Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik

Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawaz

Vermehrte Bindung von oxidiertem-LDL auf zirkulierenden Thrombozyten bei Patienten mit Akutem Koronarsyndrom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Juliane Grimm
aus Stuttgart

2012

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz
2. Berichterstatter: Professor Dr. N. Stefan

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

12-LO	12/15-Lipoxygenase
AMI	Akuter Myokardinfarkt
Apo	Apoprotein
ATP	Adenosintriphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CK	Kreatinkinase
CK-MB	Kreatinkinase – MuscleBrain (herzspezifisch)
cTnI	cardiales Troponin I
cTn$^-$IAP	Troponin-negative-Instabile Angina pectoris
cTnT	cardiales Troponin T
Ery	Erythrozyt
FFS	Freie Fettsäure
HKL	Herzkatheter-Labor
HL	Hepatische Lipase
IAP	Instabile Angina Pectoris
IDL	Intermediate-density-Lipoprotein
kDA	Kilo-Dalton
KHK	Koronare Herzerkrankungen
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low-density-lipoprotein
MI	Myokardinfarkt
MoLDL	minimal oxidiertes LDL
Mph	Makrophage
MPO	Myeloperoxidase
NO	Stickstoffmonoxid

NSTEMI	Non-ST-elevating-myocardial-infarction (Nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkt)
oxLDL	oxidiertes Low-density-lipoprotein
Plt	Platelet (Thrombozyt)
RCT	Reverser Cholesterin Transport
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAP	Stabile Angina Pectoris
STEMI	ST-elevating-myocardial-infarction (ST-Strecken-Hebungsinfarkt)
TG	Triglyceride
VLDL	Very-low-density-Lipoprotein

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 9
1.1 Atherosklerose 9
1.1.1 Definition 9
1.1.2 Risikofaktoren erster Ordnung 9
1.1.3 Risikofaktoren zweiter Ordnung 11
1.2 Die Rolle der Thrombozyten bei der Pathogenese der Atherosklerose 12
1.2.1 Aufgaben der Endothelschicht 12
1.2.2 Schädigung der Endothelschicht 13
1.3 Koronare Herzerkrankungen 15
1.3.1 Definition 15
1.3.2 Manifestationsformen der Koronaren Herzerkrankung 15
1.4 Thrombozyten und Koronare Herzerkrankung 18
1.4.1 Pathophysiologie: Thrombozyten und KHK 18
1.5 Der Lipidstoffwechsel 19
1.5.1 Das Cholesterin 19
1.5.2 Der Cholesterintransport 19
1.5.3 Aufgaben der einzelnen Lipoproteine 20
1.5.4 Pathophysiologie: LDL und Atherosklerose 24
1.6 Zielsetzung und Motivation 25
2 Material und Methoden 26
2.1 Patientenpopulation 26
2.2 Methoden 27
2.2.1 Durchflusszytometrie 27
2.3 Probenauswertung 28
2.3.1 Probenvorbereitung zur Durchflusszytometrie 28
2.3.2 FACS-Messung 29

2.4 Datendarstellung und statistische Auswertung 29
3 Ergebnisse 31
3.1 Bindung von oxLDL auf zirkulierenden Thrombozyten 31
3.2 Thrombozyten-gebundenes oxLDL bei Akutem Koronarsyndrom 33
3.3 Thrombozyten-gebundenes oxLDL bei den Untergruppen des Akuten Koronarsyndroms 34
3.4 Thrombozyten-gebundenes oxLDL und bekannte Thrombozytenaktivierungsmarker 35
3.5 Thrombozyten-gebundenes oxLDL und Thrombozytenzahl ... 36
4 Diskussion 38
4.1 Thrombozyten-gebundenes oxLDL beim ACS 38
4.2 Bindung von oxLDL auf den zirkulierenden Thrombozyten 39
4.3 Negative Korrelation von oxLDL mit zirkulierenden Thrombozyten 40
4.4 Negative Korrelation von oxLDL und Plasma-LDL 41
4.5 Thrombozyten-gebundenes oxLDL und bekannte Thrombozytenaktivierungsmarker 41
4.6 Die Wirkung von oxLDL bei der Pathogenese der Atherosklerose 42
5 Zusammenfassung 44
6 Literaturverzeichnis 46
7 Danksagung 52
8 Lebenslauf 53

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

1.1.1 Definition

In den letzten Jahrzehnten stellte die Koronare Herzerkrankung eine der häufigsten Todesursachen nicht nur in der Bundesrepublik Deutschland, sondern weltweit dar. Im Jahre 2009 betrug der Anteil der an Herz- und Kreislauferkrankungen verstorbenen Menschen 48,7% (183 897 Männer und 232 718 Frauen) aller in Deutschland Verstorbenen (854 544), mit einem prozentualen Anteil des akuten Myokardinfarkts von 7,0%, wovon 55,8% Männer (33 563 Verstorbene) und 44,2% Frauen (26 590 Verstorbene) waren [1].

Die Atherosklerose ist laut WHO definiert als: „[..] eine variable Kombination von Intimaveränderungen der Arterien, die aus einer fokalen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, fibrösem Gewebe und Kalkablagerungen besteht und mit Mediaveränderungen einhergeht.“ Die Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen stellen heutzutage in Deutschland die höchste Morbidität dar und sind für 30% der Todesfälle im Alter zwischen 30 und 65 Jahren verantwortlich. Als Risikofaktoren gelten alle gefäßschädigenden Grunderkrankungen. Sie werden eingeteilt in Risikofaktoren erster und zweiter Ordnung.

1.1.2 Risikofaktoren erster Ordnung

1. Arterielle Hypertonie

Die arterielle Hypertonie, wird nach der WHO in drei Grade eingeteilt. Ab systolischen Werten von 140-159 und diastolischen Werten zwischen 90-99, was Grad I entspricht (Grad II: 160-179/100-109; Grad III: ≥180/≥110), spricht man von einer manifesten arteriellen Hypertonie, die gefäßschädigend ist und somit als behandlungsbedürftig gilt [2].

2. Störungen im Lipidstoffwechsel

Eine Hyperlipidämie ab einem Gesamtcholesterin von > 200 mg/dl, einer LDL-Cholesterinerhöhung ab > 160 mg/dl und einer gleichzeitigen Hypo-HDL-ämie (< 40 mg/dl) ist für die Entstehung der Atherosklerose verantwortlich, da sie zu Gefäßwandablagerungen führen kann.

3. Nikotinabusus

Nikotin hat verschiedene schädigende Auswirkungen auf die Gefäßwand und trägt zur Entstehung der Atherosklerose bei, unter anderem durch Auswirkungen auf die Thrombozytenaktivierung und Makrophagenfunktion [3]. Desweiteren sorgt es für die Erhöhung des Lipoproteinspiegels im Plasma und die Änderung der Integrität des Endothels [4].

4. Diabetes mellitus

Ab Nüchternblutzuckerwerten von > 110 mg/dl setzt der erhöhte Glucosespiegel einen Reiz zur Endothelschädigung und führt darüberhinaus zu einer verstärkten Phagozytose des Cholesterins. Durch diese Hyperglucosämie kommt es zu einer reaktiven Fibrose in der Gefäßwand, die somit an Elastizität verliert und den Prozess der Entstehung der Atherosklerose weiter begünstigt [5].

5. Alter

Mit zunehmendem Alter kommt es auch ohne die oben genannten Risikofaktoren zu „physiologischen“ Lipideinlagerungen in der Gefäßwand, vor allem in der Intima, der innersten Schicht der Gefäßwand. Dabei sieht man bereits in der ersten Lebensdekade Veränderungen an der Aorta, in der zweiten Lebensdekade in den Koronarien (Herzkranzgefäßen) und in der dritten bis vierten Lebensdekade in den Hirnarterien. Die Progredienz bis hin zur manifesten Atherosklerose steigt mit zunehmendem Alter.

6. Geschlecht

Bis zu einem Alter zwischen 35 und 55 Jahren sterben auch heutzutage noch viermal mehr Männer an einem Herzinfarkt als Frauen. Bis zum Eintritt der Menopause profitieren die Frauen vom gefäßprotektiven Effekt des Östrogens.

Erst nach der Menopause, wenn die Östrogenproduktion nachlässt, gleicht sich die Morbidität und Mortalität von Männern und Frauen an. Somit ist ab einem Alter zwischen 60 und 80 kein geschlechtlicher Mortalitätsunterschied mehr festzustellen.

1.1.3 Risikofaktoren zweiter Ordnung

1. Adipositas

Eine Adipositas besteht laut Definition, wenn der Anteil der Fettmasse am Körpergewicht bei Frauen 30% und bei Männern 20% übersteigt. Die Abschätzung der Fettmasse gelingt mit dem Body mass index:

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

Als normalgewichtig gilt ein BMI zwischen 18,5-24,9. Die manifeste Adipositas wird in 3 Grade eingeteilt: Grad I: 30,0-34,9; Grad II: 35,0-39,9 und Grad III: ≥ 40. In den Industrieländern nimmt die Prävalenz der Adipositas immer mehr zu und wird daher auch als „Wohlstandssyndrom“ bezeichnet wird. Das Alter beim Auftreten einer manifesten Adipositas ist im Vergleich zu den letzten Jahrzehnten deutlich in die früheren Lebensdekaden verschoben und stellt heutzutage bereits im Kindesalter ein Problem dar.

2. Hyperurikämie

Ab Serum-Harnsäurewerten von > 6,4 mg/dl spricht man per definitionem von einer Hyperurikämie. In den Wohlstandsländern leiden ca. 20% der Männer daran, weshalb es auch mit dem Metabolischen-Syndrom in Beziehung gebracht wird. Auch hier haben die Frauen bis zum Eintritt der Menopause einen Schutz, da die negative Wirkung der Urikämie erst mit dem Versiegen der Östrogene wirksam wird.

3. Positive Familienanamnese

Als familiäre Belastung gilt es, wenn ein Verwandter ersten Grades (Mutter, Vater oder Geschwister) bei Männern vor dem 55. Lebensjahr und bei Frauen vor dem 65. Lebensjahr an einer Folgeerkrankung der Atherosklerose erkrankt (Myokardinfarkt /KHK).

4. Sonstige Faktoren

Zu den weiteren gefäßschädigenden Risikofaktoren zählen unter anderem Stress, der in einigen Berufsgruppen gehäuft vorkommt, sowie Bewegungsmangel, der heutzutage häufig bereits im Kindesalter zu beobachten ist.

1.2 Die Rolle der Thrombozyten bei der Pathogenese der Atherosklerose

1.2.1 Aufgaben der Endothelschicht

Die Endothelschicht stellt eine selektive permeable Barriere für gelöste Blutbestandteile dar und kann mittels Expression von speziellen Adhäsionsmolekülen Blutzellen aus dem Gefäßlumen herausfiltern. Das Endothel erfüllt darüberhinaus eine wichtige Funktion für die Vasokonstriktion und die Vasodilatation, indem es die dafür notwendigen Substanzen freisetzt.
Vasodilatatorisch wirken unter anderem Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin, wo hingegen Endothelin und das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) als Vasokonstriktoren wirken [6]. Wenn das Endothel intakt ist, stößt es Blutbestandteile wie zum Beispiel Erythrozyten oder Thrombozyten ab und hält diese somit im Gefäßlumen. Das Endothel hält die lokale Bluthomöostase im Gleichgewicht, indem es an der Bildung von Gerinnungs- und Fibrinolysefaktoren beteiligt ist. Prothrombotisch wirken der Plättchenaktivierungsfaktor (PAF), der Tissue-Factor (TF), der von-Willebrand-Faktor (vWF), sowie der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI).

