hohes Zellalter durch Inaktivität, bzw. Nicht-Aktivierung hindeuten. Auch bei den naiven/zentralen T-Gedächtniszellen, den T-Effektorzellen und den zytotoxischen T-Zellen zeigte sich eine leichte Größenzunahme nach der Trainingsintervention (Abbildung 13). Hier lässt sich nicht so leicht eine proinflammatorische oder pro-resolving Tendenz ableiten. Die Aktivität der Gedächtniszellen sowie die T_H2 -Zellen als Untergruppe der T-Effektorzellen ist eher als Teil der Resolving-Mechanismen zu betrachten, während die zytotoxischen T-Zellen und die T_H1 - und T_H17 -Effektorzellen eher proinflammatorisch wirksam sind (Tabelle 2). Ein deutlicheres Zeichen für einen Shift der T-Zellen zur Resolution der Inflammation

wäre eine erhöhte Anzahl und/oder Marker einer Aktivierung wie IL-4 oder IL-10 der regulatorischen T-Zellen gewesen, welche die Resolution im Anschluss an eine akute Inflammation einleiten, z.B. über die Stimulation der Efferozytose der Makrophagen (93).

Obwohl sich die absoluten Zahlen der Thrombozytenaggregate mit Leukozytensubpopulationen verringerten, zeigte sich in Relation zu der reduzierten Leukozytenzahl ein Anstieg der Aggregationsneigung. Die Bildung von Aggregaten ist mit einer erhöhten inflammatorischen Aktivität und höherem kardiovaskulären Risiko assoziiert (117). Die Aggregatbildung mit Monozyten scheint einen Shift hin zur Bildung klassisch aktivierten Makrophagen zu bewirken (124).

Auch bei der Ausschüttung leukozytärer MV zeigte sich eine Erhöhung der Ausschüttung pro Zelle, während sich keine Veränderung der absoluten MV über die Trainingsperiode ergab (Abbildung 13). Auch das spricht für erhöhte Aktivierung der Leukozyten (39). Hier waren es insbesondere MV der Neutrophilen und klassisch aktivierten Monozyten. Neutrophile MV spielen eine Rolle bei der Resolution der Inflammation (siehe Einleitung). Zudem zeigte sich eine Reduktion endothelialer MV. Dies könnte für eine Stressreduktion des vaskulären Endothels sprechen (125).

Insgesamt zeigt sich aber bei den Resultaten eine große Heterogenität zwischen den Patient:innen. Wie schon bei den klinischen Daten zeigt sich, dass es hier deutliche individuelle Unterschiede in der Reaktion auf Training geben muss. Dies passt zu dem heterogenen Krankheitsbild MetS, suggeriert aber auch eine individuellere Betrachtung der Einflussfaktoren. Im Folgenden werden Korrelationen zwischen Patient:inneneigenschaften und leukozytären Parametern, unabhängig vom Training auf individueller Ebene berechnet, diskutiert.

5.3.2 Korrelationen der Leukozyten zu klinischen Parametern auf individueller Ebene

VO₂peak zeigte eine negative Korrelation zur Anzahl der intermediär aktivierten Monozyten und der NK-Zellen (Abbildung 12), d.h. Patient:innen mit besserer kardiorespiratorischer Fitness weisen eine geringere Last durch diese proinflammatorischen Zellen auf.

Triglyzeride sind ein starker Risikofaktor für CVD (2). Sie sind assoziiert mit zentraler Adipositas und steigender Insulinresistenz (2). Sie sind auch als proinflammatorischer Trigger vorbeschrieben (126). In dieser Studie korrelierten die TG im Plasma positiv mit der Anzahl an naiven/zentralen Gedächtnis-T-Zellen, NK- und NK-T-Zellen sowie mit der Granularität der intermediär aktivierten Monozyten und der CD8^{pos}-T-Zellen. Dies geht mit ihrer vorbeschriebenen proinflammatorischen Wirkung durch ihre Lipotoxizität und die Immunaktivierung durch ihre Fettsäuren einher (127). Negativ sind sie mit Aggregaten aus klassischen Monozyten mit Thrombozyten assoziiert. Dies scheint auf den ersten Blick schwer zu erklären. Durch die proinflammatorischen Eigenschaften würde man eine stärkere Aktivierung insbesondere dieser Monozytensubpopulation erwarten. Dies lässt sich aber evtl. methodisch erklären. Die Anzahl der Leukozyten steigt mit der Menge an TG, damit ist die Rechnung der Aggregate pro Zelle vielleicht inadäquat reduziert. Einen direkten Zusammenhang der Triglyzeridlast zur kardiorespiratorische Fitness gemessen an VO₂peak konnten wir nicht nachweisen.

Patient:innen mit geringerem **Taillenumfang** als Maß der zentralen Adipositas weisen eine geringere Granularität der T-Effektorzellen, NK-Zellen und NK-T-Zellen auf, was auf eine geringere Synthese von Effektormolekülen hindeuten könnte. Dies passt zu der Theorie, dass dysfunktionale zentrale Adipozyten stark proinflammatorisch wirken (7, 10, 14, 15). Bei Gewichtsreduktion senkt sich die Lipotoxizität und das viszerale Fettgewebe hat das Potential, seine Funktionalität zu verbessern (128). Eine zentrale Rolle bei der Gewichtsabnahme spielt die Ernährung, die in dieser Studie leider nicht erfasst wurde (72–75).

Ein geringerer Taillenumfang geht mit einer höheren Anzahl der gesamten leukozytären MV, der Neutrophilen-MV und der Größe der Neutrophilen einher. Üblicherweise werden die MV durchflusszytometrisch anhand von Annexin V, welches an Phosphatidylserin bindet, und zelltypischen Oberflächenmarkern gemessen (40). Allerdings gibt es bisher kaum standardisierte Messverfahren. Auch finden sich in der Literatur häufig unterschiedliche Definitionen oder Begriffe für MV und häufig wird nicht deutlich zwischen verschiedenen extrazellulären Vesikeln, insbesondere MV und Exosomen, unterschieden (129). Daher ist die Aussagekraft der durchflusszytometrischen MV-Messungen, insbesondere bei unseren niedrigen Werten, kritisch zu bewerten. Die MV waren vertrauenswürdig detektierbar bei Endothelzellen und bei Monozyten, Neutrophilen und NK-Zellen. Bei Subtypen der T-Zellen sind häufig

keine MV detektierbar. Die vermehrte MV-Ausschüttung durch Leukozyten und Neutrophile spricht hier eher für eine stärkere Immunaktivierung trotz geringerem Taillenumfang (39). Auch hier zeigt sich eine Relevanz der MV bei Resolution der Inflammation. Insbesondere bei den MV der Neutrophilen ist eine antiinflammatorische Signalwirkung vorbeschrieben (92).

Es zeigte sich kein Unterschied der Blutdruckwerte zwischen den drei Clustern.

Arterielle Hypertonie ist mit der vermehrten Ausschüttung von MV durch T-Zellen, der Größe alternativ aktivierter Monozyten und der Anzahl zytotoxischer T-Zellen korreliert. Dies spricht für eine erhöhte proinflammatorische Aktivität. Die Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie ist nicht hinreichend geklärt, die Risikofaktoren entsprechen aber in etwa den MetS-definierenden Faktoren (47). Ein Mechanismus, der zu höherem Blutdruck führt, ist die Erhöhung der Gefäßsteifigkeit durch Atherosklerose, die als inflammatorische Krankheit beschrieben ist (30, 130). Auch hier passt also eine erhöhte inflammatorische Aktivität in das Bild. Weiterhin konnten wir eine direkte Korrelation zwischen dem Blutdruck und der NPG beobachten. Erst kürzlich wurde in den neuen European Society of Cardiology Guidelines ein positiver Effekt von glukosesenkender Therapie auf den Blutdruck beschrieben (45).

5.3.3 Veränderungen der Plasmaproteinkonzentrationen von Baseline zu Follow-Up über die gesamte Kohorte

Nach Analyse der bisherigen Daten stellte sich die Frage nach möglichen Mediatoren der beobachteten Effekte. Daher erfolgte die Messung und Analyse von Zytokinen mittels Durchflusszytometrie und 86 weiteren Plasmaproteinen mit kardiometabolischer Relevanz mittels PEA durch OLINK.

Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Zytokinlevel im Plasma über die gesamte Kohorte (Abbildung 15A). In der Literatur spielen Zytokine eine sehr große Rolle bei der Progression des MetS und dem Zusammenspiel mit dem Immunsystem (11, 12, 15–17). Insbesondere fällt auf, dass IL-6, welches gerade bei körperlichem Training und metabolischer Dysregulation von großer Bedeutung ist, bei uns keine signifikanten Veränderungen zeigt (16, 17). In Bezug auf die Unterschiede zwischen Trainingsregimes wurde bereits gezeigt, dass diese, auch wenn sie Einfluss auf die VO₂peak haben, keine unterschiedlichen Zytokinlevel aufweisen (83). Im Vergleich zum Trainingsbeginn würde man auf Basis früherer Studien eine Dynamik erwarten (83).

Möglicherweise sind diese Ergebnisse auf die geringe Fallzahl unserer Studie zurückzuführen.

In der Analyse der Plasmaproteine mittels PEA zeigte sich eine signifikante Reduktion der hepatischen CES1 sowie ein Anstieg des IL-7R über die gesamte Kohorte (Abbildung 15A).

5.3.4 CES1: Veränderung zum Follow-Up und Korrelationen

Carboxylesterasen sind Enzyme, die mit der Hydrolyse von Estern an der Biotransformation von Xenobiotika beteiligt sind und vermehrt im Epithel von Leber, Niere und Gastrointestinaltrakt vorkommen (131–133). Dabei befinden sie sich löslich im Lumen des Endoplasmatischen Reticulums der Zellen (132, 133). Insbesondere CES1 weist eine lipatische Aktivität auf (133). CES1 ist besonders stark in Hepatozyten und Adipozyten exprimiert, aber z.B. auch in Monozyten und Makrophagen (132). Hier wurde das hepatische CES1 im Plasma gemessen. Intrazellulär ist es an der Hydrolyse von TG beteiligt und scheint bei metabolischer Dysfunktion erhöht, so ist es möglicherweise als Indikator und Target bei metabolischen Krankheiten wie Adipositas in Betracht zu ziehen (133). Positive Korrelationen von CES1 zur Lipaseaktivität an intrazellulären TG und zu Adipositas sprechen ebenfalls für eine CES1-Induktion in der Leber bei Entwicklung der Adipositas (134). Im Mausmodell wurde gezeigt, dass das Ausschalten der hepatischen CES1 zu einer Erhöhung der TG und der Plasmacholesterolverlevel führt (135, 136). Interessanterweise führt das globale Knockdown von CES1 im Mausmodell zu einer Verringerung der Lipide im Plasma und wirkt atheroprotektiv (136). Die Konzentration von CES1 bei Mäusen ist drei Mal so hoch wie beim Menschen. Die Übertragbarkeit des Modells gilt es noch zu überprüfen (133). Des Weiteren wurde ein Zusammenhang von CES1 zum Glucosemetabolismus beobachtet. So wird CES1 durch Glucose induziert und führt zu einer Reduktion der postprandialen Glucoselevel im Plasma (137). Insgesamt ist die Konzentration des CES1 durch seine Rolle bei der Biotransformation stark von der Zufuhr exogener Stoffe abhängig (131), worüber wir in unserer Studie leider keine hinreichenden Daten haben. Da CES1 intrazellulär vorkommt, könnte eine Reduktion im Plasma auf den geringeren Zelltod der Hepatozyten bei weniger metabolischer Leberschädigung hinweisen. Die signifikante Reduktion nach der Trainingsintervention in unserer Studie könnte damit ein Indikator für eine Besserung der metabolischen Dysfunktion sein.