Im Gegensatz dazu ist das Endothel ebenso in der Lage antithrombotische Faktoren wie Prostazyklin, Thrombomodulin, Plasminogenaktivator und heparinartige Moleküle zu bilden. Aber nicht nur bei der Gerinnung spielt das Endothel eine entscheidende Rolle, sondern auch bei der parakrinen Wachstumsregulation des subendothelialen Gewebes und es ist in der Lage Entzündungsreaktionen zu beeinflussen, indem es Wachstumsfaktoren (plateled-derived growth factor und Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor) oder Wachstumsinhibitoren (Heparin, transforming-growth-factor-

β) bildet.

Ist das Endothel jedoch beschädigt, kommt es zu entzündlichen Prozessen und Ablagerungen in der Gefäßwand, wie es bei der Pathogenese der Atherosklerose der Fall ist.

1.2.2 Schädigung der Endothelschicht

Die Schädigung der Endothelschicht verläuft in verschiedenen Stadien ab, auf die im Folgenden näher eingegangen wird:

1. Initialphase

Ganz am Anfang des Prozesses steht bei der Response-to-injury-Hypothese die endotheliale Dysfunktion, die durch die oben genannten Risikofaktoren ausgelöst wird (u.a. Nikotin, arterielle Hypertonie oder Hyperlipoproteinämie) [7]. Die Schädigung des Endothels ermöglicht vor allem dem Low-desity-Lipoprotein (LDL), einen passiven Lipideinstrom aus dem Blutplasma in die Gefäßwand über die dann offenen interzellulären Verbindungen (junctions). Wird der Lipidanteil des LDL´s nicht vom High-density-Lipoprotein (HDL) zurück ins Blut transportiert, so wird es durch endotheliale Bestandteile [8] und der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [9] oxidiert und es entsteht als Zwischenstufe das minimal-oxidierte-LDL (moLDL).

2. Inflammatorische Phase

Wenn das Endothel erstmals mit dem moLDL in Kontakt gekommen ist, so kommt es zu einer Akkumulation von moLDL, welche das Endothel zur Chemokin-Produktion angeregt. Dies hat zur Folge, dass Monozyten aus dem Blut in die Intima einwandern und dort zu Makrophagen umgewandelt werden. Gleichzeitig induziert moLDL die Expression von Adhäsionsmolekülen, z.B. P-Selektin, auf den Endothelzellen. Diese Adhäsionsmoleküle dienen den Monozyten als Verankerung.

3. Schaumzellbildung

Das moLDL wird durch Enzyme weiter oxydiert und kann erst in dieser stark-oxydierenden Form von den Makrophagen schnell aufgenommen werden. Diese weitere Oxidation geschieht zum einen wieder durch ROS, welche in

Makrophagen und Endothelzellen enthalten sind, zum anderen aber auch durch die in den Makrophagen enthaltenen Enzyme, der Myeloperoxidase [10] [11] und der 12/15-Lipoxygenase [8]. Diese oxydierte Form des LDL´s (oxLDL) ist um ein Vielfaches reaktionsfreudiger und kann so leichter von den Makrophagen über Scavanger-Rezeptoren aufgenommen werden, als die unveränderte, im Blut zirkulierende Form. Durch die Aufnahme des oxLDL in den Makrophagen wandelt sich dieser in eine sogenannte Schaumzelle (foam cell) um, also einen lipidhaltigen Makrophagen, welcher nicht mehr in der Lage ist diese oxidierte LDL-Form zu verarbeiten [12]. Der Schaumzellbildung kann jedoch der Makrophage selbst entgegenwirken, da dieser in der Lage ist ein Apolipoprotein E zu bilden, welches dem Cholesterin einen Efflux aus dem Makrophagen ermöglicht. Dieses Cholesterin kann dann vom HDL aufgenommen und zurück ins Blut transportiert werden. Diesen Vorgang nennt man reversen Cholesterintransport [13]. Wenn jedoch genügend oxLDL im Gewebe vorhanden ist, kommt es zu solch einer Schaumzellbildung und diese Schaumzellen akkumulieren. Die Schaumzellen gehen nach kurzer Zeit zu Grunde und das oxLDL verbleibt in der Intima und hinterlässt cholesterinreiche Plaques, welche histologisch als sogenannte „fatty streaks“ zu sehen sind [14].

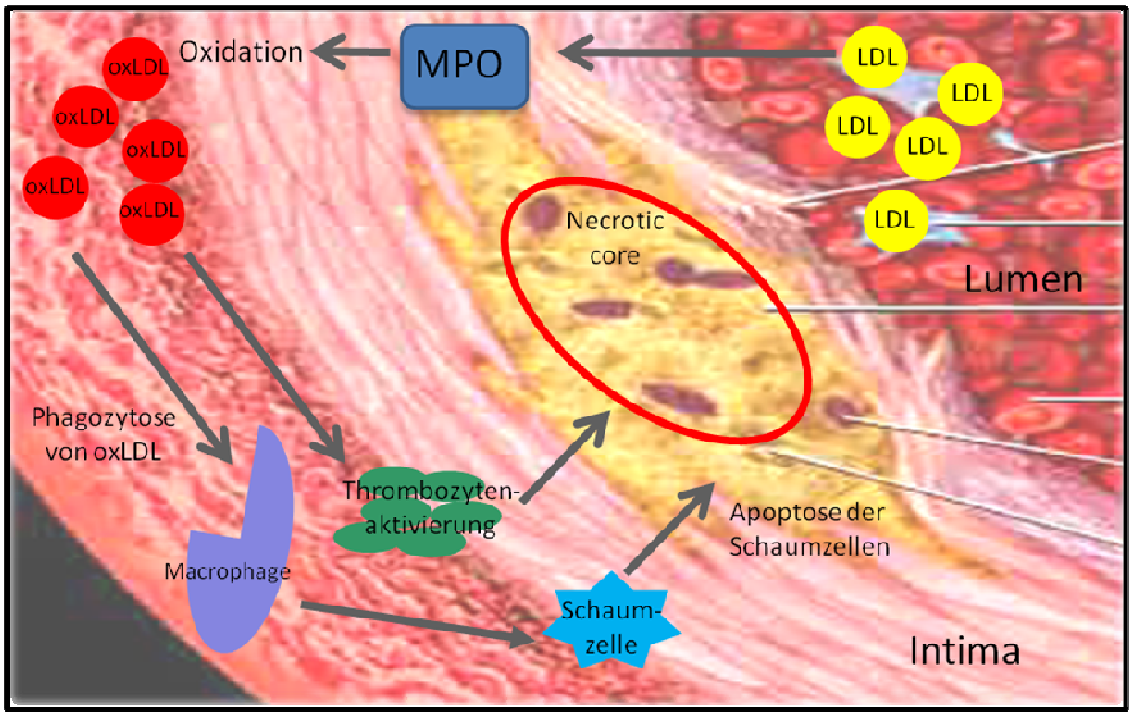

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Pathogenese der Atheroskleose
In Anlehnung an Akkerman JW. Et al., Int J Biochem Cell Biol., 2008.

1.3 Koronare Herzerkrankungen

1.3.1 Definition

Die Koronare Herzerkrankung (KHK) stellt die Manifestation der oben beschrieben Atherosklerose in den Koronarien (Herzkranzgefäßen) dar. Durch den Verschluss der Koronarien kommt es zur Minderdurchblutung und somit zu einem Sauerstoffmangel (Ischämie) des betroffenen Gebietes des Herzmuskels. Es entsteht also ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und –angebot, welches man als Koronarinsuffizienz bezeichnet. Die KHK ist eine chronische Erkrankung, die über Jahre bis Jahrzehnte entsteht und allmählich fortschreitet. Ihre Entstehung ist bedingt durch die unter 1.1 genannten Risikofaktoren. Als Folge der Myokardischämie ist das Leitsymptom der KHK die Angina pectoris (AP) mit vorwiegend retrosternal lokalisierten Schmerzen, die durch körperliche oder psychische Belastung ausgelöst werden und im Normalfall unter Ruhe nach 5-10 Minuten wieder nachlassen. Die Schmerzen können typischerweise in den Hals, Unterkiefer, Schultergegend, linken (rechten) Arm, sowie in den Oberbauch ausstrahlen. Verstärkt, bzw. ausgelöst werden kann die AP durch Kälte oder dem sogenannten Roemheld-Syndrom (voller, geblähter Magen). Die Angina pectoris tritt in der Regel erst ab einem Stenosegrad von 75% auf. Die KHK hat, bedingt durch die hervorgerufene Myokardischämie verschiedene Manifestationsformen, welche unter 1.3.2 erläutert werden.

1.3.2 Manifestationsformen der Koronaren Herzerkrankung

Bei der **Stabilen Angina pectoris** (**SAP**) handelt es sich um einen immer wiederkehrenden retrosternalen Schmerz, der bei körperlicher oder psychischer Belastung auftritt und nach wenigen Minuten in Ruhe wieder verschwindet [15]. Die SAP wird nach der Canadian Cardiovascular Society-Klassifikation (CCS) in 5 Grade eingeteilt:

0: Stumme Ischämie
I: AP bei schwerer Belastung
II: AP bei geringer Belastung
III: AP bei normaler Belastung
IV: AP bereits in Ruhe

Charakteristisch für die SAP ist nicht nur die Besserung in Ruhe, sondern auch das gute Ansprechen auf Nitroglyzerin [16]. Die SAP ist das Symptom der Koronarstenose, durch die es zur oben bereits beschriebenen Koronarinsuffizinz kommt und durch welche das Herz unter der Belastung keine ausreichende Sauerstoffversorgung mehr gewährleisten kann [17].

Beim **Akuten Koronarsyndrom (ACS)** handelt es sich hingegen um eine akute Durchblutungsstörung der Koronarien, bei der der typische retrosternale Schmerz länger als 20 Minuten anhält. Da sich das ACS unter Ruhebedingungen nicht bessert und auch nicht auf Nitratpräparate anspricht, handelt es sich um eine Notfallsituation, die einer sofortigen Diagnostik und Therapie bedarf [18]. Dem ACS liegt pathomorphologisch zu 95% eine Plaqueruptur zugrunde, die akut zum Verschluss der Koronarien und somit zu einer Myokardischämie führt. Das Ausmaß der Symptomatik und des Myokardschadens ist abhängig vom Stenosegrad und der Dauer der Myokardischämie [19].
Zum Akuten Koronarsyndrom zählt man neben dem Akuten Myokardinfarkt (AMI) auch die Instabile Angina pectoris (IAP).

Die **Instabile Angina pectoris (IAP)** präsentiert sich im Gegensatz zur Stabilen Angina pectoris, mit einem zunehmendem Schmerzcharakter sowohl in der Intensität als auch in der Dauer und kann sich auf dem Boden einer bereits bestehenden SAP entwickeln. Darüberhinaus spricht die IAP erst deutlich verzögert auf Nitroglyzerin an. Die IAP zeigt im Gegensatz zum Akuten Myokardinfarkt jedoch keine Erhöhung der herzspezifischen Enzyme, wie kardiales Troponin-I und -T oder der CK-MB.

Der **Akute Myokardinfarkt (AMI)** wird seinerseits in zwei Entitäten eingeteilt (siehe Abb.2), in den transmuralen und dadurch im EKG ST-Strecken hebenden Myokardinfarkt (STEMI) und den intramuralen nicht-ST-Strecken hebenden Myokardinfarkt (NSTEMI).

I. **STEMI**, wenn einer der folgenden Befunde vorliegt [20]:
   - eine ST-Strecken-Hebung von mindestens 0,1 mV in mindestens zwei zusammenhängenden Extremitäten-

Ableitungen (Ableitung I-III)

- eine ST-Strecken-Hebung von mindestens 0,2 mV in zwei zusammenhängenden Brustwandableitungen (Ableizung V1-V12) -

- ein Linksschenkelblock mit infarkttypischer Symptomatik.

II. **NSTEMI**: Im EKG finden sich keine oder nur transiente ST-Strecken-Hebungen von einer Dauer von weniger als 20 Minuten [21]. Hier lassen sich jedoch laborchemische Veränderungen (CK-Erhöhung und/oder Troponin-Erhöhung) nachweisen.

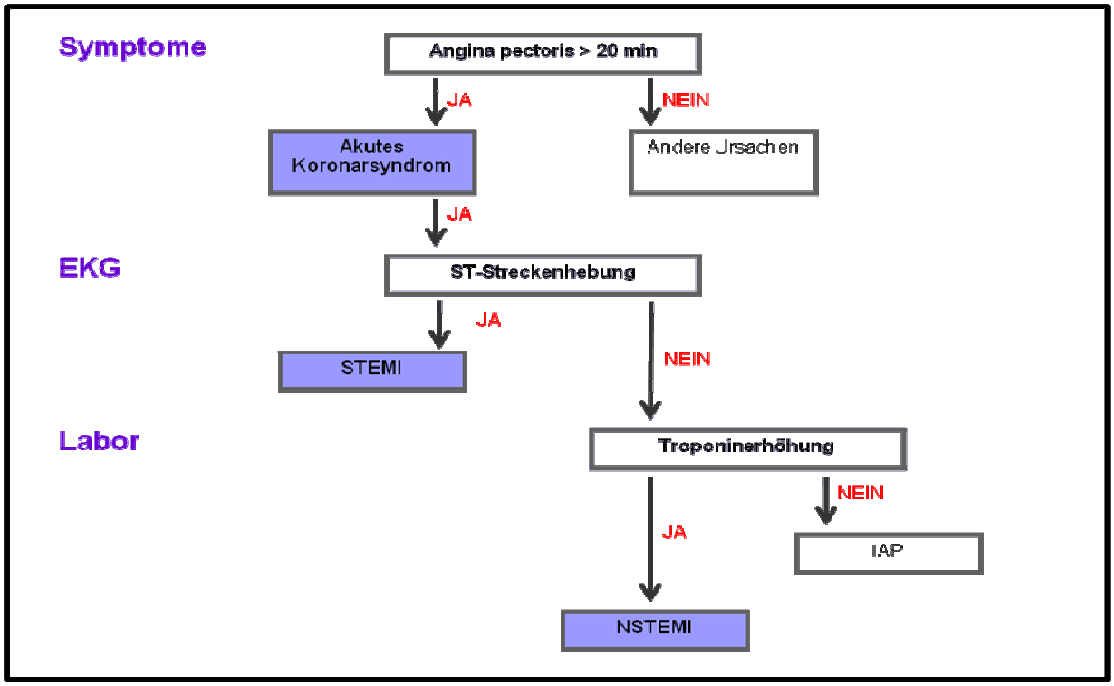

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Einteilung des ACS
Anhand des Auftretens und der Dauer der Angina pectoris entscheidet man, ob es sich um ein ACS oder eine SAP handelt. Mittels EKG kann man, meist schon im Rettungswagen, einen STEMI diagnostizieren und der/die Patient/in erhält umgehend eine Herzkatheter-Intervention oder eine Lysetherapie. Wenn keine EKG-Veränderungen nachweisbar sind, entscheidet man anhand der Laborwerte (cTn, CK-MB). Wenn keine Troponinerhöhung vorliegt, handelt es sich nicht um ein ACS, sondern um eine Instabile Angina Pectoris (IAP). Ist das cTn und/oder die CK-MB erhöht, handelt es sich um ein ACS in Form eines NSTEMI.

1.4 Thrombozyten und Koronare Herzerkrankung

1.4.1 Pathophysiologie: Thrombozyten und KHK

Heutzutage kennt man die wichtige Rolle der Thrombozyten in der Hämostase. Es ist bekannt, dass es durch Adhäsion an der Läsion und einer anschließenden Aggregation mit anderen Thrombozyten zur Bildung eines „Thrombozytennetzes“ und somit zur Blutstillung kommt. Neben dieser, für den Körper, essenziellen Aufgabe der Blutstillung spielen die Thrombozyten auch bei der Entstehung der Atherosklerose eine wichtige Rolle, wie es bereits einige Studien belegt haben [22] [23]. Durch die Sekretion der aktivierten Thrombozyten von IL-1 und CD40-Liganden werden die chemotaktischen sowie adhäsiven Eigenschaften des Endothels verändert, was die Einwanderung von Monozyten sowie die Migration glatter Muskelzellen (Intimaproliferation) begünstigt und somit wesentlich zur Entzündungsreaktion beim Akuten Koronarsyndrom beiträgt [24]. Beim Akuten Koronarsyndrom handelt es sich pathophysiologisch um eine Plaqueruptur mit anschließender Thrombozytenaggregation und einer daraus resultierenden Thrombusbildung, die wiederum durch den auf den Thrombozyten enthaltenen Kollagen-Rezeptor GP VI gefördert wird [25] [26].

Jedoch tragen die Thrombozyten nicht nur durch diesen thrombotischen Gefäßverschluss zur Koronaren Herzerkrankung bei, sie sind zudem noch in der Lage Serotonin und Thromboxan A2 zu sekretieren. Dies führt zu Koronarspasmen und somit zu einer Ischämie im betroffenen Gebiet [24]. Neben der Hämostase und der Atherogenese sind die Thrombozyten ebenso für die Regeneration von Gefäßen und Gewebe verantwortlich, wie es bereits in früheren Studien unserer Forschungsgruppe gezeigt wurde [27]. Sie rekrutieren über den auf der Thrombozytenoberfläche gebundenen Stromal-cell-derived-Faktor-1 (SDF-1) aus dem Knochenmark sogenannte Progenitorzellen, die bei der Geweberegeneration beteiligt sind [28][29].

1.5 Der Lipidstoffwechsel

1.5.1 Das Cholesterin

Cholesterin ist ein für den Körper wichtiges Lipid. Es ist nicht nur ein stabilisierender Bestandteil der Zellmembranen, sondern wird auch für die Produktion von Steroidhormonen (Androgene, Estrogene, Gestagene sowie Gluco- und Mineralcorticoide) und Gallensäure verwendet. Es wird zu einem kleinen Teil über die Nahrung aufgenommen aber zum größten Teil (90%) im Körper selbst synthetisiert. Täglich werden etwa 0,3 g aus dem Dünndarm resorbiert und 1-2 g selbst synthetisiert. Dies geschieht zu 70% in der Leber und zu 30% im Dünndarm. Der Gesamtgehalt im menschlichen Körper beträgt etwa 140 g und ist bei jüngeren Frauen niedriger als bei gleichalten Männern, dieser Unterschied gleicht sich allerdings mit zunehmendem Alter aus. Der größte Teil wird dabei in der Leber gespeichert. Die Organe mit dem höchsten Cholesterinbedarf stellen das Gehirn (ca. ein Viertel des Gesamtcholesterins) und die steroidproduzierenden Organe wie Hoden, Ovarien und Nebenniere dar [30]. Da das Cholesterin die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann, ist das Gehirn selbst in der Lage es zu synthetisieren.

1.5.2 Der Cholesterintransport

Da das Cholesterin nicht wasserlöslich ist, befindet es sich zu 95% intrazellulär und wird zum Transport an lipophile Substanzen (Triglyceride, Phospholipide und Fettsäuren) gebunden und dann als Lipoproteine (Transportproteine) über die Blutbahn zum Bestimmungsort transportiert. Die Lipoproteine werden aufgrund ihrer Dichte in fünf Hauptklassen eingeteilt:

High-density-Lipoprotein	(HDL)
Low-density-Lipoprotein	(LDL)
Intermediate-density-Lipoprotein	(IDL)
Very-low-density-Lipoprotein	(VLDL)
Chylomikrone	

Die Hülle der Lipoproteine besteht aus amphophilen Lipiden, während der Kern aus hydrophoben Lipiden, wie Cholesterinester und Triglyceride, besteht.

In der Hülle sind sogenannte Apoproteine (z.B. Apo B 100 und Apo E) verankert, mit Hilfe derer sich die Lipoproteine an Enzyme oder Rezeptoren binden können, was sie somit für die Stoffwechselregulation unerlässlich macht.

1.5.3 Aufgaben der einzelnen Lipoproteine

1. Chylomikrone

Chylomikrone haben einen Durchmesser von 100-1.000 nm und eine Dichte von <0,95 g/ml. Wie alle Lipoproteine enthalten auch sie ein Apoprotein (Apo E). Sie werden postprandial in den Enterozyten aus Triglyceriden (TG), Cholesterinestern und Cholesterin gebildet und dann aus dem Dünndarm in die Lymphbahn sezerniert. Von dort aus gelangen sie über den oberen Venenwinkel in die Blutbahn. Den größten Anteil stellen dabei die Triglyceride mit 84% dar, während Cholesterin 2% und seine Ester lediglich 4% ausmachen. In den Kapillaren von Fett- und Muskelgewebe werden durch die Lipoproteinlipase die enthaltenen Fettsäuren gespalten und von den Fett- und Muskelzellen aufgenommen. Dort werden sie entweder umgehend verbraucht oder gespeichert. Die im Blut verbleibenden Chylomikronen haben nun einen wesentlich höheren Cholesterinanteil und werden nun als Chylomikronen-Remnants bezeichnet. In dieser Form gelangen sie nun zur Leber und werden dort gespeichert oder über die Galle wieder ausgeschieden.

2. VLDL

Das Very-low-density-Lipoprotein hat einen Durchmesser von 30-70 nm und eine Dichte von < 1,006 g/ml. Sein wichtigstes Apoprotein ist das Apo B 100. VLDL wird im endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten der Leber synthetisiert und dient dem Transport des eigens im Körper synthetisierten Cholesterins. Es besteht ebenfalls zum Großteil aus Triglyceriden (51%). Daneben besteht es zu 7% aus Cholesterin und zu 13% aus Cholesterinestern. Die Bildung von VLDL geschieht in Abhängigkeit von Triglyceriden, d.h. je mehr TG´s in den Körper aufgenommen werden, desto höher ist die Synthese von VLDL. Die Sekretion von VLDL kann ebenso durch bestimmte Faktoren, wie hyperkalorische Ernährung, Typ-II-Diabetes mellitus, Ethanolaufnahme und Östrogene gesteigert werden. Aus dem in die Blutbahn

sezernierten VLDL werden durch die im Plasma enthaltene Lipoproteinlipase freie Fettsäuren abgespalten. Bei dieser Triglyceridhydrolyse, welche hauptsächlich im Fett-und Muskelgewebe erfolgt, entsteht Intermediate-Low-Lipoprotein.