Passend dazu konnten wir eine positive Korrelation von CES1 zu den TG und eine negative Korrelation zu VO₂peak zeigen (Abbildung 15B). In Cluster 2, welches sich durch hohe TG-Level auszeichnet, waren bei Baseline die CES1-Spiegel höher als in den anderen Clustern und zeigten eine signifikante Reduktion beim Follow-Up (Abbildung 19).

5.3.5 IL-7R (subunit alpha): Veränderung zum Follow-Up und Korrelationen

Wir konnten einen signifikanten Anstieg des IL-7R feststellen (Abbildung 15A). Gemessen wurden seine Konzentrationen hier anhand seiner alpha-Kette (CD127).

Der membranständige IL-7R wird insbesondere auf lymphatischen Zellen exprimiert. Durch Stimulation durch IL-7 wird das Überleben der Zelle angeregt. Er gilt als Oberflächenmarker für T-Gedächtniszellen, welche bei Übergang der Inflammation in eine Resolution aus T-Effektorzellen hervorgehen. (104)

Denkbar ist, dass die Erhöhung der Konzentration auf Zellreste in unseren Plasmaproben zurückzuführen ist. Eine Erhöhung des IL-7R würde in diesem Fall für den angestrebten Übergang in die Resolution der Inflammation über die Trainingsperiode sprechen. In den individuellen Korrelationsanalysen über die gesamte Kohorte zeigten sich allerdings keine Assoziationen von IL-7R zu anderen Parametern, auch nicht zu der Anzahl der T-Gedächtniszellen im Blut. Wenn es sich nicht um den eigentlich membranständigen IL-7R handelt, würde es sich wohl eher um eine Verstärkung der Inflammation mit vermehrter aktiver Synthese des löslichen IL-7R handeln. Die lösliche Form des IL-7R wird von Fibroblasten und T-Effektorzellen, die von proinflammatorischen Zytokinen stimuliert wurden, synthetisiert (138). Möglich wäre auch, dass die Expression von IL-7 im Skelettmuskel durch das Training erhöht ist und somit der erhöhte IL-7R als Marker des Trainings zu betrachten ist (139).

5.3.6 Makrophagen: Veränderung zum Follow-Up und Korrelationen

Es zeigten sich keine Veränderungen der Makrophagenpolarisierung von Trainingsbeginn zu Follow-Up, allerdings war die Induzierbarkeit des Markers CD206 mit IL-4 mit verschiedenen Plasmamarkern assoziiert (Abbildung 15B). Dies könnte ein Zeichen dafür sein, dass bestimmte Plasmaproteine die Sensitivität von Makrophagen gegenüber IL-4 durch die Erhöhung der Expression von CD206 mit der Folge der Polarisierung zum M2c-Typ stimulieren. Dabei muss als Limitation beachtet werden, dass hier die Rolle der Makrophagen vor allem im Fettgewebe interessant ist, wir aber

haben mit Plasmaproben gearbeitet. Des Weiteren wird CD163 als Marker für M2c-Makrophagen in der Literatur kontrovers diskutiert (140).

5.4 Durch das kardiometabolische Outcome lassen sich drei verschiedene Cluster von Patient:innen identifizieren

Durch die bisherigen Ergebnisse nahmen wir an, dass das kardiometabolische Outcome stark mit individuellen immunometabolischen Profilen assoziiert ist. Uns interessierte dann, ob es dabei bestimmte Typen von Patient:innen gibt und wodurch diese sich unterscheiden. Dazu standen uns Daten zu Patient:inneneigenschaften wie z.B. Alter, Geschlecht und Vorerkrankungen, ihre Medikation, der inflammatorische Status und die Konzentrationen ausgewählter Plasmaproteine zur Verfügung. Als verbindende Determinanten wären genetische Komponenten vorstellbar. So wurden in einer Genomweiten Assoziationsstudie nach Zusammenhängen zwischen Inflammation und Adipositas gesucht. Dabei zeigten sich genetisch determinierte Unterschiede in Zytokinkonzentrationen. (141)

Durch die tSNE-Analyse haben wir drei Cluster identifizieren können und Unterschiede in immunologischen Parametern und Plasmaproteinkonzentrationen betrachtet. Die Cluster enthielten Patient:innen aus allen Trainingsgruppen. Hier zeigt sich noch einmal, dass die Unterschiede in den Trainingsprogrammen nicht ausschlaggebend sind. Zur Erhöhung der Fallzahl erweiterten wir die ExMET-Kohorte um die OptimEx-Kohorte. Bei der Bewertung der Signifikanz ist limitierend zu betrachten, dass absolute Werte beider Messzeitpunkte verwendet wurden, obwohl diese nicht voneinander unabhängig sind. Die aufgestellten Hypothesen sollten daher noch an einer größeren Studienpopulation getestet werden.

5.4.1 Klinische Unterschiede der Cluster

Cluster 1 lässt sich hier mit relativ geringem Taillenumfang, TG und NPG sowie höherem HDL als das Cluster mit der geringsten Krankheitslast beschreiben. Cluster 2 lässt sich als dyslipidämisch mit niedrigstem HDL und höchsten TG kategorisieren, während das Cluster 3 als hyperglykämisch mit dem höchsten NPG zu benennen ist (Abbildung 21).

Natürlich ist die Belastbarkeit dieser Cluster bei unserer geringen Fallzahl limitiert, die grundsätzliche Identifikation dieser unterschiedlichen Profile gibt aber gute Ansätze für die personalisierte Medizin, die in zukünftigen Studien weiterverfolgt werden können.

Cluster 1 präsentiert bereits zu Beginn des Trainings eine gering ausgeprägte Krankheitslast mit mildem immunometabolischen Profil und profitiert am ehesten. Bei Cluster 2 hingegen scheint es eine gewisse Resistenz der Lipide gegenüber dem Training zu geben. Hier wäre vielleicht insbesondere die Therapie mit z.B. Statinen und eine angepasste Diät wichtig. In Cluster 3 liegt die Problematik eher im Glucosemetabolismus. Hier wäre eine gezielte antidiabetische Therapie sinnvoll. Dies sind relativ einfache Maßnahmen, die schon jetzt leicht umsetzbar wären. Man müsste bei Erstellung des Therapieplans zum physischen Training dann zu Beginn nicht nur die VO₂peak, die als Marker der Fitness zwar beispielsweise mit einer Verbesserung der Lebensqualität zusammenhängen könnte, sondern auch kardiometabolische Parameter für eine Optimierung der medikamentösen und diätetischen Therapie testen.

5.4.2 Immunometabolische Unterschiede der Cluster

Des Weiteren haben wir auch die immunometabolischen Unterschiede zwischen den Clustern analysiert. Es interessierte uns, welche Mechanismen hinter der Definition eines klinischen Phänotyps stehen könnten. Das könnte die Identifikation von Mediatoren ermöglichen, die sich zukünftig als Targets einer Therapie verwenden ließen. Vorstellbar wären dabei Immuntherapien, wie sie bereits in den Studien CANTOS (142) und CIRT (143) getestet wurden, oder der therapeutische Einsatz von MV (144). Denkbar wäre auch die Hemmung oder Aktivierung bestimmter Mediatoren, um den Effekt vom Training auf bestimmte Parameter zu verstärken. Dazu könnte man in zukünftigen Studien schauen, ob man z.B. mit small molecules oder non-coding RNAs bestimmte dysfunktionale Prozesse, die zu den beobachteten Veränderungen der Proteinkonzentrationen im Plasma geführt haben, beeinflussen könnte.

5.4.2.1 MetS-Cluster 1

In Cluster 1 sind die Proteine CA3, CDH1 und REG1 niedriger als in Clustern 2 und 3. In unseren Korrelationsanalysen sahen wir, dass niedrige REG1A- und CDH1-Konzentrationen mit der erhöhten VO₂peak assoziiert sind. CA3 und CDH1 steigen mit dem Taillenumfang und sind niedriger bei hohem HDL. Daraus kann man schließen, dass die im Vergleich niedrigere Expression dieser Proteine mit der geringeren Krankheitslast der Patient:innen in Cluster 1 zu erklären sind. ApoM ist unter anderem ein Bestandteil von HDL und könnte daher die höheren HDL-Spiegel in Cluster 1 widerspiegeln (145). ApoM exprimiert und schützt Sphingosin-1-Phosphat und hat darüber eine antiinflammatorische Wirkung mit Reduktion der Lymphopoese und führt

zu verbesserter Endothelfunktion (146–148). Hsing-Chuan und May (2016) diskutierten die Möglichkeit, ApoM als Target in der Immuntherapie bei Autoimmunerkrankungen zu nutzen (149).

5.4.2.2 MetS-Cluster 2

Das dyslipidämische Cluster mit hohen TG zeichnet sich durch einige erhöhte Plasmaproteinkonzentrationen im Vergleich zu den anderen Clustern aus: CA1, PAM, PLXNB2, PRSS2, ST6GAL 1, THBS4 und IL-8. Unter den Leukozyten zeigte sich eine hohe Konzentration an NK-Zellen und die größte Granularität der zytotoxischen T-Zellen und der intermediären Monozyten, was sich als erhöhte inflammatorische Aktivität interpretieren lässt. In diesem Cluster lassen sich die Konzentrationen von TG, PAM, IL-8, NK-Zellen und die Aktivität zytotoxischer T-Zellen gut in Einklang bringen.

IL-8 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das im Vergleich zu den anderen Clustern in Cluster 2 stärker vertreten ist. Es aktiviert T-Zellen, auch zytotoxische, und Neutrophile (104). Damit trägt es zu einem chronisch inflammatorischen Status bei. IL-8 wird von NK-Zellen, aber auch anderen Leukozyten, synthetisiert (104) und zeigt bei uns eine Korrelation zu den TG. PAM im Blut wird ebenfalls hauptsächlich von NK-Zellen exprimiert (150). Bei uns zeigt sich außerdem eine positive Korrelation von PAM zu TG. Es wurde bereits gezeigt, dass TGRL mit vermehrter NK-Zell-Proliferation assoziiert sind (151). IL-8 wiederum triggert die weitere chronische Inflammation und Aktivität der zytotoxischen T-Zellen. Daraus ließe sich eine hohe inflammatorische Aktivität in diesem Cluster ableiten. Dies ließe sich evtl. als mögliche Hypothese in künftigen Experimenten testen.

Interessant wäre in diesem Cluster eine Diagnostik der Leber. Wie in der Einleitung erwähnt, sind hohe TG häufig mit NAFLD assoziiert (22, 23). Eine Leberzellschädigung wäre auch eine mögliche Erklärung für die physiologisch vorwiegend im Lebergewebe produzierten erhöhten Proteinkonzentrationen von CA1 und ST6GAL1 im Plasma. IL-8 wurde bereits als Biomarker für NAFLD beschrieben (152).

Insgesamt scheint dieses dyslipidämische Cluster ein immunometabolisches Profil mit gestörter Leberfunktion sowie erhöhter Proliferation und Aktivität der NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen aufzuweisen.

5.4.2.3 MetS-Cluster 3

Es ist viel beschrieben, dass zentrale Adipositas im Fettgewebe proinflammatorische myeloide Zellen aktiviert und diese an der Entwicklung der Insulinresistenz und damit einem hyperglykämischen Status beteiligt sind (10–17). Das Cluster 3 hat zwar auch den größten Taillenumfang und die höchste NPG, aber weniger proinflammatorische, also klassisch und intermediär aktivierte, Monozyten. Möglicherweise ist das darauf zurückzuführen, dass die beschriebenen Prozesse eher lokal im Fettgewebe stattfinden und nicht peripher im Vollblut, wo wir unsere Proben genommen haben.

5.5 Limitationen

5.5.1 Limitationen durch das Studiendesign

In der Studie ExMET ging es um den Vergleich verschiedener Trainingsprogramme, daher wurde das MCT nach aktuellen Leitlinien als Referenz herangezogen. Da wir nun festgestellt haben, dass die Unterschiede der Trainingsprogramme für das immunometabolische Outcome eine eher untergeordnete Rolle spielen, wäre als Kontrollgruppe eine Gruppe ohne jegliche Trainingsintervention interessant gewesen. Zur besseren Charakterisierung der Cluster wären Informationen über Ernährung, bisherige sportliche Betätigung und Bewegung im Alltag relevant.

Die Vorgänge, die bei den Zusammenhängen zwischen inflammatorischem Status und metabolischer Dysregulation von Bedeutung sind, finden oft im Fettgewebe statt. In einer Trainingsstudie, bei der alle Patient:innen die VO_2 peak verbesserten, wurden beispielsweise nur Unterschiede im Glutealfett gefunden, nicht aber systemisch (153). In unserer Studie haben wir ausschließlich Vollblut und Plasma verwendet und somit systemisch zirkulierende Mediatoren untersucht. Möglicherweise sind dadurch die Ergebnisse bei den Messungen der Plasmaproben eher schwach. Da aber auch die Effekte des Trainings auf die MetS-Parameter nicht sehr stark waren, könnte man die geringen Unterschiede in den Plasmaproben auch als plausibel betrachten.

5.5.2 Limitationen bei der Analyse der T-Zell-Subpopulationen

Wie bereits in der Methodik erwähnt war die Definition der $CD127^{low}CD25^{pos}$ regulatorischen T-Zellen, der $CD127^{neg}CD25^{neg}$ Effektor-T-Zellen und der $CD127^{pos}CD25^{low/neg}$ naiven bzw. Gedächtnis-T-Zellen nach der Durchflusszytometrie schwierig umzusetzen. In der Literatur wird eine bessere Abgrenzung durch die zusätzliche Färbung mit FOXP3 diskutiert (97). In zukünftigen Studien könnte zusätzlich

FOXP3 zur Färbung und Messung herangezogen werden. Dies würde jedoch eine Permeabilisierung der Zellmembran voraussetzen, und damit eine vorherige Aufreinigung der PBMC. Im klinischen Setting ist dies nicht leicht umsetzbar.

Auch wäre es interessant, nach den gefundenen Einflüssen der Plasmaproteine auf die Makrophagen nun auch Einflüsse auf die T-Zell-Entwicklung und Adipozytenfunktion zu testen.

5.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die wichtigste Erkenntnis unserer Studie ist die Bedeutung der individuellen Reaktion der Patient:innen und des Einsatzes personalisierter Medizin. Es reicht nicht, Patient:innen ein Trainingsschema zu geben und die korrekte Umsetzung zu kontrollieren. Selbst mit objektiver Verbesserung der kardiorespiratorischen Fitness profitieren nicht alle im gleichen Sinne davon. In der Diagnostik sollte idealerweise, auch wenn im realen klinischen Setting kaum umsetzbar, ein komplettes immunometabolisches Profil und daran angepasst ein multimodales Therapiekonzept aus Training, Ernährung und Medikation erstellt werden. Über die direkte medikamentöse Einstellung von Blutdruck, Lipiden und Glucose wissen wir bereits viel. Zielgerichtete Therapien gegen immunologische Parameter oder Plasmaproteine hingegen sind Gegenstand aktueller Forschung, deren Bedeutung wir mit unserer Studie weiter stützen.

Eine große aktuelle Studie über Immuntherapie zur Senkung des kardiovaskulären Risikos ist die CANTOS-Studie (142). Hier wurden 10 061 kardiovaskuläre Risikopatient:innen mit chronisch inflammatorischem Status gemessen an hochsensitivem C-reaktivem Protein über 2 mg/l, die eine leitliniengetreue optimale medikamentöse Therapie erhielten, randomisiert gegen Placebo mit drei unterschiedlichen Dosen Canakinumab, einem Antikörper gegen den IL-1 β -Pathway, über 48 Monate behandelt. Bei der Behandlung mit 150mg/Tag Canakinumab zeigte sich eine signifikante Reduktion der kardiovaskulären Ereignisse vs. Placebo, was zeigt, dass Inflammation als Target der Therapie eingesetzt werden kann. Hierbei geht es um die Inhibierung des NLRP3-Inflammasoms, relevant v.a. bei myeloiden Immunzellen. (142)

Bei der darauffolgenden Studie CIRT wurde ein ähnlicher Ansatz unter der Verwendung des sehr viel günstigeren Immunsuppressivums Methotrexat (MTX) versucht (143).

Diese Studie wurde wegen ausbleibendem Erfolg und starken Nebenwirkungen abgebrochen. Diskutiert wurde, dass durch MTX andere Reaktionswege als bei Canakinumab beeinflusst werden, die für Atherosklerose weniger relevant sind (143). MTX scheint eher bei T-Zellen wirksam. In einer Studie mit Patient:innen mit rheumatoider Arthritis wurde eine protektive Wirkung vor kardiovaskulären Ereignissen durch MTX gezeigt (154). Dies spricht wieder für die Bedeutung der Bestimmung des immunologischen Profils der Patient:innen und eine daran angepasste personalisierte Medikation.

In unserer Studie konnten wir einen starken Effekt von körperlichem Training auf den immunozytären Status der Patient:innen zeigen. Es wäre nun interessant, unsere Ergebnisse in einer größeren unabhängigen Patient:innenpopulation zu testen. Daran ließen sich dann möglicherweise deutlichere Korrelationen zwischen den immunozytären Parametern und dem klinischen Bild der Patient:innen ableiten. Langfristig könnte man daraus vielleicht ableiten, welche Patient:innen wie von körperlichem Training profitieren können, wie die Trainingsintensitäten und -volumina zu präferieren sind, wie eine parallel durchgeführte Ernährungsintervention beschaffen sein sollte oder ob und auf welche immunologischen Pathways gezielt eingewirkt werden sollte (116, 155, 156). Es gibt bereits einige Pharmazeutika, die sich in antiinflammatorische und pro-resolving Therapien einteilen lassen (155). Die antiinflammatorischen Therapien zielen dabei auf die Inhibierung der Progesteronsynthese, Zytokine und Leukozytenmigration ab (155). Für die Resolution sollten Phagozytose und Efferozytose, die Apoptose von Neutrophilen mit Freisetzung resolutionsfördernder MV, die Inhibierung der NETosis mit Freisetzung der NETs und der Shift der Makrophagen von der M1- zur M2-Polarisation gefördert werden (116, 155). Vorteil dieser gezielteren Medikation könnte dann weniger Nebenwirkungen im Vergleich zu einer generalisierten Immunsuppression sein (155).

Literaturverzeichnis

1. Scholz, G. H.; Hanefeld, M. Metabolic Vascular Syndrome: New Insights into a Multidimensional Network of Risk Factors and Diseases. *Visc Med* 2016; 32(5):319–26.
2. Alberti, K. G.; Eckel, R. H.; Grundy, S. M.; Zimmet, P. Z.; Cleeman, J. I.; Donato, K. A.; Fruchart, J. C.; James, W. P.; Loria, C. M.; Smith, S. C., Jr.; International Diabetes Federation Task Force on, Epidemiology; Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. 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(16):1640–5.
3. Roth, Gregory A.; Johnson, Catherine; Abajobir, Amanuel; Abd-Allah, Foad; Abera, Semaw Ferede; Abyu, Gebre; Ahmed, Muktar; Aksut, Baran; Alam, Tahiya; Alam, Khurshid; Alla, François; Alvis-Guzman, Nelson; Amrock, Stephen; Ansari, Hossein; Ärnlöv, Johan; Asayesh, Hamid; Atey, Tesfay Mehari; Avila-Burgos, Leticia; Awasthi, Ashish; Banerjee, Amitava; Barac, Aleksandra; Bärnighausen, Till; Barregard, Lars; Bedi, Neeraj; Belay Ketema, Ezra; Bennett, Derrick; Berhe, Gebremedhin; Bhutta, Zulfiqar; Bitew, Shimelash; Carapetis, Jonathan; Carrero, Juan Jesus; Malta, Deborah Carvalho; Castañeda-Orjuela, Carlos Andres; Castillo-Rivas, Jacqueline; Catalá-López, Ferrán; Choi, Jee-Young; Christensen, Hanne; Cirillo, Massimo; Cooper, Leslie; Criqui, Michael; Cundiff, David; Damasceno, Albertino; Dandona, Lalit; Dandona, Rakhi; Davletov, Kairat; Dharmaratne, Samath; Dorairaj, Prabhakaran; Dubey, Manisha; Ehrenkranz, Rebecca; El Sayed Zaki, Maysaa; Faraon, Emerito Jose A.; Esteghamati, Alireza; Farid, Talha; Farvid, Maryam; Feigin, Valery; Ding, Eric L.; Fowkes, Gerry; Gebrehiwot, Tsegaye; Gillum, Richard; Gold, Audra; Gona, Philimon; Gupta, Rajeev; Habtewold, Tesfa Dejenie; Hafezi-Nejad, Nima; Hailu, Tesfaye; Hailu, Gessesew Bugssa; Hankey, Graeme; Hassen, Hamid Yimam; Abate, Kalkidan Hassen; Havmoeller, Rasmus; Hay, Simon I.; Horino, Masako; Hotez, Peter J.; Jacobsen, Kathryn; James, Spencer; Javanbakht, Mehdi; Jeemon, Panniyammakal; John, Denny; Jonas, Jost; Kalkonde, Yogeshwar; Karimkhani, Chante; Kasaeian, Amir; Khader, Yousef; Khan, Abdur; Khang, Young-Ho; Khera, Sahil; Khoja, Abdullah T.;

Khubchandani, Jagdish; Kim, Daniel; Kolte, Dhaval; Kosen, Soewarta; Krohn, Kristopher J.; Kumar, G. Anil; Kwan, Gene F.; Lal, Dharmesh Kumar; Larsson, Anders; Linn, Shai; Lopez, Alan; Lotufo, Paulo A.; El Razek, Hassan Magdy Abd; Malekzadeh, Reza; Mazidi, Mohsen; Meier, Toni; Meles, Kidanu Gebremariam; Mensah, George; Meretoja, Atte; Mezgebe, Haftay; Miller, Ted; Mirrakhimov, Erkin; Mohammed, Shafiu; Moran, Andrew E.; Musa, Kamarul Imran; Narula, Jagat; Neal, Bruce; Ngalesoni, Frida; Nguyen, Grant; Obermeyer, Carla Makhoul; Owolabi, Mayowa; Patton, George; Pedro, João; Qato, Dima; Qorbani, Mostafa; Rahimi, Kazem; Rai, Rajesh Kumar; Rawaf, Salman; Ribeiro, Antônio; Safiri, Saeid; Salomon, Joshua A.; Santos, Itamar; Santric Milicevic, Milena; Sartorius, Benn; Schutte, Aletta; Sepanlou, Sadaf; Shaikh, Masood Ali; Shin, Min-Jeong; Shishehbor, Mehdi; Shore, Hirbo; Silva, Diego Augusto Santos; Sobngwi, Eugene; Stranges, Saverio; Swaminathan, Soumya; Tabarés-Seisdedos, Rafael; Tadele Atnafu, Niguse; Tesfay, Fisaha; Thakur, J. S.; Thrift, Amanda; Topor-Madry, Roman; Truelsen, Thomas; Tyrovolas, Stefanos; Ukwaja, Kingsley Nnanna; Uthman, Olalekan; Vasankari, Tommi; Vlassov, Vasily; Vollset, Stein Emil; Wakayo, Tolassa; Watkins, David; Weintraub, Robert; Werdecker, Andrea; Westerman, Ronny; Wiysonge, Charles Shey; Wolfe, Charles; Workicho, Abdulhalik; Xu, Gelin; Yano, Yuichiro; Yip, Paul; Yonemoto, Naohiro; Younis, Mustafa; Yu, Chuanhua; Vos, Theo; Naghavi, Mohsen; Murray, Christopher. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *Journal of the American College of Cardiology* 2017; 70(1):1–25.

4. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017. *IDF Diabetes Atlas 2017*; 8th edn. <http://www.diabetesatlas.org>. Accessed July 10, 2018.

5. Ostman, C.; Smart, N. A.; Morcos, D.; Duller, A.; Ridley, W.; Jewiss, D. The effect of exercise training on clinical outcomes in patients with the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Cardiovasc Diabetol* 2017; 16(1):110.

6. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome - a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366(9491):1059-62.

7. Khan, Shahzad; Wang, Chang Hua. ER stress in adipocytes and insulin resistance: mechanisms and significance (Review). *Mol Med Rep* 2014; 10(5):2234–40.

8. Hanefeld, M.; Pistrosch, F. Metabolisches Syndrom und Insulinresistenz. *Der Gastroenterologe* 2017; 12(4):300–4.

9. Engin, Ayse Basak; Engin, Atilla. Obesity and Lipotoxicity. Cham: Springer International Publishing; 2017. (vol 960).
10. Lumeng, C. N.; DelProposto, J. B.; Westcott, D. J.; Saltiel, A. R. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* 2008; 57(12):3239–46.
11. Lumeng, C. N.; Bodzin, J. L.; Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007; 117(1):175–84.
12. Saltiel, A. R.; Olefsky, J. M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 2017; 127(1):1–4.
13. Nguyen, K. D.; Qiu, Y.; Cui, X.; Goh, Y. P.; Mwangi, J.; David, T.; Mukundan, L.; Brombacher, F.; Locksley, R. M.; Chawla, A. Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. *Nature* 2011; 480(7375):104–8.
14. Weisberg, Stuart P.; McCann, Daniel; Desai, Manisha; Rosenbaum, Michael; Leibel, Rudolph L.; Ferrante, Anthony W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* 2003; 112(12):1796–808.
15. Perez-Perez, A.; Vilarino-Garcia, T.; Fernandez-Riejos, P.; Martin-Gonzalez, J.; Segura-Egea, J. J.; Sanchez-Margalet, V. Role of leptin as a link between metabolism and the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2017; 35:71–84.
16. Yudkin, J. S. Inflammation, obesity, and the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 2007; 39(10):707–9.
17. Mauer, J.; Chaurasia, B.; Goldau, J.; Vogt, M. C.; Ruud, J.; Nguyen, K. D.; Theurich, S.; Hausen, A. C.; Schmitz, J.; Bronneke, H. S.; Estevez, E.; Allen, T. L.; Mesaros, A.; Partridge, L.; Febbraio, M. A.; Chawla, A.; Wunderlich, F. T.; Bruning, J. C. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat Immunol* 2014; 15(5):423–30.
18. Pedersen, B. K. Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest* 2017; 47(8):600–11.
19. Karstoft, K.; Pedersen, B. K. Exercise and type 2 diabetes: focus on metabolism and inflammation. *Immunol Cell Biol* 2016; 94(2):146–50.

20. Grant, Ryan W.; Dixit, Vishwa Deep. Adipose tissue as an immunological organ. *Obesity (Silver Spring)* 2015; 23(3):512–8.
21. Popov, Yury; Schuppan, Detlef. CD8+ T cells drive adipose tissue inflammation—a novel clue for NASH pathogenesis? *J Hepatol* 2010; 52(1):130–2.
22. Samuel, Varman T.; Shulman, Gerald I. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest* 2016; 126(1):12–22.
23. van de Velde, Frederique; Bekaert, Marlies; Geerts, Anja; Hoorens, Anne; Batens, Arsène-Hélène; Shadid, Samyah; Ouwens, Margriet; van Nieuwenhove, Yves; Lapauw, Bruno. Insulin resistance associates with hepatic lobular inflammation in subjects with obesity. *Endocr Connect* 2019; 8(9):1294–301.
24. Öörni, Katariina; Lehti, Satu; Sjövall, Peter; Kovanen, Petri T. Triglyceride-Rich Lipoproteins as a Source of Proinflammatory Lipids in the Arterial Wall. *Curr Med Chem* 2019; 26(9):1701–10.
25. Borén, Jan; Chapman, M. John; Krauss, Ronald M.; Packard, Chris J.; Bentzon, Jacob F.; Binder, Christoph J.; Daemen, Mat J.; Demer, Linda L.; Hegele, Robert A.; Nicholls, Stephen J.; Nordestgaard, Børge G.; Watts, Gerald F.; Bruckert, Eric; Fazio, Sergio; Ference, Brian A.; Graham, Ian; Horton, Jay D.; Landmesser, Ulf; Laufs, Ulrich; Masana, Luis; Pasterkamp, Gerard; Raal, Frederick J.; Ray, Kausik K.; Schunkert, Heribert; Taskinen, Marja-Riitta; van de Sluis, Bart; Wiklund, Olov; Tokgozoglu, Lale; Catapano, Alberico L.; Ginsberg, Henry N. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* 2020; 41(24):2313-2330.
26. Khera, Amit V.; Emdin, Connor A.; Drake, Isabel; Natarajan, Pradeep; Bick, Alexander G.; Cook, Nancy R.; Chasman, Daniel I.; Baber, Usman; Mehran, Roxana; Rader, Daniel J.; Fuster, Valentin; Boerwinkle, Eric; Melander, Olle; Orho-Melander, Marju; Ridker, Paul M.; Kathiresan, Sekar. Genetic Risk, Adherence to a Healthy Lifestyle, and Coronary Disease. *New England Journal of Medicine* 2016; 375(24):2349–58.
27. Saklayen, M. G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep* 2018; 20(2):12.

28. Ahmadi, A.; Leipsic, J.; Feuchtner, G.; Gransar, H.; Kalra, D.; Heo, R.; Achenbach, S.; Andreini, D.; Al-Mallah, M.; Berman, D. S.; Budoff, M.; Cademartiri, F.; Callister, T. Q.; Chang, H. J.; Chinnaiyan, K.; Chow, B.; Cury, R. C.; Delago, A.; Gomez, M. J.; Hadamitzky, M.; Hausleiter, J.; Hindoyan, N.; Kaufmann, P. A.; Kim, Y. J.; Lin, F.; Maffei, E.; Pontone, G.; Raff, G. L.; Shaw, L. J.; Villines, T. C.; Dunning, A.; Min, J. K. Is metabolic syndrome predictive of prevalence, extent, and risk of coronary artery disease beyond its components?: Results from the multinational coronary CT angiography evaluation for clinical outcome: an international multicenter registry (CONFIRM). *PLoS One* 2015; 10(3):e0118998.
29. Francis Kim, Matilda Pham, Ezekiel Maloney, Norma O. Rizzo, Gregory J. Morton, Brent E. Wisse, Elizabeth A. Kirk, Alan Chait, Michael W. Schwartz. Vascular Inflammation, Insulin Resistance and Reduced Nitric Oxide Production Precede the Onset of Peripheral Insulin Resistance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2008; 28(11):1982–8.
30. Ross, Russell. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine* 1999; 340(2):115–26.
31. Vanepps, J. S.; Vorp, D. A. Mechano-pathobiology of atherogenesis: a review. *J Surg Res* 2007; 142(1):202–17.
32. M, Vanhoutte P.; H, Shimokawa; Tang E. H. C.; M, Feletou. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiologica* 2009; 196(2):193–222.
33. Baron, M.; Boulanger, C. M.; Staels, B.; Tailleux, A. Cell-derived microparticles in atherosclerosis: biomarkers and targets for pharmacological modulation? *J Cell Mol Med* 2012; 16(7):1365–76.
34. Libby, Peter. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420:868.
35. Erdmann, Erland. *Klinische Kardiologie*, 7. Auflage; 2009.
36. Krishnamoorthy, Nandini; Burkett, Patrick R.; Dalli, Jesmond; Abdunour, Raja-Elie E.; Colas, Romain; Ramon, Sesquile; Phipps, Richard P.; Petasis, Nicos A.; Kuchroo, Vijay K.; Serhan, Charles N.; Levy, Bruce D. Cutting edge: maresin-1 engages regulatory T cells to limit type 2 innate lymphoid cell activation and promote resolution of lung inflammation. *J Immunol* 2015; 194(3):863–7.

37. Armstrong, J. P.; Holme, M. N.; Stevens, M. M. Re-Engineering Extracellular Vesicles as Smart Nanoscale Therapeutics. *ACS Nano* 2017; 11(1):69–83.
38. Martinez, M. C.; Tual-Chalot, S.; Leonetti, D.; Andriantsitohaina, R. Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32(11):659–65.
39. Augustine, D.; Ayers, L. V.; Lima, E.; Newton, L.; Lewandowski, A. J.; Davis, E. F.; Ferry, B.; Leeson, P. Dynamic release and clearance of circulating microparticles during cardiac stress. *Circ Res* 2014; 114(1):109–13.
40. Mause, S. F.; Weber, C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 2010; 107(9):1047–57.
41. Ayers, L.; Nieuwland, R.; Kohler, M.; Kraenkel, N.; Ferry, B.; Leeson, P. Dynamic microvesicle release and clearance within the cardiovascular system: triggers and mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 2015; 129(11):915–31.
42. Heinrich, L. F.; Andersen, D. K.; Cleasby, M. E.; Lawson, C. Long-term high fat feeding of rats results in increased numbers of circulating microvesicles with pro-inflammatory effects on endothelial cells. *Br J Nutr* 2015; 113(11):1704–11.
43. Wolfram, Günther; Bechthold, Angela; Boeing, Heiner; Ellinger, Sabine; Hauner, Hans; Kroke, Anja; Leschik-Bonnet, Eva; Linseisen, Jakob; Lorkowski, Stefan; Schulze, Matthias; Stehle, Peter; Dinter, Jessica. Evidence-Based Guideline of the German Nutrition Society: Fat Intake and Prevention of Selected Nutrition-Related Diseases. *Ann Nutr Metab* 2015; 67(3):141–204.
44. Mann, J. I.; Leeuw, I. de; Hermansen, K.; Karamanos, B.; Karlström, B.; Katsilambros, N.; Riccardi, G.; Rivellese, A. A.; Rizkalla, S.; Slama, G.; Toeller, M.; Uusitupa, M.; Vessby, B. Evidence-based nutritional approaches to the treatment and prevention of diabetes mellitus. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2004; 14(6):373–94.
45. Cosentino, Francesco; Grant, Peter J.; Aboyans, Victor; Bailey, Clifford J.; Ceriello, Antonio; Delgado, Victoria; Federici, Massimo; Filippatos, Gerasimos; Grobbee, Diederick E.; Hansen, Tina Birgitte; Huikuri, Heikki V.; Johansson, Isabelle; Jüni, Peter; Lettino, Maddalena; Marx, Nikolaus; Mellbin, Linda G.; Östgren, Carl J.; Rocca, Bianca; Roffi, Marco; Sattar, Naveed; Seferović, Petar M.; Sousa-Uva, Miguel; Valensi, Paul;

Wheeler, David C. 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. *European Heart Journal* 2020; 41(2):255–323.

46. Sabine Ludt, Aniela Angelow, Erika Baum, Jean-François Chenot, Norbert Donner-Banzhoff, Günther Egidi, Joachim Fessler, Jörg Haasenritter, Uwe Popert.

Hausärztliche Risikoberatung zur kardiovaskulären Prävention. DEGAM Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin e.V. 2017; S3-Leitlinie, AWMF-Register-Nr. 053-024, DEGAM-Leitlinie Nr. 19.

47. Herold, Gerd. *Innere Medizin*. Berlin, Boston: De Gruyter; 2019.

48. Jarvie, Jennifer L.; Pandey, Ambarish; Ayers, Colby R.; McGavock, Jonathan M.; Sénéchal, Martin; Berry, Jarett D.; Patel, Kershaw V.; McGuire, Darren K. Aerobic Fitness and Adherence to Guideline-Recommended Minimum Physical Activity Among Ambulatory Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2019; 42(7):1333–9.