3. IDL

Das Intermediate-density-Lipoprotein mit einem Durchmesser von 27 nm, besitzt aufgrund der abgespaltenen Fettsäuren eine höhere Dichte als das VLDL (1,006-1,019 g/ml). Es enthält als wichtige Apoproteine zum einen Apo E und Apo B 100. Das IDL stellt die Zwischenstufe vom VLDL zum LDL dar. Durch eine weitere Hydrolyse der hepatischen Lipase (HL), wird ein Großteil der TG´s hydrolysiert und es entsteht nun das Low-density-Lipoprotein. Sowohl VLDL als auch IDL können über den LDL-Rezeptor der Leber eliminiert werden. Dies geschieht durch die Bindung von Apo E und Apo B 100 an den LDL-Rezeptor.

4. LDL

Das Low-density-Lipoprotein besitzt einen Durchmesser von 22 nm, eine Dichte von 1,019-1,063 g/ml und trägt auf seiner Oberfläche das Apoprotein Apo B 100. Das LDL transportiert ca. 70% des Plasmacholesterins und gilt somit als dessen Hauptträger. Es wird von der Leber nicht selbst synthetisiert, sondern entsteht aus der oben beschriebenen Triglyceridhydrolyse der Lipasen. Die Plasmakonzentration des LDL ist somit abhängig von der VLDL-Synthese und der Elimination über den LDL-Rezeptor. LDL-Rezeptoren befinden sich auf nahezu allen Zelltypen um deren Versorgung mit Cholesterin sicherzustellen, da dieses ein wichtiger Bestandteil der Zellmembran ist. Joseph Leonard Goldstein und Michael S. Brown erhielten 1985 für die Aufklärung des Aufnahmemechanismus über den LDL-Rezeptor und die Bedeutung für den Cholesterinhaushalt den Nobelpreis für Medizin [31]. Die beladenen Rezeptoren konzentrieren sich an sogenannten Coated Pits auf der Zelloberfläche um dann via Endozytose in das Zellinnere geschleust zu werden. In der Zelle herrscht ein saures Milieu, welches es dem LDL ermöglicht sich vom LDL-Rezeptor zu lösen und durch eine lysosomale Lipase in seine Bestandteile (freie Fettsäuren,

Cholesterin und dessen Ester) zerlegt zu werden. Das Cholesterin kann nun in die Zellmembran eingebaut werden, während der Rezeptor zurück an die Zelloberfläche (Rezeptor-Recycling) wandert.

Die LDL-Aufnahme wird über einen negativen Rückkopplungs-mechanismus gesteuert, d.h. wenn sich bereits genügend Cholesterin intrazellulär befindet, wird die Expression von LDL-Rezeptoren reduziert. Umgekehrt wird der Cholesterin-Plasmaspiegel erniedrigt, wenn viel LDL von der Leber aufgenommen wird, demnach also bei hoher LDL-Rezeptoraktivität. Über den LDL-Rezeptor werden circa 2/3 des im LDL enthaltenen Cholesterins verstoffwechselt. Dies geschieht hauptsächlich durch die Leber, die das Cholesterin zur Synthese der Steroidhormone oder zur Bildung von Gallensäuren verwendet. Die entstandenen Gallensäuren werden entweder über den Darm ausgeschieden oder über den enterohepatischen Kreislauf nochmals wiederverwertet (siehe Abb.3). Das übrige Drittel, das nicht über den LDL-Rezeptor eliminiert wird, wird von der Gefäßwand oxidiert und durch sogenannte Scavanger-Rezeptoren der Makrophagen aufgenommen (siehe 1.4).

5. HDL

Das High-density-Lipoprotein ist mit einem Durchmesser von 8 nm und einer Dichte von 1,063-1,219 g/ml das kleinste, aber dichteste aller Lipoproteine. Das HDL wird im Darm und in der Leber synthetisiert und ist in seinem „unreifen“ (Cholesterinfreien) Stadium scheibenförmig. Seine Hauptaufgabe ist der Rücktransport des Cholesterins zur Leber, damit es dort über die Gallensäuren ausgeschieden werden kann. Das HDL gilt als das „gute Cholesterin“, da es das überflüssige Cholesterin abtransportiert und somit als Antagonist des LDL fungiert. Für den Körper ist demnach folgendes Verhältnis „gesund“: HDL > LDL

Das HDL entsorgt das Cholesterin über einen Prozess, welcher als Reverse-Cholesterin-Transport (RCT) bezeichnet wird. Dieser Prozess, der Wirbeltierspezifisch ist, wird durch das auf dem HDL befindlichen Apoprotein Apo A1 ermöglicht. Dieses Apoprotein bindet das Cholesterin, welches unter ATP-Verbrauch aus der Zelle geschleust wird. Das Cholesterin wird nun von

der im HDL enthaltenen Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) verestert, welche sich nach diesem Vorgang wieder vom HDL trennt. Nun ist das das HDL „reif“ und aus der Scheibenform hat sich in diesem beladenen Zustand eine kugelförmige Konfiguration gebildet. Von den Hepatozyten der Leber wird das Cholesterin vom HDL übernommen und im Gegenzug dazu erhält das HDL Triglyceride vom LDL. Diese vom HDL aufgenommenen TG´s werden von der hepatischen Lipase hydrolysiert und somit recycled. Das LDL wird via LDL-Rezeptor in die Leber aufgenommen und abgebaut.

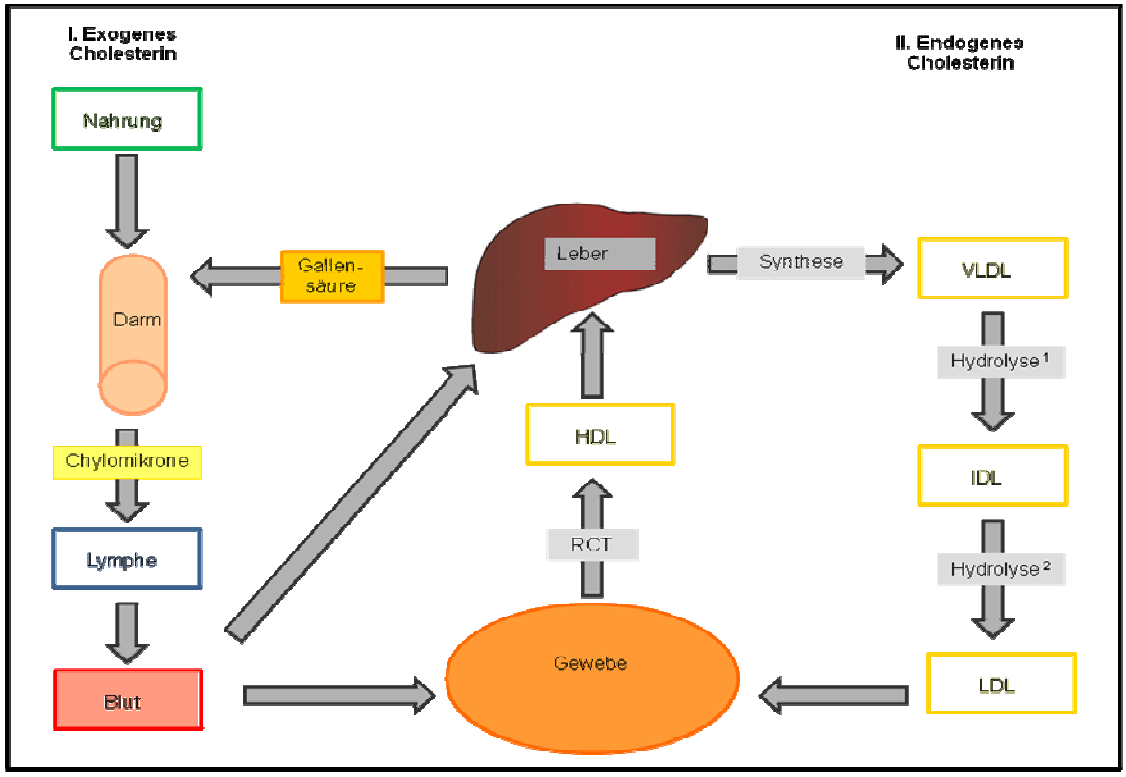

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Cholesterinstoffwechsels
Es finden im Körper zwei verschiedene Stoffwechselvorgänge statt. Unter (I.) wird der exogene Cholesterinstoffwechsel beschrieben, d.h. es handelt sich hierbei um durch die Nahrung zugeführtes Cholesterin, das aus dem Darm resorbiert wird. Beim endogenen (II.) Cholesterin handelt es sich um ein von der Leber synthetisiertes Cholesterin, das zuerst in Form von VLDL in die Blutbahn gelangt. Durch Hydrolyse im Fett- und Muskelgewebe (1) entsteht daraus IDL. Durch eine weitere Hydrolyse der hepatischen Lipase (2) entsteht nun das LDL, welches dann vom jeweiligen Gewebe aufgenommen und verstoffwechselt wird. Um wieder aus dem Gewebe zurück zur Leber transportiert zu werden, benötigt es einen Reverse-Cholesterin-Transport (RCT) auf das HDL. An HDL gebunden wird das nicht benötigte Cholesterin zur Leber transportiert um dort über die Galle in den Darm ausgeschieden zu werden.

1.5.4 Pathophysiologie: LDL und Atherosklerose

Die Oxidation des LDL spielt bei der Entstehung der Atherosklerose eine wichtige Rolle. Dieser Prozess der Oxidation geschieht über meherere Zwischenstufen und findet in der Intimaschicht der Gefäße statt, wie oben (1.2.3 Schädigung der Endothelschicht) bereits beschrieben. Die Schädigung am Endothel ermöglicht vor allem dem im Blutplasma enthaltenen Low-desity-Lipoprotein (LDL) einen passiven Lipideinstrom über die interzellulären Verbindungen (junctions). Einerseits können High-density-Lipoproteine (HDL) den Lipidanteil des LDL übernehmen und zurück ins Blut führen. Geschieht dies aber nicht, wird das LDL durch endotheliale Bestandteile, wie der 12/15-Lipoxygenase (12-LO) [8], der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [9] oder der Myeloperoxidase oxidiert und es entsteht zunnächst das minimal-oxidierte-LDL (moLDL). HDL enthält eine Lipoxygenase, womit sie in der Lage ist, die Oxidation und somit die Entstehung von moLDL zu verhindern, sofern HDL ausreichend im Blutplasma zirkuliert. In der Endothelschicht wird das moLDL dann über eine weitere Oxidation zum oxidierten LDL (oxLDL). Dieser Prozess wird durch ein Enzym, die sogenannte Myeloperoxidase (MPO), welches sich in Entzündungszellen wie beispielsweise den gewebespezifischen Makro-phagen (z.B. Kupfferzellen) befindet katalysiert [32]. Die MPO gehört laut Literatur [33] neben den bisherig bekannten (siehe 1.1.1 & 1.1.2) zu einem der Risikofaktoren für die Koronaren Herzerkrankungen (KHK). Diese oxidierte Form ist um ein Vielfaches rektionsfreudiger als das nicht-oxidierte LDL, welches im Blutplasma zirkuliert. Das oxLDL ist nun in der Lage über unterschiedliche Mechanismen den Prozess der Atherosklerose zu fördern. Diese oxidierte Form wird von den gewebsspezifischen Makrophagen aufgenommen, welche sich dann zu sogenannten Schaumzellen umwandeln. Diese Schaumzellen sammeln sich im Gewebe an und gehen allmählich zugrunde und hinterlassen den im oxLDL enthaltenen Lipidanteil.