49. Sluik, Diewertje; Buijsse, Brian; Muckelbauer, Rebecca; Kaaks, Rudolf; Teucher, Birgit; Johnsen, Nina Føns; Tjønneland, Anne; Overvad, Kim; Ostergaard, Jane Nautrup; Amiano, Pilar; Ardanaz, Eva; Bendinelli, Benedetta; Pala, Valeria; Tumino, Rosario; Ricceri, Fulvio; Mattiello, Amalia; Spijkerman, Annemieke M. W.; Monninkhof, Evelyn M.; May, Anne M.; Franks, Paul W.; Nilsson, Peter M.; Wennberg, Patrik; Rolandsson, Olov; Fagherazzi, Guy; Boutron-Ruault, Marie-Christine; Clavel-Chapelon, Françoise; Castaño, José María Huerta; Gallo, Valentina; Boeing, Heiner; Nöthlings, Ute. Physical Activity and Mortality in Individuals With Diabetes Mellitus: A Prospective Study and Meta-analysis. *Arch Intern Med* 2012; 172(17):1285–95.

50. Garber, Carol Ewing; Blissmer, Bryan; Deschenes, Michael R.; Franklin, Barry A.; Lamonte, Michael J.; Lee, I-Min; Nieman, David C.; Swain, David P. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2011; 43(7):1334–59.

51. Stonerock, Gregory L.; Blumenthal, James A. Role of Counseling to Promote Adherence in Healthy Lifestyle Medicine: Strategies to Improve Exercise Adherence and Enhance Physical Activity. *Prog Cardiovasc Dis* 2017; 59(5):455–62.

52. Löllgen, Herbert; Erdmann, Erland; Gitt, Anselm K. Ergometrie: Belastungsuntersuchungen in Klin[i]k und Praxis. 3., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010.
53. Gläser, S.; Ittermann, T.; Schäper, C.; Obst, A.; Dörr, M.; Spielhagen, T.; Felix, S. B.; Völzke, H.; Bollmann, T.; Opitz, C. F.; Warnke, C.; Koch, B.; Ewert, R. Referenzwerte für die Spiroergometrie - Ergebnisse der Study of Health in Pomerania (SHIP). *Pneumologie* 2013; 67(1):58–63.
54. Piepoli, M. F.; Hoes, A. W.; Agewall, S.; Albus, C.; Brotons, C.; Catapano, A. L.; Cooney, M. T.; Corra, U.; Cosyns, B.; Deaton, C.; Graham, I.; Hall, M. S.; Hobbs, F. D. R.; Locher, M. L.; Lollgen, H.; Marques-Vidal, P.; Perk, J.; Prescott, E.; Redon, J.; Richter, D. J.; Sattar, N.; Smulders, Y.; Tiberi, M.; van der Worp, H. B.; van Dis, I.; Verschuren, W. M. M.; Binno, S.; E. S. C. Scientific Document Group. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J* 2016; 37(29):2315–81.
55. European Society of Cardiology, Deutsche Gesellschaft für Kardiologie. ESC Pocket Guidelines. Björm Bruckmeier Verlag GmbH; 2016.
56. Weston, K. S.; Wisloff, U.; Coombes, J. S. High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med* 2014; 48(16):1227–34.
57. Tjonna, A. E.; Lee, S. J.; Rognmo, O.; Stolen, T. O.; Bye, A.; Haram, P. M.; Loennechen, J. P.; Al-Share, Q. Y.; Skogvoll, E.; Slordahl, S. A.; Kemi, O. J.; Najjar, S. M.; Wisloff, U. Aerobic interval training versus continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome: a pilot study. *Circulation* 2008; 118(4):346–54.
58. Werner, C. M.; Hecksteden, A.; Morsch, A.; Zundler, J.; Wegmann, M.; Kratzsch, J.; Thiery, J.; Hohl, M.; Bittenbring, J. T.; Neumann, F.; Bohm, M.; Meyer, T.; Laufs, U. Differential effects of endurance, interval, and resistance training on telomerase activity and telomere length in a randomized, controlled study. *Eur Heart J* 2019; 40(1):34–46.

59. Shill, Daniel D.; Lansford, Kasey A.; Hempel, Hannah K.; Call, Jarrod A.; Murrow, Jonathan R.; Jenkins, Nathan T. Effect of exercise intensity on circulating microparticles in men and women. *Exp Physiol* 2018; 103(5):693–700.
60. Villelabeitia-Jaureguizar, K.; Vicente-Campos, D.; Senen, A. B.; Jimenez, V. H.; Garrido-Lestache, M. E. B.; Chicharro, J. L. Effects of high-intensity interval versus continuous exercise training on post-exercise heart rate recovery in coronary heart-disease patients. *Int J Cardiol* 2017; 244:17–23.
61. Wilhelm, E. N.; Gonzalez-Alonso, J.; Parris, C.; Rakobowchuk, M. Exercise intensity modulates the appearance of circulating microvesicles with proangiogenic potential upon endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2016; 311(5):H1297-H1310.
62. Fisher, G.; Brown, A. W.; Bohan Brown, M. M.; Alcorn, A.; Noles, C.; Winwood, L.; Resuehr, H.; George, B.; Jeansonne, M. M.; Allison, D. B. High Intensity Interval- vs Moderate Intensity- Training for Improving Cardiometabolic Health in Overweight or Obese Males: A Randomized Controlled Trial. *PLoS One* 2015; 10(10):e0138853.
63. Wisløff, Ulrik; Støylen, Asbjørn; Loennechen, Jan P.; Bruvold, Morten; Rognmo, Øivind; Haram, Per Magnus; Tjønnå, Arnt Erik; Helgerud, Jan; Slørdahl, Stig A.; Lee, Sang Jun; Videm, Vibeke; Bye, Anja; Smith, Godfrey L.; Najjar, Sonia M.; Ellingsen, Øyvind; Skjaerpe, Terje. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. *Circulation* 2007; 115(24):3086–94.
64. Wewege, M.; van den Berg, R.; Ward, R. E.; Keech, A. The effects of high-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous training on body composition in overweight and obese adults: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2017; 18(6):635–46.
65. Ramos, J. S.; Dalleck, L. C.; Ramos, M. V.; Borrani, F.; Roberts, L.; Gomersall, S.; Beetham, K. S.; Dias, K. A.; Keating, S. E.; Fasset, R. G.; Sharman, J. E.; Coombes, J. S. 12 min/week of high-intensity interval training reduces aortic reservoir pressure in individuals with metabolic syndrome: a randomized trial. *J Hypertens* 2016; 34(10):1977–87.
66. Ling, Charlotte; Rönn, Tina. Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Metab* 2019; 29(5):1028–44.

67. DeBoer, Mark D. Assessing and Managing the Metabolic Syndrome in Children and Adolescents. *Nutrients* 2019; 11(8).
68. Weihe, Paul; Weihrauch-Blüher, Susann. Metabolic Syndrome in Children and Adolescents: Diagnostic Criteria, Therapeutic Options and Perspectives. *Curr Obes Rep* 2019; 8(4):472–9.
69. Moore, Justin Xavier; Chaudhary, Ninad; Akinyemiju, Tomi. Metabolic Syndrome Prevalence by Race/Ethnicity and Sex in the United States, National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-2012. *Prev Chronic Dis* 2017; 14:E24.
70. Soleimani, Azam; Pourmoghaddas, Ali; Sadeghi, Masoumeh; Roohafza, Hamidreza; Talaei, Mohammad; Dianatkah, Minoo; Oveisgharan, Shahram; Soleimani, Maryam; Sarrafzadegan, Nizal. Risk and Age of Cardiovascular Event in Women with Metabolic Syndrome: Menopause Age in Focus. *Metab Syndr Relat Disord* 2018; 16(3):127–34.
71. Barrès, Romain; Zierath, Juleen R. The role of diet and exercise in the transgenerational epigenetic landscape of T2DM. *Nat Rev Endocrinol* 2016; 12(8):441–51.
72. Deligiannidou, Georgia-Eirini; Philippou, Elena; Vidakovic, Melita; Berghe, Wim V.; Heraclides, Alexandros; Grdovic, Nevena; Mihailovic, Mirjana; Kontogiorgis, Christos. Natural Products Derived from the Mediterranean Diet with Antidiabetic Activity: from Insulin Mimetic Hypoglycemic to Nutriepigenetic Modulator Compounds. *Curr Pharm Des* 2019; 25(15):1760–82.
73. Garralda-Del-Villar, Maria; Carlos-Chillerón, Silvia; Diaz-Gutierrez, Jesus; Ruiz-Canela, Miguel; Gea, Alfredo; Martínez-González, Miguel Angel; Bes-Rastrollo, Maira; Ruiz-Estigarribia, Liz; Kales, Stefanos N.; Fernández-Montero, Alejandro. Healthy Lifestyle and Incidence of Metabolic Syndrome in the SUN Cohort. *Nutrients* 2018; 11(1):65.
74. Romieu, Isabelle; Dossus, Laure; Barquera, Simón; Blottière, Hervé M.; Franks, Paul W.; Gunter, Marc; Hwalla, Nahla; Hursting, Stephen D.; Leitzmann, Michael; Margetts, Barrie; Nishida, Chizuru; Potischman, Nancy; Seidell, Jacob; Stepien, Magdalena; Wang, Youfa; Westerterp, Klaas; Winichagoon, Pattanee; Wiseman, Martin; Willett, Walter C. Energy balance and obesity: what are the main drivers? *Cancer Causes Control* 2017; 28(3):247–58.

75. Gerlach, Stefanie & Joost, Hans-Georg. Nationale Reduktionsstrategie 2016. Positionspapier von diabetesDE - Deutsche Diabetes-Hilfe. Ernährungs Umschau. 63. 88-91.
76. Wu, T.; Gao, X.; Chen, M.; van Dam, R. M. Long-term effectiveness of diet-plus-exercise interventions vs. diet-only interventions for weight loss: a meta-analysis. *Obes Rev* 2009; 10(3):313–23.
77. Del Buono, Marco Giuseppe; Arena, Ross; Borlaug, Barry A.; Carbone, Salvatore; Canada, Justin M.; Kirkman, Danielle L.; Garten, Ryan; Rodriguez-Miguel, Paula; Guazzi, Marco; Lavie, Carl J.; Abbate, Antonio. Exercise Intolerance in Patients With Heart Failure: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol* 2019; 73(17):2209–25.
78. Sängler, Sylvia. 050-001p_S3_Adipositas_Prävention_Therapie_2019-01.
79. Guazzi, M.; Adams, V.; Conraads, V.; Halle, M.; Mezzani, A.; Vanhees, L.; Arena, R.; Fletcher, G. F.; Forman, D. E.; Kitzman, D. W.; Lavie, C. J.; Myers, J.; European Association for Cardiovascular, Prevention; Rehabilitation; American Heart, Association. EACPR/AHA Scientific Statement. Clinical recommendations for cardiopulmonary exercise testing data assessment in specific patient populations. *Circulation* 2012; 126(18):2261–74.
80. Hollmann, Wildor; Strüder, Heiko K.; Predel, Hans-Georg; Tagarakis, Christos V. M. Spiroergometrie. Kardiopulmonale Leistungsdiagnostik des Gesunden und Kranken. 1. Aufl. s.l.: Schattauer GmbH Verlag für Medizin und Naturwissenschaften; 2006.
81. Calegari, L.; Nunes, R. B.; Mozzaquattro, B. B.; Rossato, D. D.; Dal Lago, P. Exercise training improves the IL-10/TNF-alpha cytokine balance in the gastrocnemius of rats with heart failure. *Braz J Phys Ther* 2018; 22(2):154–60.
82. Golbidi, S.; Laher, I. Exercise induced adipokine changes and the metabolic syndrome. *J Diabetes Res* 2014; 2014:726861.
83. Smart, N. A.; Larsen, A. I.; Le Maitre, J. P.; Ferraz, A. S. Effect of exercise training on interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and functional capacity in heart failure. *Cardiol Res Pract* 2011; 2011:532620.
84. Timmerman, K. L.; Flynn, M. G.; Coen, P. M.; Markofski, M. M.; Pence, B. D. Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14+CD16+) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise? *J Leukoc Biol* 2008; 84(5):1271–8.

85. Yeh, S. H.; Chuang, H.; Lin, L. W.; Hsiao, C. Y.; Wang, P. W.; Yang, K. D. Tai chi chuan exercise decreases A1C levels along with increase of regulatory T-cells and decrease of cytotoxic T-cell population in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30(3):716–8.
86. Abd El-Kader, Shehab M.; Al-Shreef, Fadwa M. Inflammatory cytokines and immune system modulation by aerobic versus resisted exercise training for elderly. *African Health Sciences* 2018; 18(1):120.
87. Hespe, G. E.; Kataru, R. P.; Savetsky, I. L.; Garcia Nores, G. D.; Torrisi, J. S.; Nitti, M. D.; Gardenier, J. C.; Zhou, J.; Yu, J. Z.; Jones, L. W.; Mehrara, B. J. Exercise training improves obesity-related lymphatic dysfunction. *J Physiol* 2016; 594(15):4267–82.
88. Liu, D.; Wang, R.; Grant, A. R.; Zhang, J.; Gordon, P. M.; Wei, Y.; Chen, P. Immune adaptation to chronic intense exercise training: new microarray evidence. *BMC Genomics* 2017; 18(1):29.
89. Denham, J.; Marques, F. Z.; Bruns, E. L.; O'Brien, B. J.; Charchar, F. J. Epigenetic changes in leukocytes after 8 weeks of resistance exercise training. *Eur J Appl Physiol* 2016; 116(6):1245–53.
90. Bäck, Magnus; Yurdagul, Arif; Tabas, Ira; Öörni, Katariina; Kovanen, Petri T. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol* 2019; 16(7):389–406.
91. Fredman, Gabrielle; Hellmann, Jason; Proto, Jonathan D.; Kuriakose, George; Colas, Romain A.; Dorweiler, Bernhard; Connolly, E. Sander; Solomon, Robert; Jones, David M.; Heyer, Eric J.; Spite, Matthew; Tabas, Ira. An imbalance between specialized pro-resolving lipid mediators and pro-inflammatory leukotrienes promotes instability of atherosclerotic plaques. *Nat Commun* 2016; 7:12859.
92. Jones, Hefin R.; Robb, Calum T.; Perretti, Mauro; Rossi, Adriano G. The role of neutrophils in inflammation resolution. *Semin Immunol* 2016; 28(2):137–45.
93. Proto, Jonathan D.; Doran, Amanda C.; Gusarova, Galina; Yurdagul, Arif; Sozen, Erdi; Subramanian, Manikandan; Islam, Mohammad N.; Rymond, Christina C.; Du, Jasper; Hook, Jaime; Kuriakose, George; Bhattacharya, Jahar; Tabas, Ira. Regulatory T

Cells Promote Macrophage Efferocytosis during Inflammation Resolution. *Immunity* 2018; 49(4):666-677.e6.

94. Tjonna, A. E.; Ramos, J. S.; Pressler, A.; Halle, M.; Jungbluth, K.; Ermacora, E.; Salvesen, O.; Rodrigues, J.; Bueno, C. R., Jr.; Munk, P. S.; Coombes, J.; Wisloff, U. EX-MET study: exercise in prevention on of metabolic syndrome - a randomized multicenter trial: rationale and design. *BMC Public Health* 2018; 18(1):437.

95. Mueller, Stephan; Winzer, Ephraim B.; Duvinage, André; Gevaert, Andreas B.; Edelmann, Frank; Haller, Bernhard; Pieske-Kraigher, Elisabeth; Beckers, Paul; Bobenko, Anna; Hommel, Jennifer; van de Heyning, Caroline M.; Esefeld, Katrin; Korn, Pia von; Christle, Jeffrey W.; Haykowsky, Mark J.; Linke, Axel; Wisløff, Ulrik; Adams, Volker; Pieske, Burkert; van Craenenbroeck, Emeline M.; Halle, Martin. Effect of High-Intensity Interval Training, Moderate Continuous Training, or Guideline-Based Physical Activity Advice on Peak Oxygen Consumption in Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2021; 325(6):542–51.

96. Korn, Pia von; Keating, Shelley; Mueller, Stephan; Haller, Bernhard; Kraenkel, Nicolle; Dinges, Sophia; Duvinage, André; Scherr, Johannes; Wisløff, Ulrik; Tjønn, Arnt Erik; Halle, Martin; Lechner, Katharina. The Effect of Exercise Intensity and Volume on Metabolic Phenotype in Patients with Metabolic Syndrome: A Randomized Controlled Trial. *Metab Syndr Relat Disord* 2021 Mar; (19(2)):107–114. Epub 2020 Nov 24.

97. Santegoets, S. J.; Dijkgraaf, E. M.; Battaglia, A.; Beckhove, P.; Britten, C. M.; Gallimore, A.; Godkin, A.; Gouttefangeas, C.; Gruijl, T. D. de; Koenen, H. J.; Scheffold, A.; Shevach, E. M.; Staats, J.; Tasken, K.; Whiteside, T. L.; Kroep, J. R.; Welters, M. J.; van der Burg, S. H. Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry. *Cancer Immunol Immunother* 2015; 64(10):1271–86.

98. Dunham, Richard M.; Cervasi, Barbara; Brenchley, Jason M.; Albrecht, Helmut; Weintrob, Amy; Sumpter, Beth; Engram, Jessica; Gordon, Shari; Klatt, Nichole R.; Frank, Ian; Sodora, Donald L.; Douek, Daniel C.; Paiardini, Mirko; Silvestri, Guido. CD127 and CD25 Expression Defines CD4(+) T Cell Subsets That Are Differentially Depleted during HIV Infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2008; 180(8):5582–92.

99. Seddiki, N.; Santner-Nanan, B.; Martinson, J.; Zaunders, J.; Sasson, S.; Landay, A.; Solomon, M.; Selby, W.; Alexander, S. I.; Nanan, R.; Kelleher, A.; Fazekas de St Groth, B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006; 203(7):1693–700.
100. BD Human Regulatory T Cell Cocktail (CD4/CD25/CD127), Simplify identification and isolation of viable Tregs. BD Biosciences 2009. <https://wwwbdbiosciences.com/en-us/applications/research-applications/t-cell-research/regulatory-t-cells>. Accessed September 28, 2018.
101. Saunders, Jessica A. Hutter; Estes, Katherine A.; Kosloski, Lisa M.; Allen, Heather E.; Dempsey, Kathryn M.; Torres-Russotto, Diego R.; Meza, Jane L.; Santamaria, Pamela M.; Bertoni, John M.; Murman, Daniel L.; Ali, Hesham H.; Standaert, David G.; Mosley, R. Lee; Gendelman, Howard E. CD4+ Regulatory and Effector/Memory T Cell Subsets Profile Motor Dysfunction in Parkinson's Disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 2012; 7(4):927–38.
102. Kawashiri, Shin-Ya; Kawakami, Atsushi; Okada, Akitomo; Koga, Tomohiro; Tamai, Mami; Yamasaki, Satoshi; Nakamura, Hideki; Origuchi, Tomoki; Ida, Hiroaki; Eguchi, Katsumi. CD4+CD25high/CD127low Treg Cell Frequency from Peripheral Blood Correlates with Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Rheumatology* 2011; 38(12):2517–21.
103. Bröker, Barbara; Schütt, Christine; Fleischer, Bernhard. *Grundwissen Immunologie*. 4. Auflage; 2019: 315-18.
104. Murphy, Kenneth; Weaver, Casey. *Janeway Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
105. Ambarus, C. A.; Krausz, S.; van Eijk, M.; Hamann, J.; Radstake, T. R. D. J.; Reedquist, K. A.; Tak, P. P.; Baeten, D. L. P. Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J Immunol Methods* 2012; 375(1-2):196–206.
106. Genin, Marie; Clement, Francois; Fattaccioli, Antoine; Raes, Martine; Michiels, Carine. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer* 2015:577.

107. Patel, V. K.; Williams, H.; Li, S. C. H.; Fletcher, J. P.; Medbury, H. J. Monocyte inflammatory profile is specific for individuals and associated with altered blood lipid levels. *Atherosclerosis* 2017; 263:15–23.
108. Bio-Rad Laboratories. Macrophage Polarization Mini Review. 2016
<https://www.bio-rad-antibodies.com/macrophage-polarization-minireview.html>. Accessed November 4, 2018.
109. Olink Proteomics. Biomarkers in Olink Cardiometabolic; 2019.
<https://www.olink.com/products/cardiometabolic-panel/biomarkers/#>. Accessed May 21, 2019.
110. Frodermann, Vanessa; Rohde, David; Courties, Gabriel; Severe, Nicolas; Schloss, Maximilian J.; Amatullah, Hajera; McAlpine, Cameron S.; Cremer, Sebastian; Hoyer, Friedrich F.; Ji, Fei; van Koeverden, Ian D.; Herisson, Fanny; Honold, Lisa; Masson, Gustavo Santos; Zhang, Shuang; Grune, Jana; Iwamoto, Yoshiko; Schmidt, Stephen P.; Wojtkiewicz, Gregory R.; Lee, I-Hsiu; Gustafsson, Karin; Pasterkamp, Gerard; Jager, Saskia C. A. de; Sadreyev, Ruslan I.; MacFadyen, Jean; Libby, Peter; Ridker, Paul; Scadden, David T.; Naxerova, Kamila; Jeffrey, Kate L.; Swirski, Filip K.; Nahrendorf, Matthias. Exercise reduces inflammatory cell production and cardiovascular inflammation via instruction of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med* 2019; 25(11):1761–71.
111. Simpson, Richard J.; Kunz, Hawley; Agha, Nadia; Graff, Rachel. Exercise and the Regulation of Immune Functions. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015; 135:355–80.
112. Shaw, D. M.; Merien, F.; Braakhuis, A.; Dulson, D. T-cells and their cytokine production: The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of strenuous exercise. *Cytokine* 2018; 104:136–42.
113. Wedell-Neergaard, Anne-Sophie; Krogh-Madsen, Rikke; Petersen, Gitte Lindved; Hansen, Åse Marie; Pedersen, Bente Klarlund; Lund, Rikke; Bruunsgaard, Helle. Cardiorespiratory fitness and the metabolic syndrome: Roles of inflammation and abdominal obesity. *PLoS One* 2018; 13(3):e0194991.
114. Campbell, John P.; Turner, James E. Debunking the Myth of Exercise-Induced Immune Suppression: Redefining the Impact of Exercise on Immunological Health Across the Lifespan. *Front Immunol* 2018; 9:648.