Daneben hat das oxLDL auch direkten Einfluss auf die Thrombozyten, da es in der Lage ist, deren Adhäsion an der Gefäßwand und die in der Intima stattfindenden Aggregation zu fördern [14] [34]. Diese Aktivierung fördert den atherosklerotischen Prozess in der Gefäßwand. Darüber hinaus inhibiert das

oxLDL die NO-Synthese, was die Vasodilatation einschränkt. Durch diese Gefäßverengung erhält das umliegende Gewebe, wie zum Beispiel das Myokard, weniger Sauerstoff und zugleich wird das Gefäßlumen neben der Plaquebildung zusätzlich eingeengt, was die Entstehung der Atherosklerose weiter fördert.

Neben diesen bisher genannten Atherosklerose-fördernden Wirkungen besitzt das oxLDL noch die Fähigkeit, die glatten Muskelzellen der Intima zur Proliferation anzuregen. Die dadurch entstehende Intimaverdickung (intimal thickening) begünstigt weiterhin die Plaqueentstehung und somit voranschreitende Atherosklerose.

Alle diese Prozesse zeigen die Schlüsselrolle des oxLDL bei der Pathogenese der Atherosklerose und erklären somit auch die Notwendigkeit der weiteren Aufklärung dieser Prozesse.

1.6 Zielsetzung und Motivation

Da die Koronare Herzerkrankung wie unter 1.1. bereits erwähnt eine der häufigsten Todesursachen darstellt, zeigt sich die Notwendigkeit der weiteren Forschung auf diesem Gebiet, um die Pathogenese der Atherosklerose vollständig zu verstehen und neue therapeutische Mittel zu entwickeln.

Es ist bereits bekannt, dass Thrombozyten für die Pathogenese der Atherosklerose von großer Bedeutung sind und diese bei Patienten mit ACS in aktivierter Form vorliegen und somit zu einem Verschluss der Gefäße beitragen [35]. Wie es bereits durch andere Studiengruppen belegt wurde, gibt es eine Erhöhung von Plasma-oxLDL bei Patienten mit ACS verglichen mit Patienten mit SAP [36] [37].

Ziel der vorliegenden Studie war es nun, die Bindung von oxLDL auf den zirkulierenden Thrombozyten nachzuweisen und zu zeigen, dass es eine Erhöhung bei ACS-Patienten im Vergleich zu Patienten mit SAP gibt. Ebenso war es unser Vorhaben die Korrelation mit den Thrombozyten-Aktivierungs-Faktoren (SDF-1, GPIIa/IIIb und P-selektin) zu untersuchen.

2 Material und Methoden

Es wurden Thrombozyten von insgesamt 356 Patienten auf ihre Oberflächenbindung von oxidiertem LDL (oxLDL), SDF-1 und GPIb (CD42b) untersucht. Darüber hinaus wurden zusätzlich die bereits bekannten Oberflächenexpressionen von P-Selektin (CD62p) und dem aktivierten Fibrinogenrezeptor (PAC-1) bestimmt. Die Proben wurden zu diesen Untersuchungen mit den dafür spezifischen monoklonalen Antikörpern gefärbt und anhand der Zweifarben-Durchfluss-Zytometrie nach bereits etablierten Methoden analysiert [38][39][40].

2.1 Patientenpopulation

In die Studie eingeschlossen wurden insgesamt 356 konsekutive Patienten, die sich mit einer Stabilen Angina pectoris (SAP) oder einem Akuten Koronarsyndrom (ACS) in der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikums Tübingen vorstellten und dort eine koronare Intervention im hiesigen Herzkatheter-Labor (HKL) erhielten. Eine solche koronare Intervention bestand aus einer Koronarangiographie und wenn medizinisch notwendig dem Einbringen eines Koronar-Stents.

Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten, welche zuvor ihr schriftliches Einverständnis für die Teilnahme an unserer Studie erteilten, erhielten zuvor in unserem Herzkatheterlabor der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikum Tübingen eine Koronarangiographie entsprechend der ACC/AHA-Richtlinien für Koronarangiographie. Das Patientengut bestand aus zwei Gruppen. Zum einen waren dies 182 Patienten mit Stabiler Angina pectoris (SAP), die für eine elektive Koronarangiographie einbestellt wurden, da sie eine zu erwartende oder eine bereits bekannte Koronare Herzerkrankung (KHK) hatten und somit als Kontrollgruppe dienten. Das andere Patientenkollektiv bestand aus 174 Patienten mit Akutem-Koronarsyndrom (ACS), die aufgrund plötzlich einsetzender Symptomatik (pectanginöse Beschwerden) bei Ruhe über die Notaufnahme in das Herzkatheterlabor

kamen. Diese Patienten erhielten unverzüglich eine Koronarangiographie. Desweiteren wurden diese Akutpatienten in 2 Subgruppen unterteilt:

55 Patienten mit ST-Streckenhebungsinfarkten (STEMI) sowie 118 Patienten mit Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkten (NSTEMI).

2.2 Methoden

2.2.1 Durchflusszytometrie

Bei dieser Methode, auch als FACS (fluorescene-activated-cell-sorter) bezeichnet, handelt es sich um ein immunologisches Verfahren zur Darstellung bestimmter Zellpopulationen entsprechend ihrer Zellgröße und Granularität.

Bei der Messung werden die Zellen in einem laminaren Strom einzeln an einem Laser vorbeigeführt, der dann von den enthaltenen Partikeln abgelenkt wird. Als Forwardscatter (FSC) oder Vorwärtsstreulicht bezeichnet man dabei diejenigen Strahlen, die nach vorne abgelenkt werden und dabei Aufschluss über die Größe der entsprechenden Zellen geben. Als Seitwärtsscatter (SSC), oder Seitwärtsstreulicht werden jene Strahlen bezeichnet, die in einem Winkel von 90º zur Seite hin abgelenkt werden. Diese lassen einen Rückschluss auf die Granularität der Zellen zu [41]. Werden die Zellen zuvor mit einem floureszierenden Farbstoff markiert, wie in unserem Studienmodel mit monoklonalen Antikörpern, absorbieren diese Zellenergie. Daher kommt es zur Emission von Fluoreszenzlicht in einer höheren Wellenlänge, welches ebenso wie das Streulicht mittels eines optischen Systems aus Linsen, Spiegeln und Filtern detektiert wird.

In der vorliegenden Studie kamen zwei Farbstoffe zum Einsatz: Flourescein-Isothiocyanat (FITC), mit einem Emissionsmaximum von 519 nm (gelb-grün) und einem Absorbtionsmaximum von 495 nm und Phycoerythrin (PE), mit einem Emissionsmaximun von 578 nm und einem zweigipfligen Absorbtionsmaximum im Bereich von 500 nm.

Um nur die gewünschte Emission der Thrombozyten zu registrieren und nicht die natürliche Emission anderer Zellen im menschlichen Vollblut, müssen

die Thrombozyten vor der Messung mit dem für sie spezifischem CD42b-PE angefärbt werden. Bei der ersten Messung kann man sich die natürliche Vorwärtsstreuung der Thrombozyten zu Nutze machen und trägt diese in einem sogenannten „Dot Plot“ gegen die Emission von CD42b-PE auf. In diesem Schritt legt man den Messbereich der Thrombozyten fest und kann somit mit der Registrierung der Emission durch die markierten FITC- und PE-Antikörpern fortfahren.

Die Messergebnisse der Floureszenzen werden in einem Histogramm-Plot dargestellt. Die Anzahl der gemessenen Ereignisse wird über die Stärke des Fluoreszenzsignals aufgetragen.

2.3 Probenauswertung

2.3.1 Probenvorbereitung zur Durchflusszytometrie

Das Patientenblut wurde über eine Schleuse, welche zuvor in die Arteria Femoralis gelegt wurde, entnommen und in eine große Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenenin-Monovette (CPDA) gefüllt.

Mit einer großen Pipette wurden 490 µl Phosphat-Puffer-Salz (PBS; Invitrogen Corporation, Paisley, Scotland, UK) in ein Eppendorf-Cup gegeben und mit 10 µl Vollblut aus dem CPDA-Röhrchen, welches zuvor nochmals vorsichtig geschüttelt wurde, um die Zellen nicht zu zerstören, in einem Verhältnis von 50:1 resuspendiert. Aus diesem verdünnten Vollblut wurden jeweils 35 µl in vier FACS-Röhrchen gegeben. Jedes dieser 35 µl wurde nun nochmals mit jeweils 5 µl PBS verdünnt und ebenfalls wieder gut und vorsichtig resuspendiert. Nun wurden, jedoch jeweils nur in ein FACS-Röhrchen, 5 µl des entsprechenden Antikörpers gegeben: Polyklonale Antikörper (Hase) für oxLDL (Rabbit polyclonal antibody, Chemicals Inc., an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany) sowie konjugierte monoklonale Antikörper für die Messung der Oberflächenexpression von P-Selektin (CD62P, Immunotec, Marseille, France; clone CLB-Thromb/6; FITC), des Fibrinogen-Aktivierungsrezeptors GPIIb/IIIa (PAC-1, Becton Dickinson, USA; clone SP-2) und des Thrombozytengebundenen SDF-1 (R&D Systems, Minneapolis, USA;

clone 79014; fluorescein isothiocynate-FITC). Um für die FACS-Messung die Thrombozyten zu markieren, damit diese von den anderen Zellen selektiert werden können, wurden in jedes der vier FACS-Röhrchen jeweils 5 µl cd42b PE (Immunotec, Marseille, France; clone SZ2; phycoerythrin-PE) für GPIb gegeben und nochmals resuspendiert. Nun wurden die FACS-Röhrchen mit Alufolie abgedeckt und in einem dunklen Raum bei Raumtemperatur 25 min inkubiert. Die Reaktionen wurden anschließend mit jeweils 300 µl 0,5% Para-formaldehyde (PFA) abgebrochen und fixiert. Die Proben wurden dann bei 4ºC für maximal 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt, um anschließend die Messung mittels Durchflusszytometer durchzuführen.

2.3.2 FACS-Messung

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte, wie oben beschrieben, mit einem FACS-Calibur Durchflusszytometer (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany) innerhalb von 24 Stunden nach der Zellfärbung. Das Durchflusszytometer enthält einen luftgekühlten Argonionenlaser, der monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm aussendet. Diese Wellenlänge eignet sich besonders gut, um die verwendeten Fluoreszenzfabstoffe FITC und PE zu detektieren.