115. Idorn, Manja; Hojman, Pernille. Exercise-Dependent Regulation of NK Cells in Cancer Protection. *Trends Mol Med* 2016; 22(7):565–77.
116. Soehnlein, Oliver; Steffens, Sabine; Hidalgo, Andrés; Weber, Christian. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 2017; 17(4):248–61.
117. Finsterbusch, Michaela; Schrottmaier, Waltraud C.; Kral-Pointner, Julia B.; Salzmann, Manuel; Assinger, Alice. Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. *Platelets* 2018; 29(7):677–85.
118. Cossarizza, A.; Chang, H. D.; Radbruch, A.; Akdis, M.; Andra, I.; Annunziato, F.; Bacher, P.; Barnaba, V.; Battistini, L.; Bauer, W. M.; Baumgart, S.; Becher, B.; Beisker, W.; Berek, C.; Blanco, A.; Borsellino, G.; Boulais, P. E.; Brinkman, R. R.; Buscher, M.; Busch, D. H.; Bushnell, T. P.; Cao, X.; Cavani, A.; Chattopadhyay, P. K.; Cheng, Q.; Chow, S.; Clerici, M.; Cooke, A.; Cosma, A.; Cosmi, L.; Cumano, A.; v. d. Dang; Davies, D.; Biasi, S. de; Del Zotto, G.; Della Bella, S.; Dellabona, P.; Deniz, G.; Dessing, M.; Diefenbach, A.; Di Santo, J.; Dieli, F.; Dolf, A.; Donnerberg, V. S.; Dorner, T.; Ehrhardt, G. R. A.; Endl, E.; Engel, P.; Engelhardt, B.; Esser, C.; Everts, B.; Dreher, A.; Falk, C. S.; Fehniger, T. A.; Filby, A.; Fillatreau, S.; Follo, M.; Forster, I.; Foster, J.; Foulds, G. A.; Frenette, P. S.; Galbraith, D.; Garbi, N.; Garcia-Godoy, M. D.; Geginat, J.; Ghoreschi, K.; Gibellini, L.; Goettlinger, C.; Goodyear, C. S.; Gori, A.; Grogan, J.; Gross, M.; Grutzkau, A.; Grummitt, D.; Hahn, J.; Hammer, Q.; Hauser, A. E.; Haviland, D. L.; Hedley, D.; Herrera, G.; Herrmann, M.; Hiepe, F.; Holland, T.; Hombrink, P.; Houston, J. P.; Hoyer, B. F.; Huang, B.; Hunter, C. A.; Iannone, A.; Jack, H. M.; Javega, B.; Jonjic, S.; Juelke, K.; Jung, S.; Kaiser, T.; Kalina, T.; Keller, B.; Khan, S.; Kienhofer, D.; Kroneis, T.; Kunkel, D.; Kurts, C.; Kvistborg, P.; Lannigan, J.; Lantz, O.; Larbi, A.; LeibundGut-Landmann, S.; Leipold, M. D.; Levings, M. K.; Litwin, V.; Liu, Y.; Lohoff, M.; Lombardi, G.; Lopez, L.; Lovett-Racke, A.; Lubberts, E.; Ludewig, B.; Lugli, E.; Maecker, H. T.; Martrus, G.; Matarese, G.; Maueroder, C.; McGrath, M.; McInnes, I.; Mei, H. E.; Melchers, F.; Melzer, S.; Mielenz, D.; Mills, K.; Mirrer, D.; Mjosberg, J.; Moore, J.; Moran, B.; Moretta, A.; Moretta, L.; Mosmann, T. R.; Muller, S.; Muller, W.; Munz, C.; Multhoff, G.; Munoz, L. E.; Murphy, K. M.; Nakayama, T.; Nasi, M.; Neudorfl, C.; Nolan, J.; Nourshargh, S.; O'Connor, J. E.; Ouyang, W.; Oxenius, A.; Palankar, R.; Panse, I.; Peterson, P.; Peth, C.; Petriz, J.; Philips, D.; Pickl, W.; Piconese, S.; Pinti, M.; Pockley, A. G.; Podolska, M. J.; Pucillo, C.; Quataert, S. A.; Radstake, Trdj; Rajwa, B.; Rebhahn,

J. A.; Recktenwald, D.; Remmerswaal, E. B. M.; Rezvani, K.; Rico, L. G.; Robinson, J. P.; Romagnani, C.; Rubartelli, A.; Ruckert, B.; Ruland, J.; Sakaguchi, S.; Sala-de-Oyanguren, F.; Samstag, Y.; Sanderson, S.; Sawitzki, B.; Scheffold, A.; Schiemann, M.; Schildberg, F.; Schimisky, E.; Schmid, S. A.; Schmitt, S.; Schober, K.; Schuler, T.; Schulz, A. R.; Schumacher, T.; Scotta, C.; Shankey, T. V.; Shemer, A.; Simon, A. K.; Spidlen, J.; Stall, A. M.; Stark, R.; Stehle, C.; Stein, M.; Steinmetz, T.; Stockinger, H.; Takahama, Y.; Tarnok, A.; Tian, Z.; Toldi, G.; Tornack, J.; Traggiai, E.; Trotter, J.; Ulrich, H.; van der Braber, M.; van Lier, R. A. W.; Veldhoen, M.; Vento-Asturias, S.; Vieira, P.; Voehringer, D.; Volk, H. D.; Volkmann, K. von; Waisman, A.; Walker, R.; Ward, M. D.; Warnatz, K.; Warth, S.; Watson, J. V.; Watzl, C.; Wegener, L.; Wiedemann, A.; Wienands, J.; Willimsky, G.; Wing, J.; Wurst, P.; Yu, L.; Yue, A.; Zhang, Q.; Zhao, Y.; Ziegler, S.; Zimmermann, J. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol* 2017; 47(10):1584–797.

119. Shapiro, Howard Maurice. *Practical flow cytometry*. 4th ed. New York: Wiley-Liss; 2003.

120. Zimmer, Philipp; Schenk, Alexander; Kieven, Markus; Holthaus, Michelle; Lehmann, Jonas; Lövenich, Lukas; Bloch, Wilhelm. Exercise induced alterations in NK-cell cytotoxicity - methodological issues and future perspectives. *Exerc Immunol Rev* 2017; 23:66–81.

121. Castanheira, Fernanda V. S.; Kubes, Paul. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood* 2019; 133(20):2178–85.

122. Bashant, Kathleen R.; Vassallo, Arlette; Herold, Christoph; Berner, Reinhard; Menschner, Leonhard; Subburayalu, Julien; Kaplan, Mariana J.; Summers, Charlotte; Guck, Jochen; Chilvers, Edwin R.; Toepfner, Nicole. Real-time deformability cytometry reveals sequential contraction and expansion during neutrophil priming. *J Leukoc Biol* 2019:1143–53.

123. Headland, Sarah E.; Norling, Lucy V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol* 2015; 27(3):149–60.

124. Passacquale, Gabriella; Vamadevan, Padman; Pereira, Luis; Hamid, Colleen; Corrigan, Valerie; Ferro, Albert. Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PLoS One* 2011; 6(10):e25595.

125. Ambrosetti, Marco; Abreu, Ana; Corrà, Ugo; Davos, Constantinos H.; Hansen, Dominique; Frederix, Ines; Iliou, Marie C.; Pedretti, Roberto Fe; Schmid, Jean-Paul; Vigorito, Carlo; Voller, Heinz; Wilhelm, Matthias; Piepoli, Massimo F.; Bjarnason-Wehrens, Birna; Berger, Thomas; Cohen-Solal, Alain; Cornelissen, Veronique; Dendale, Paul; Doehner, Wolfram; Gaita, Dan; Gevaert, Andreas B.; Kemps, Hareld; Kraenkel, Nicolle; Laukkanen, Jari; Mendes, Miguel; Niebauer, Josef; Simonenko, Maria; Zwisler, Ann-Dorthe Olsen. Secondary prevention through comprehensive cardiovascular rehabilitation: From knowledge to implementation. 2020 update. A position paper from the Secondary Prevention and Rehabilitation Section of the European Association of Preventive Cardiology. *Eur J Prev Cardiol* 2020;2047487320913379.
126. Welty, Francine K. How do elevated triglycerides and low HDL-cholesterol affect inflammation and atherothrombosis? *Curr Cardiol Rep* 2013; 15(9):400.
127. Engin, Ayse Basak. What Is Lipotoxicity? In: Engin AB, Engin A, editors. *Obesity and Lipotoxicity*. Cham: Springer International Publishing; 2017:197–220.
128. Oikonomou, Evangelos K.; Antoniades, Charalambos. The role of adipose tissue in cardiovascular health and disease. *Nature Reviews Cardiology* 2019; 16(2):83–99.
129. van der Pol, E.; Boing, A. N.; Gool, E. L.; Nieuwland, R. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J Thromb Haemost* 2016; 14(1):48–56.
130. Laurent, Stephane; Cockcroft, John; van Bortel, Luc; Boutouyrie, Pierre; Giannattasio, Cristina; Hayoz, Daniel; Pannier, Bruno; Vlachopoulos, Charalambos; Wilkinson, Ian; Struijker-Boudier, Harry; on behalf of the European Network for Non-invasive Investigation of Large Arteries. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J* 2006; 27(21):2588–605.
131. Rasmussen, Henrik Berg; Bjerre, Ditte; Linnet, Kristian; Jürgens, Gesche; Dalhoff, Kim; Stefansson, Hreinn; Hankemeier, Thomas; Kaddurah-Daouk, Rima; Taboureau, Olivier; Brunak, Søren; Houmann, Tine; Jeppesen, Pia; Pagsberg, Anne Katrine; Plessen, Kerstin; Dyrborg, Jørgen; Hansen, Peter Riis; Hansen, Poul Erik; Hughes, Tim; Werge, Thomas. Individualization of treatments with drugs metabolized by CES1: combining genetics and metabolomics. *Pharmacogenomics* 2015; 16(6):649–65.

132. Wang, Dandan; Zou, Liwei; Jin, Qiang; Hou, Jie; Ge, Guangbo; Yang, Ling. Human carboxylesterases: a comprehensive review. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2018; 8(5):699–712.
133. Lian, Jihong; Nelson, Randal; Lehner, Richard. Carboxylesterases in lipid metabolism: from mouse to human. *Protein Cell* 2018; 9(2):178–95.
134. Nagashima, Shuichi; Yagyu, Hiroaki; Takahashi, Nirei; Kurashina, Tomoyuki; Takahashi, Manabu; Tsuchita, Takeshi; Tazoe, Fumiko; Wang, Xiao Li; Bayasgalan, Tumenbayar; Sato, Naoko; Okada, Kenta; Nagasaka, Shoichiro; Gotoh, Takaya; Kojima, Masayuki; Hyodo, Masanobu; Horie, Hisanaga; Hosoya, Yoshinori; Okada, Masaki; Yasuda, Yoshikazu; Fujiwara, Hiroyuki; Ohwada, Michitaka; Iwamoto, Sadahiko; Suzuki, Mitsuaki; Nagai, Hideo; Ishibashi, Shun. Depot-specific expression of lipolytic genes in human adipose tissues—association among CES1 expression, triglyceride lipase activity and adiposity. *J Atheroscler Thromb* 2011; 18(3):190–9.
135. Xu, Jiesi; Li, Yuanyuan; Chen, Wei-Dong; Xu, Yang; Yin, Liya; Ge, Xuemei; Jadhav, Kavita; Adorini, Luciano; Zhang, Yanqiao. Hepatic carboxylesterase 1 is essential for both normal and farnesoid X receptor-controlled lipid homeostasis. *Hepatology* 2014; 59(5):1761–71.
136. Xu, Jiesi; Xu, Yang; Xu, Yanyong; Yin, Liya; Zhang, Yanqiao. Global inactivation of carboxylesterase 1 (*Ces1/Ces1g*) protects against atherosclerosis in *Ldlr* ^{-/-} mice. *Sci Rep* 2017; 7(1):17845.
137. Xu, Jiesi; Yin, Liya; Xu, Yang; Li, Yuanyuan; Zalzal, Munaf; Cheng, Gang; Zhang, Yanqiao. Hepatic carboxylesterase 1 is induced by glucose and regulates postprandial glucose levels. *PLoS One* 2014; 9(10):e109663.
138. Badot, Valérie; Luijten, Remco K. M. A. C.; van Roon, Joel A.; Depresseux, Geneviève; Aydin, Selda; van den Eynde, Benoît J.; Houssiau, Frédéric A.; Lauwerys, Bernard R. Serum soluble interleukin 7 receptor is strongly associated with lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2013; 72(3):453–6.
139. Haugen, Fred; Norheim, Frode; Lian, Henrik; Wensaas, Andreas J.; Dueland, Svein; Berg, Ole; Funderud, Ane; Skålhegg, Bjørn S.; Raastad, Truls; Drevon, Christian A. IL-7 is expressed and secreted by human skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 298(4):C807-16.