Die Analyse der Daten erfolgte mittels CellQuest-Software (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany). Es wurden jeweils 10.000 Ereignisse ausgewertet und in einem logarithmischen Histogramm dargestellt. Die gemessene mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) stellt die spezifische Bindung der monoklonalen Antikörper dar und wurde zur quantitativen Bestimmung der Proteinexpression auf der Thrombozytenoberfläche verwendet.

2.4 Datendarstellung und statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen wurden mit den Computerprogrammen Microsoft Excel XP (Mircrosoft, Redmond, USA) und SPSS Version 13.0 für Windows (Chicago, Illinois, USA) durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwert ± mittlere Standardabweichung (SD) dargestellt.

Zufallsvariablen wurden anhand des Kolmogorow-Smirnov-Tests auf ihre Normalverteilung untersucht.

Der Mann-Whitney-U-Test, ein parameterfreier, statistischer Test, diente der Beurteilung signifikanter Unterschiede zweier Gruppen, während der Kruskal-Wallis-Test, ebenfalls parameterfrei, für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen untereinander angewendet wurde.

Nominalskalierte Variablen wurden anhand des Chi-Quadrat-Tests verglichen und Korrelationen anhand des Pearson Korrelationskoeffizienten bewertet.

Univariate Varianzanalysen (analysis of variance, ANOVA) wurden verwendet, um die Auswirkung verschiedener Faktoren auf die thrombozytäre oxLDL-Bindung zu beurteilen.

Bei allen verwendeten Tests handelt es sich um eine zweiseitige Testung. Alle P-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Bindung von oxLDL auf zirkulierenden Thrombozyten

In einer konsekutiven Kohorte von insgesamt 356 Patienten mit symptomatischer Koronarer Herzerkrankung (KHK) wurde die Bindung von oxidiertem-LDL auf der Oberfläche zirkulierender Thrombozyten im Vollblut dieser Patienten gemessen. Das Patientenkollektiv setzte sich aus zwei Gruppen zusammen: Zum einen Patienten, die sich mit einem Akuten Koronarsyndrom (ACS; n=174) und zum anderen diejenigen, die sich mit einer stabilen Angina pectoris (SAP; n=182), in der Universitätsklinik Tübingen vorstellten. Bei allen Patienten wurde die Diagnose mittels Koronarangiographie gestellt und das Ausmaß der Erkrankung, das heißt, wie viele der Gefäße (ein-, zwei- oder drei-Gefäß-KHK) betroffen sind ermittelt.

Desweiteren wurden von jedem in diese Studie eingeschlossenen Patienten nicht nur Alter, Geschlecht und aktuelle Medikation, sondern ebenso kardiovaskuläre Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Hyperlipoproteinämie, Diabetes mellitus, positive Familienanamnese und Nikotinabusus erfasst. Diese demographischen Daten des Studienkollektives sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Patientendaten

Faktor	Gesamt (n= 356)	SAP (n= 182)	ACS (n= 174)
Alter-Jahre (mean±SD)	68,1±11,6	67,7±10,3	68,5±12,7
Davon Weiblich, n (%)	103 (28,9)	61 (33,7)	42 (24,5)
Riskofaktoren			
Arterielle Hypertonie	296 (83,1)	154 (84,6)	142 (81,6)
Hyperlipidämie	252 (70,8)	143 (78,6)	109 (62,6)
Diabetes mellitus	118 (33,1)	72 (39,6)	46 (26,4)
Familiäre Belastung	81 (22,8)	52 (28,6)	29 (16,7)
Nikotinabusus	151 (42,4)	74 (40,7)	77 (44,3)
KHK – n (%)			
1 Gefäß	68 (19,1)	32 (17,6)	36 (20,7)
2 Gefäße	119 (33,4)	66 (36,3)	53 (36,2)
3 Gefäße	167 (46,9)	84 (46,2)	83 (47,7)
Links Ventrikuläre Ejektions Fraktion (LVEF) – n (%)			
Normal (>55%)	189 (53,1)	102 (56,0)	87 (50,0)
Reduziert (45-55%)	72 (20,2)	37 (20,3)	35 (20,1)
Mittelgradig (35-45%)	62 (17,4)	28 (15,4)	34 (19,5)
Niedrig (<35%)	31 (8,7)	15 (8,2)	16 (9,2)
Medikation – n (%)			
ACE-Inhibitoren	194 (54,5)	112 (61,5)	82 (47,1)
AT1-Rezeptor Blocker	64 (18,0)	37 (20,3)	27 (15,5)
Beta-Blocker	245 (68,8)	141 (77,5)	104 (59,8)
Statine	210 (59,0)	133 (73,1)	77 (44,3)
Aspirin	247 (69,4)	147 (80,8)	100 (57,5)
Clopidogrel	114 (32,0)	34 (37,4)	46 (26,4)
Vitamin K Antagonisten	29 (8,1)	16 (8,8)	13 (7,5)

3.2 Thrombozyten-gebundenes oxLDL bei Akutem Koronarsyndrom

In diesen durchgeführten Messungen fanden wir heraus, dass sich das oxidierte-LDL, welches auf der Oberfläche der Thrombozyten gebunden ist zwischen den beiden Subgruppen (ACS vs. SAP) unterscheidet. Bei Patienten mit Akutem Koronarsyndrom (ACS) zeigte sich eine deutliche und signifikante Erhöhung von oxidiertem-LDL auf den gemessenen Thrombozyten gegenüber den Patienten mit einer stabilen Angina pectoris (SAP).

ACS vs. SAP: (MFI) ± (SD): 124,76 ± 42,11 vs.111,75 ± 41,91; p= 0,004

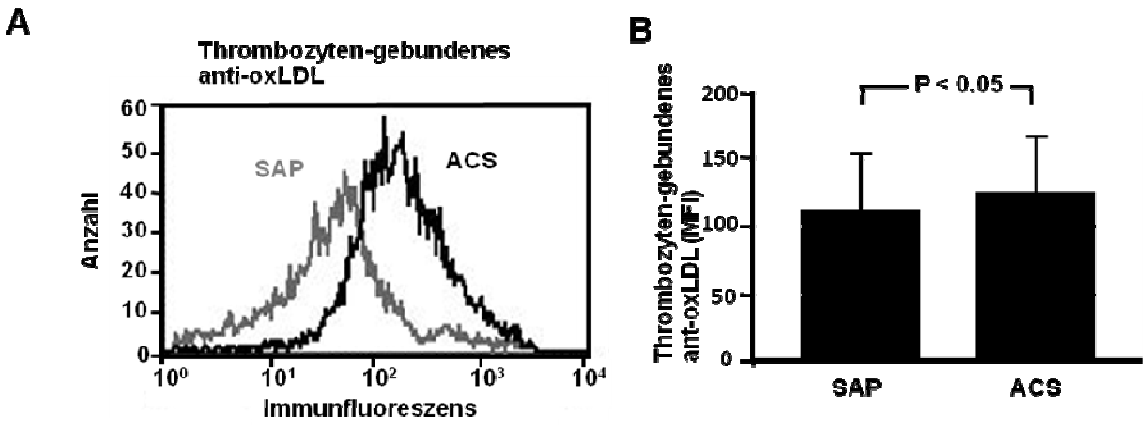

Abbildung 4: Thrombozytengebundenes oxLDL bei Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP) und Akutem Koronarsyndrom (ACS)
(A) Repräsentatives Immunofluoreszenz-Histogramm; es zeigt die oxLDL-Bindung eines Patienten mit SAP (grau) und ACS (schwarz).
(B) Bindung von oxLDL auf Thrombozyten bei Patienten mit SAP verglichen mit Patienten mit ACS.

3.3 Thrombozyten-gebundenes oxLDL bei den Untergruppen des Akuten Koronarsyndroms

Unterteilt man das Akute Koronarsyndrom (ACS) weiter in Patientengruppen mit ST-Strecken-Hebungsinfarkt (STEMI) sowie Nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkt (NSTEMI), so zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Subgruppen.

NSTEMI vs. STEMI: (MFI) ± (SD): 125,45 ± 123,10 vs. 43,26 ± 40,74; $p > 0,05$

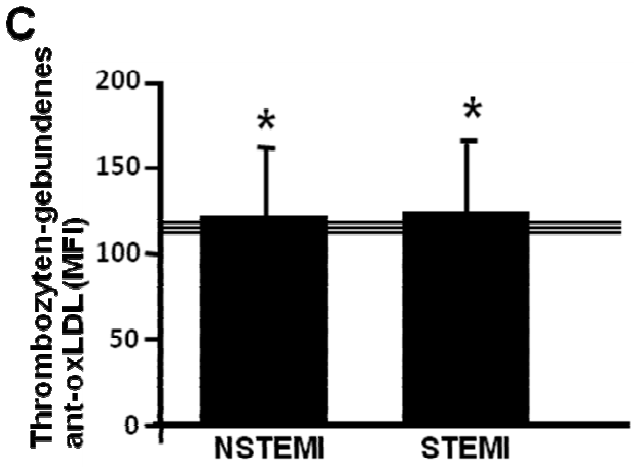

Abbildung 4C: Thrombozyten-gebundenes oxidiertes LDL der Subgruppen des Akuten Koronarsyndroms
Verglichen werden hier die Untergruppen des Akuten Koronarsyndroms: Patienten mit einem ST-Strecken-Hebungsinfarkt (STEMI) im Vergleich zu Patienten mit einem Non-ST-Strecken-Hebungsinfarkt (NSTEMI).
Die Dreifachlinie stellt die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI = 111,75) von Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP) dar.

3.4 Thrombozyten-gebundenes oxLDL und bekannte Thrombozytenaktivierungsmarker

Es wurde bereits in früheren Studien gezeigt, dass thrombozytäres P-Selektin (cd62p), GPVI und der Fibrinogenrezeptor GP IIb/ IIIa (PAC-1) bei Patienten mit Akutem Koronarsyndrom vermehrt exprimiert werden [42][40] [43].

Bei der vorliegenden Studie konnte herausgearbeitet werden, dass das Thrombozyten-gebundene oxLDL bei Patienten mit Koronarer Herzerkrankung mit der vermehrten Expression des thrombozytären-P-Selektin, -SDF-1 und dem aktivierten Fibrinogenrezeptor GP IIb/ IIIa positiv korreliert.