140. Maniecki, Maciej Bogdan; Etzerodt, Anders; Moestrup, Søren Kragh; Møller, Holger Jon; Graversen, Jonas Heilskov. Comparative assessment of the recognition of domain-specific CD163 monoclonal antibodies in human monocytes explains wide discrepancy in reported levels of cellular surface CD163 expression. *Immunobiology* 2011; 216(8):882–90.
141. López-Vicario, Cristina; Rius, Bibiana; Alcaraz-Quiles, José; González-Pérez, Ana; Martínez-Puchol, Ana Isabel; Casulleras, Mireia; Duran-Güell, Marta; Ibarzabal, Ainitze; Corcelles, Ricard; Laguna-Fernández, Andrés; Back, Magnus; Titos, Esther; Clària, Joan. Association of a variant in the gene encoding for ERV1/ChemR23 with reduced inflammation in visceral adipose tissue from morbidly obese individuals. *Sci Rep* 2017; 7(1):15724.
142. Ridker, P. M.; Everett, B. M.; Thuren, T.; MacFadyen, J. G.; Chang, W. H.; Ballantyne, C.; Fonseca, F.; Nicolau, J.; Koenig, W.; Anker, S. D.; Kastelein, J. J. P.; Cornel, J. H.; Pais, P.; Pella, D.; Genest, J.; Cifkova, R.; Lorenzatti, A.; Forster, T.; Kobalava, Z.; Vida-Simiti, L.; Flather, M.; Shimokawa, H.; Ogawa, H.; Dellborg, M.; Rossi, P. R. F.; Troquay, R. P. T.; Libby, P.; Glynn, R. J.; Cantos Trial Group. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* 2017; 377(12):1119–31.
143. Ridker, Paul M.; Everett, Brendan M.; Pradhan, Aruna; MacFadyen, Jean G.; Solomon, Daniel H.; Zaharris, Elaine; Mam, Virak; Hasan, Ahmed; Rosenberg, Yves; Iturriaga, Erin; Gupta, Milan; Tsigoulis, Michelle; Verma, Subodh; Clearfield, Michael; Libby, Peter; Goldhaber, Samuel Z.; Seagle, Roger; Ofori, Cyril; Saklayen, Mohammad; Butman, Samuel; Singh, Narendra; Le May, Michel; Bertrand, Olivier; Johnston, James; Paynter, Nina P.; Glynn, Robert J. Low-Dose Methotrexate for the Prevention of Atherosclerotic Events. *N Engl J Med* 2019; 380(8):752–62.
144. Panfoli, Isabella; Santucci, Laura; Bruschi, Maurizio; Petretto, Andrea; Calzia, Daniela; Ramenghi, Luca A.; Ghiggeri, Gianmarco; Candiano, Giovanni. Microvesicles as promising biological tools for diagnosis and therapy. *Expert review of proteomics* 2018; 15(10):801–8.
145. Ahnström, Josefin; Axler, Olof; Dahlbäck, Björn. HDL stimulates apoM secretion. *Protein Pept Lett* 2010; 17(10):1285–9.

146. Zheng, Zhi; Zeng, Yongzhi; Zhu, Xiao; Tan, Ying; Li, Yi; Li, Qian; Yi, Guanghui. ApoM-S1P Modulates Ox-LDL-Induced Inflammation Through the PI3K/Akt Signaling Pathway in HUVECs. *Inflammation* 2019; 42(2):606–17.
147. Ruiz, Mario; Okada, Hiromi; Dahlbäck, Björn. HDL-associated ApoM is anti-apoptotic by delivering sphingosine 1-phosphate to S1P1 & S1P3 receptors on vascular endothelium. *Lipids Health Dis* 2017; 16(1):36.
148. Blaho, Victoria A.; Galvani, Sylvain; Engelbrecht, Eric; Liu, Catherine; Swendeman, Steven L.; Kono, Mari; Proia, Richard L.; Steinman, Lawrence; Han, May H.; Hla, Timothy. HDL-bound sphingosine-1-phosphate restrains lymphopoiesis and neuroinflammation. *Nature* 2015; 523(7560):342–6.
149. Tsai, Hsing-Chuan; Han, May H. Sphingosine-1-Phosphate (S1P) and S1P Signaling Pathway: Therapeutic Targets in Autoimmunity and Inflammation. *Drugs* 2016; 76(11):1067–79.
150. Blood atlas - PAM - The Human Protein Atlas; 2020
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000145730-PAM/blood>. Accessed July 6, 2020.
151. Sanctis, J. B. de; Blanca, I.; Bianco, N. E. Expression of different lipoprotein receptors in natural killer cells and their effect on natural killer proliferative and cytotoxic activity. *Immunology* 1995; 86(3):399–407.
152. Wong, Vincent Wai-Sun; Adams, Leon A.; Lédíngheñ, Victor de; Wong, Grace Lai-Hung; Sookoian, Silvia. Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH - current progress and future promise. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018; 15(8):461–78.
153. Nono Nankam, Pamela A.; Mendham, Amy E.; Smidt, Melony F. de; Keswell, Dheshnie; Olsson, Tommy; Blüher, Matthias; Goedecke, Julia H. Changes in systemic and subcutaneous adipose tissue inflammation and oxidative stress in response to exercise training in obese black African women. *J Physiol (Lond)* 2020; 598(3):503–15.
154. Guin, Aharna; Chatterjee Adhikari, Maitrayee; Chakraborty, Sumit; Sinhamahapatra, Pradyot; Ghosh, Alakendu. Effects of disease modifying anti-rheumatic drugs on subclinical atherosclerosis and endothelial dysfunction which has been detected in early rheumatoid arthritis: 1-year follow-up study. *Semin Arthritis Rheum* 2013; 43(1):48–54.

155. Perretti, Mauro; Leroy, Xavier; Bland, Elliot J.; Montero-Melendez, Trinidad. Resolution Pharmacology: Opportunities for Therapeutic Innovation in Inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 2015; 36(11):737–55.

156. Ridker, P. M.; Luscher, T. F. Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease. *Eur Heart J* 2014; 35(27):1782–91.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sylvia Kia, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Individuelle Unterschiede in der immunometabolischen Reaktion auf Training bei Patienten und Patientinnen mit Metabolischem Syndrom [*Individual Differences in the Immunometabolic Reaction to Exercise Training in Patients with Metabolic Syndrome*] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Vorträge bei Kongressen im Rahmen der Promotionsarbeit:

- *K. Lechner, P. von Korn, **S. Kia**, A. Duvinage, J. Scherr, U. Landmesser, M. Halle, N. Kränkel (presenting author)*. Exercise intensity and volume differentially impact on innate and adaptive immunity in patients with metabolic syndrome: Freier Vortrag, 85. Jahrestagung der DGK in Mannheim, April 2019.
- ***S. Kia** (presenting author), K. Lechner, P. von Korn, A. Duvinage, J. Scherr, U. Landmesser, M. Halle, N. Kränkel*. Exercise intensity and volume differentially impact on innate and adaptive immunity in patients with metabolic syndrome: Rapid Fire Talk, Young-DZHK-Retreat in Potsdam, September 2019.
- *M. Bahls, **S. Kia**, S. Kaczmarek, K. Lehnert, I. Urbaneck, U. Landmesser, S.E. Felix, M. Doerr, N. Kraenkel (presenting author)*. Temporal analysis of leukocyte extravasation and morphological activation after standard cardiopulmonary exercise testing in patients with heart failure with reduced ejection fraction: Posterpräsentation, ESC Congress 2019 in Paris, September 2019.
- *K. Lechner, P. von Korn, **S. Kia** (presenting author), A. Duvinage, J. Scherr, U. Landmesser, M. Halle, N. Kränkel*. Co-regulation of immune parameters by exercise training in patients with metabolic syndrome: Posterpräsentation, DGK Herztage in Berlin, Oktober 2019.
- *P. von Korn, **S. Kia**, K. Lechner, A. Duvinage, J. Scherr, U. Landmesser, M. Halle, N. Kränkel (presenting author)*. Inter-individual differences in the response to an exercise training intervention in patients with metabolic syndrome: ePosterpräsentation, ESC Congress 2020 – The Digital Experience, August 2020.

Danksagung

Mein ausdrücklicher und besonderer Dank gilt PD Dr. Nicolle Kränkel, die mich als zuverlässige Betreuerin durch die Promotion geführt hat. Mit ihrer motivierenden Art hat sie mir stets Begeisterung an der Wissenschaft vermittelt und ist mir eine persönliche Inspiration.

Weiter möchte ich Prof. Dr. Ulf Landmesser danken, der als Klinikdirektor die Rahmenbedingungen dieser Arbeit ermöglicht hat.

Für ihre Einarbeitung in die Laborarbeit danke ich Minoo Moobed, ohne deren Expertise ich die Experimente nie so reibungslos hätte durchführen können. Sabine Knüppel bin ich dankbar für ihre Unterstützung bei der Durchführung der zahlreichen FACS-Messungen.

Ich danke auch unseren Kooperationspartnern des Zentrums für präventive Sportmedizin und Sportkardiologie der Technischen Universität München für die gute Zusammenarbeit. Mein Dank gilt hier insbesondere Pia von Korn, Dr. Katharina Lechner und Prof. Dr. Martin Halle.

Außerdem bedanke ich mich beim DZHK, DDS und DSHF für die Förderung des Projekts und letzteren insbesondere auch für mein Stipendium.

Schließlich danke ich meiner Familie, meinen Freund:innen und meinem Lebenspartner für ihre stetige liebevolle Unterstützung. Nicht zuletzt danke ich meiner Mutter Dr. Adelheid Hecker-Kia, die nicht nur geduldig Korrektur gelesen, sondern mich vor allem unablässig auf meinem Weg unterstützt und ermutigt hat.

Bescheinigung über Statistikberatung



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBiKE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Name, Vorname: Kia, Sylvia

Emailadresse: sylvia.kia@charite.de

Matrikelnummer: 219483

PromotionsbetreuerIn: PD Dr. Nicole Kränkel

Promotionsinstitution/ Klinik:

Klinik für Kardiologie, Charité Campus Benjamin Franklin

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau Kia innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBiKE) bei mir eine statistische Beratung zu ihrem Promotionsvorhaben „*Individuelle Unterschiede in der immunometabolischen Reaktion auf Training bei Patienten mit Metabolischem Syndrom*“ wahrgenommen hat.

Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 22.09.2020
- Termin 2: 27.10.2020
- Termin 3: 03.02.2021

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Empfehlung zur adäquaten Deskription der drei Patientengruppen je nach Art und Verteilung der Variablen
- Empfehlungen zur korrekten Anwendung geeigneter statistischer Tests und Methoden in Abhängigkeit von den Fragestellungen (t-Test bzw. Mann-Whitney-/Wilcoxon-Test für unverbundene und verbundene Vergleiche bzgl. quantitativer Merkmale, Benjamini-Hochberg-Adjustierung des α -Niveaus für multiples Testen, Spearman's r zur Korrelationsanalyse, t-SNE zur Dimensionsreduktion)
- Hinweise zur Interpretation der Ergebnisse
- Bitte in der Diskussion aufgreifen, dass die im explorativen Teil der Arbeit gefundenen Resultate durch weitere unabhängige Studien bestätigt werden müssen.

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum:

Name des Beraters/ der Beraterin:

09.02.2021

A. Stroux

Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel

 CHARITÉ
UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie
Campus Charité Mitte
Charitéplatz 1 | D-10117 Berlin