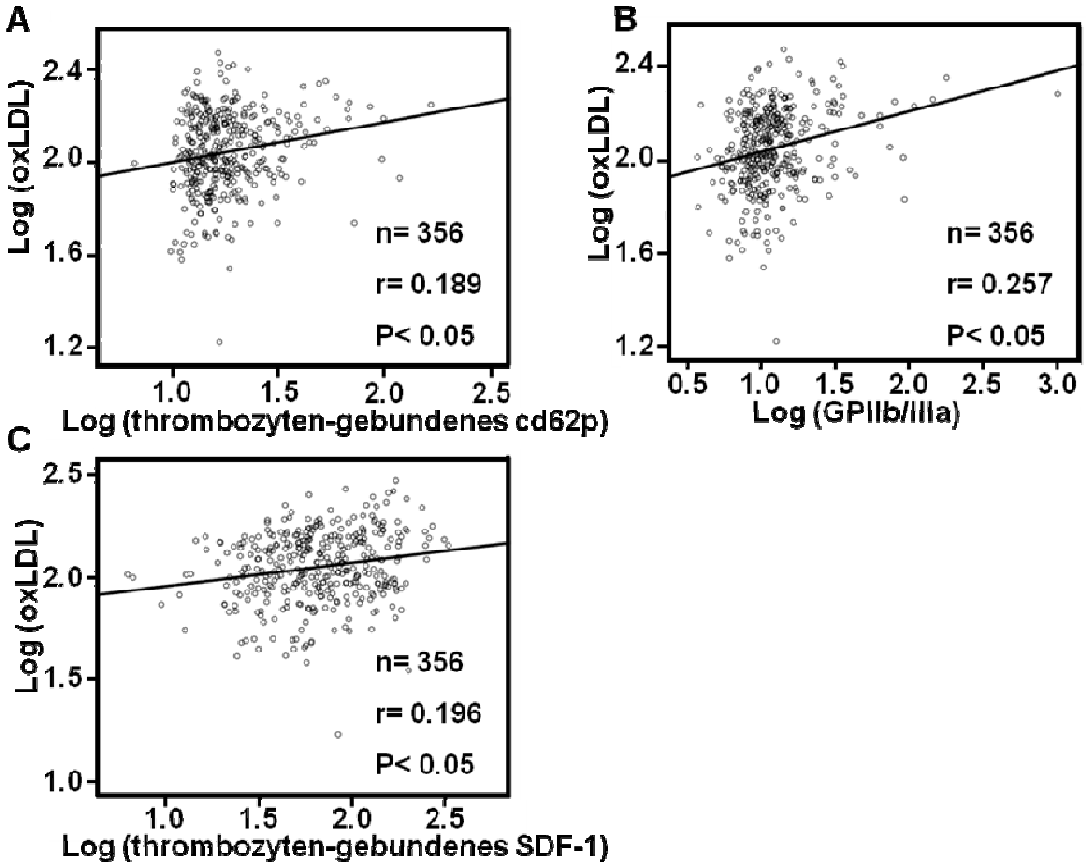

Abbildung 5: Korrelation zwischen Thrombozyten-gebundenenem oxLDL den Thrombozytenaktivierungsmakern
Positive Korrelation zwischen thrombozyten-gebundenem oxidierten LDL mit dem Thrombozyten-gebundenen P-Selektin (A), dem aktivierten Fibrinogen-rezeptor GP IIb/ IIIa (B) und dem Thrombozyten-gebundenen SDF-1 (C).

3.5 Thrombozyten-gebundenes oxLDL und Thrombozytenzahl

Vergleicht man das Thrombozyten-gebundene oxidierte LDL mit den im Routinelabor gemessenen Thrombozytenzahlen, erhält man eine negative Korrelation.

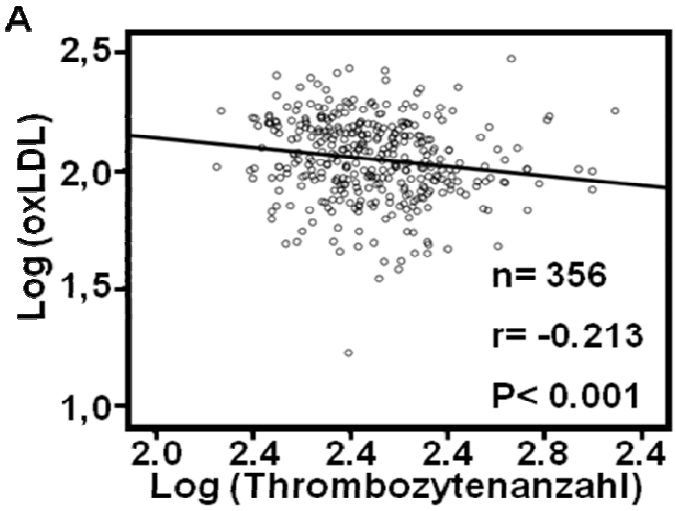

Abbildung 6: Negativkorrelation zwischen Thrombozyten-gebundenem oxLDL und der Thrombozytenzahl

Es lässt sich keine Korrelation zwischen dem thrombozytengebundenen oxLDL und den spezifischen Herzenzymen Troponin I und CK-MB darstellen. Ebenso korreliert das thrombozytengebundene oxLDL nicht mit den kardiovaskulären Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie, Nikotinabusus, positiver Familienanamnese, Hyperlipoproteinämie oder Diabetes mellitus. Ebenso korreliert das thrombozytengebundene oxLDL nicht mit dem Ausmaß der Erkrankung (1-, 2- oder 3-Gefäß-Erkrankung), dem Geschlecht der Patienten oder der Medikation, die diese bis zur Aufnahme eingenommen hatten. Es zeigte sich jedoch ein Zusammenhang zwischen den im Blutplasma gemessenen Gesamtholesterin- ($p= 0,008$), LDL- ($p= 0,028$), sowie HDL- ($p= 0,032$) Werten und dem thrombozytengebundenem oxLDL (Tabelle 2).

Tabelle 2. Univariate Varianzanalyse von thrombozytengebundenem oxLDL und möglichen Kofaktoren beim Akuten Koronarsyndrom

	Faktor	***P-Wert***
Medikation	ACE-Hemmer	0,613
	AT1-Rezeptor Blocker	0,883
	Beta-Blocker	0,580
	Statine	0,782
	Aspirin	0,305
	Clopidogrel	0,792
	Vitamin K-Antagonisten	0,426
Kardiovaskuläre Risikofaktoren	Arterielle Hypertonie	0,880
	Hyperlipoproteinämie	0,990
	Diabetes Mellitus	0,748
	Positive Familienanamnese	0,755
	Nikotinabusus	0,291
Laborwerte	Creatinkinase (CK)	0,944
	Troponin I	0,334
	C-reaktives Protein	0,785
	Cholesterin	0,008
	Low-density-lipoprotein	0,028
	High-density-lipoprotein	0,032
	Triglyzeride	0,14
Andere Faktoren	LVEF (%)	0,420
	Alter	0,217
	Geschlecht	0,733
Guppen	ACS vs. SAP	0,004

4 Diskussion

In den letzten Jahren wurde dem oxLDL, welches für die Pathogenese der Atherosklerose mitverantwortlich zu sein scheint, viel Aufmerksamkeit gewidmet. Man hat in *in-vitro* Versuchen einiges über die Interaktion zwischen oxLDL und Thrombozyten und der daraus resultierenden atherogenen Wirkung der Thrombozytenaktivierung, sowie deren Adhäsion am Endothel herausgefunden [14][34]. Die bisher durchgeführten *in-vivo* Studien widmeten sich hauptsächlich der oxLDL-Konzentration im Plasma. Man hat dabei herausgefunden, dass oxLDL bei Patienten mit KHK eine hohe Plasmakonzentration aufweist. Auch war das Plasma-oxLDL signifikant erhöht bei Patienten mit Akutem Koronarsyndrom (ACS) verglichen mit Patienten mit Stabiler Angina Pectoris (SAP) [44][37].

In der hier vorgelegten Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass die Bindung von oxLDL auf den zirkulierenden Thrombozyten stattfindet, welche dadurch aktiviert werden. Diese Bindung erfolgt über so genannte Scavanger-Rezeptoren und ist irreversibel, das heißt, es gibt für die Bindung keine Feedback-Regulation. Die oxLDL beladenen und somit nun aktivierten Thrombozyten adhärieren entweder an atherosklerotisch geschädigtem Endothel, was die Atherosklerose weiter vorantreibt, oder aber an intaktem Endothel was dieses schädit und die Endothelzellen aktiviert.

Letztendlich scheint es so, dass oxLDL mitverantwortlich ist für die Thrombozytenaktivierung, die dadurch in der Lage sind das oxLDL auf ihrer Oberfläche zu binden, wie es durch die positive Korrelation mit den Thrombozyten-Aktivierungsmarkern gezeigt werden konnte.

4.1 Thrombozyten-gebundenes oxLDL beim ACS

Es ist aus unseren Ergebnissen ersichtlich, dass das thrombozyten-gebundene oxLDL vor allem mit dem klinischen Bild einer Koronaren Herzerkrankung (SAP vs. ACS) korreliert.

Dies läßt sich an den unterschiedlichen Plasmakonzentrationen von thrombozyten-gebundenem oxLDL bei Patienten mit Akutem Koronarsyndrom (ACS) und denjenigen mit einer Stabilen Angina Pectoris (SAP) darstellen.

Hier zeigt sich, dass thrombozyten-gebundenes oxLDL bei Patienten mit Akutem Koronarsyndrom (ACS) im Vergleich zu Patienten mit Stabiler Angina Pectoris (SAP) signifikant erhöht ist.

Wie es in *in-vitro* Versuchen gezeigt wurde, sind verschiedene Zellen in der Lage die Oxidation von Plasma-LDL zu fördern [45] [46]. Zu diesen Zellen gehören Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, glatte Muskelzellen und die Endothelzellen selbst. Diese Oxidation findet dabei höchstwahrscheinlich nicht im Plasma statt, obwohl dieses reich an antioxidativen Substanzen ist, sondern in der geschädigten Gefäßwand selbst. Wie unter „1.2.2. Schädigung der Endothelschicht“ bereits beschrieben enthält diese eine Vielzahl an redox-aktiven Metallen, welche die Oxidation von Plasma-LDL fördern [47]. Darüber hinaus sind jedoch auch die Thrombozyten selbst in der Lage durch eine Lipidperoxidation aus Plasma-LDL die oxidierte Form (oxLDL) herzustellen, da sowohl ruhende als auch aktivierte Thrombozyten sogenannte ROS produzieren können [48][49].

4.2 Bindung von oxLDL auf den zirkulierenden Thrombozyten

Die Bindung von oxLDL auf den zirkulierenden Thrombozyten wird über spezifische Scavenger-Rezeptoren, wie etwa CD36 und LOX-, vermittelt. Während CD36 der Hauptrezeptor für oxLDL auf den ruhenden Thrombozyten darstellt, ist LOX-1 für die Bindung bei den aktivierten Thrombozyten zuständig [50]. Dass vor allem CD36 als Rezeptor bei der Bindung von oxLDL eine entscheidende Rolle spielt, zeigen die Versuche von Diaz-Ricart et al. Sie zeigten, dass funktionsfähiges CD36 die rasche Adhäsion der Thrombozyten an dem in der Gefäßwand befindlichen Kollagen fördert [51]. Diaz-Ricart et al. konnten dies in *in-vitro* Flusskammerversuchen zeigen, indem sie CD36-Auto-antikörper (GPIV) einsetzte, um die Blockierung des CD36-Rezeptors zu

bewirken. Somit kam es nicht zu einer endothelialen Thrombozytenadhäsion unter Flussbedingungen [52].

4.3 Negative Korrelation von oxLDL mit zirkulierenden Thrombozyten

Wie bereits in den Ergebnissen dargelegt (3.5.; Abb. 5) besteht zwischen dem thrombozyten-gebundenen oxLDL und der im Blut gemessenen Gesamt-Thrombozytenanzahl eine negative Korrelation.

Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass das LDL bei Endothelläsionen aus dem Plasma in die Intima der Gefäßwand gelangt und dort durch spezifische Enzyme, wie der Myeloperoxidase oder der Lipoxygenase 12/15 zum reaktionsfreudigen oxLDL oxidiert wird. Das so entstandene oxLDL aktiviert seinerseits nun die im Blut zirkulierenden Thrombozyten, die dann ebenfalls aus dem Blut in die Gefäßwand einwandern, wo es zu einer Adhäsion der Thrombozyten an die Endothelzellen der verletzten Intima-Gefäßschicht kommt. Durch diese Adhäsion sind die noch vor der Aktivierung durch oxLDL zirkulierenden Thrombozyten aus dem Blut gelangt.

Diese Thrombozyten zirkulieren nun also nicht mehr im Blut und können daher bei der Blutanalyse nicht mehr erfasst werden, so lässt sich die negative Korrelation zwischen den zirkulierenden Thrombozyten und dem thrombozyten-gebundenem oxLDL erklären.

Die nun mit oxLDL beladenen Thrombozyten könnten durch gewebsspezifische Makrophagen aufgenommen werden, welche in die Intimaschicht der Gefäßwand transportiert und dort in Schaumzellen umgewandelt werden. Die dann zugrunde gehenden Schaumzellen hinterlassen ihren lipidhaltigen Inhalt, welche mikroskopisch als sogenannte „fatty streaks“ nachweisbar sind.

4.4 Negative Korrelation von oxLDL und Plasma-LDL

Ebenso zeigte sich in unseren Ergebnissen eine Negativkorrelation zwischen dem oxLDL und dem im Blutplasma enthaltenen und gemessenen Plasma-LDL. Dies bedeutet, dass je höher das gemessene oxLDL ist, desto geringer war der Wert des Plasma-LDL. Mögliche Ursachen könnten sein, dass das Plasma-LDL aus dem Blut oxidiert wird und dadurch bei den Blutplasma-Messungen nicht mehr erfasst werden kann, da diese nur das „native-LDL“ messen.

4.5 Thrombozyten-gebundenes oxLDL und bekannte Thrombozytenaktivierungsmarker

Für die Pathogenese der Atherosklerose und das klinische Outcome von Patienten mit Akutem Koronarsyndrom (ACS) spielt die Plaqueruptur eine entscheidende Rolle. Aufgrund dieser kommt es zu einer thrombozyten-gesteuerten Thrombusbildung, die ihrerseits wieder abhängig ist von der Aktivierung der Thrombozyten. Diese Kaskade zeigt, wie wichtig es ist, die Aktivierung der Thrombozyten *in-vivo* bestimmen zu können. P-Selektin gilt hierbei als Goldstandard-Marker auf der Thrombozytenoberfläche zur Beurteilung dieser Aktivierung. Es ist bekannt, dass oxLDL die Fähigkeit besitzt die Thrombozyten zur Freisetzung sogenannter α-Granula zu stimulieren, woraufhin die Oberflächenexpression von P-Selektin erhöht wird [53] [54].

Dies zeigt zunächst den Zusammenhang zwischen vermehrtem oxLDL und der erhöhten Expression von P-Selektin auf aktivierten Thrombozyten. Daneben zählt auch der Glykoprotein IIb/IIIa-Antikörper (PAC-1) zu den Markern, die zur Messung des Aktivierungsgrades von Thrombozyten verwendet werden. Da der sich sonst im Cytosol befindliche Stromal-Cell-Derived-Faktor (SDF-1) durch die Endothelaktivierung auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten exprimiert wird, zählt auch dieser zu den Aktivierungsmarkern der Thrombozyten. SDF-1 wirkt seinerseits als Chemoattrakant auf Monozyten, Lymphozyten, sowie Progenitorzellen ($CD34^+$-Zellen) und bewirken dadurch deren Einwandern in die atherosklerotisch

veränderte Läsion [55].

In der vorliegenden Studie konnte eine positive Korrelation zwischen dem thrombozyten-gebundenen oxLDL und den Thrombozytenaktivierungs-markern gezeigt werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass das oxLDL die Thrombozyten aktiviert und/oder mehr oxLDL auf der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten gebunden werden kann.

4.6 Die Wirkung von oxLDL bei der Pathogenese der Atherosklerose

Wie bereits beschrieben, trägt das oxLDL über unterschiedliche Mechanismen zur Entstehung der Atherosklerose bei. Zum einen führt es, wie oben beschrieben, zu einer Thrombozytenaktivierung und somit zu deren Adhäsion an die Endothelschicht. Zum anderen ist es in der Lage durch Inhibition oder Aktivierung verschiedener Stoffe bei der Regulation der Gefäßweite mitzuwirken.

Experimentelle Versuche haben gezeigt, dass oxLDL über eine Hemmung der Plasmamembran-gebundenen Kalzium-ATPase die Erhöhung von zytoplasmatischem Kalzium zur Folge hat. Dieses Kalzium erhöht die Sensitivität der Thrombozyten gegenüber physiologischer, körpereigener Stimulanzien [56] [57] [58].

Eine weitere atherogene Wirkung des oxLDL´s stellt das erhöhte Ansprechen der Thrombozyten auf Thrombin dar. Thrombin ist ein körpereigener Stoff, der bei Wirbeltieren von großer Bedeutung für die Blutgerinnung ist. Thrombin entsteht erst am Ort der Gefäßverletzung und ist daher nur in geringen Mengen im Blutplasma nachweisbar. Seine Vorstufe stellt das Prothrombin (Faktor II) dar, welches in der Leber gebildet und kontinuierlich ins Blutplasma abgegeben wird und daher auch dort nachweisbar ist. OxLDL erhöht auch in diesem Prozess das Ansprechen der Thrombozyten auf Thrombin. Dies führt ebenso zu einer Thrombozytenaktivierung und einer daraus resultierenden Endotheladhäsion [53].

Thrombozyten enthalten Serotonin, ein Gewebshormon, das unter an-

derem für die Regulation der Gefäßweite zuständig ist. Einerseits wirkt es auf Lungen- und Nierengefäße sowie auf kleine Gefäße vasokonstriktorisch (gefäßverengend), andererseits aber auf die Gefäße der Skelettmuskulatur vasodilatatorisch (gefäßverengend). OxLDL fördert die Serotonin-Freisetzung aus den Thrombozyten und führt somit zu einer Vasokonstriktion, welches nach der Virchow´schen Trias ein thrombotisches Ereignis weiter vorantreibt [59].

OxLDL führt darüber hinaus über die Inhibition des Stickstoffmonoxids (NO), einem der stärksten Vasodilatatoren, zur Vasokonstriktion [60]. Das NO ist ein Gefäßdilatator, das heißt, es stellt die Gefäße weit und erhöht somit den Blutfluss. Durch die Inhibition wird das Gefäß verengt (Gefäßkonstriktion) und der Blutfluss wird verlangsamt oder es kommt ganz zu Stase. Dieses Phänomen trägt nach der Virchow´schen Trias (Gefäßwandverletzung, Stase, Erhöhung der Blutviskosität) zur thrombotischen Bildung bei.

Neben der Hemmung der NO-Synthese erhöht das oxLDL zeitgleich die Prostaglandin-12-Produktion (PG-12) und es stimuliert das Endothel zur Freisetzung spezifischer Gewebsfaktoren die wiederum eine prothrombotische Wirkung besitzen [60]. Das thrombozyten-gebundene oxLDL begünstigt somit die thrombotischen Prozesse, da es die prothrombotische Wirkung des Endothels, sowie die Reaktionsfähigkeit der Thrombozyten unterstützt.

Wie bereits andere Arbeitsgruppen [61] in *in-vitro*-Versuchen gezeigt haben ist oxidiertes LDL für die Thrombozytenaktivierung mitverantwortlich, indem es die Oberfächenexpression unter anderem von P-Selektin, einem Thrombozytenaktivierungsmaker erhöht. Dadurch kommt es, wie auch in unseren Ergebnissen ersichtlich zu einer Erhöhung des P-Selektins und dadurch zu einer vermehrten Aktivierung der Thrombozyten.

Ebenso zeigte Daub et al. [62], dass thrombozyten-gebundenes oxLDL zur Aktivierung des Endothels sowie zur Schaumzellbildung durch Phagozytose der oxLDL beladen Thrombozyten führt, was zur Entstehung der Atherosklerose entscheidend beiträgt.

5 Zusammenfassung

In der hier vorgelegten Studie wurde ein Patientenkollektiv von 356 Patienten mit symptomatischer Koronarer Herzerkrankung auf die Bindung von oxLDL auf zirkulierenden Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie untersucht.

- Es konnte in den Ergebnissen gezeigt werden, dass bei Patienten, die an einem Akuten Koronarsyndrom (ACS) leiden, im Vergleich zu Patienten, bei denen eine Stabile Angina Pectoris (SAP) diagnostiziert wurde, das thrombozyten-gebundene oxLDL signifikant erhöht ist.

- Zu den bisher bekannten Thrombozytenaktivierungsmarkern P-Selektin, GP IIb/IIIa und dem thrombozyten-gebundenen SDF-1 konnte in unseren Ergebnissen eine positive Korrelation mit thrombozyten-gebundenem oxLDL dargelegt werden.

- Es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen oxLDL und der Gesamtcholesterinkonzentration sowie der LDL-Konzentration im Blut.

Auch wenn die genaue klinische Bedeutung von oxLDL in Bezug auf das Akute Koronarsyndrom noch nicht vollständig geklärt ist, kann man aufgrund der bisherigen Ergebnisse annehmen, dass thrombozyten-gebundenes oxLDL eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose spielt.

Das weitere Verständnis von Thrombozyten und dem thrombozyten-gebundenem oxLDL könnte bei der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien des Akuten Koronarsyndroms helfen, z.B. über eine Inhibition der oxLDL-Bindung auf den Thrombozyten.

6 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt Deutschland , available from: http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content100/EckdatenTU,templateId=renderPrint.psml

2. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Hypertension. 2003 Dec;42(6):1206-52. Epub 2003 Dec 1.

3. Didilescu AC, Hanganu SC, Galie N, Greabu M, Totan A, Stratul SI, Puiu L. The role of smoking in changing essential parameters in body homeostasis. Pneumologia 2009; 58(2):89-94.

4. Puranik R, Celermajer DS. Smoking and endothelial function. Prog Cardiovasc. Dis 2003; 45(6):443-58.

5. Savic ZN, Brajovic MD, Popovic SS, Canovic F. Correlation of metabolic parameters and changes in the intima-media complex in non-diabetic obesity and patients with various disorders of glucose regulation. Acta Chir Iugosl 2008; 55(4):49-52.

6. Chikani G, Zhu W, Smart EJ. Lipids: potential regulators of nitric oxide generation. Am J Physiol Endocrinol Metab 2004; 287(3):E386-9.

7. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation 2004; 109(23 Suppl 1):III27-32.

8. Takahashi Y, Zhu H, Yoshimoto T. Essential roles of lipoxygenases in LDL oxidation and development of atherosclerosis. Antioxid Redox Signal 2005; 7(3-4):425-31.

9. Brune B, Zhou J, von Knethen A. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis. Kidney Int Suppl 2003(84):S22-4.

10. Heinecke JW. Pathways for oxidation of low density lipoprotein by myeloperoxidase: tyrosyl radical, reactive aldehydes, hypochlorous acid and molecular chlorine. Biofactors 1997; 6(2):145-55.

11. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. J Clin Invest 1994; 94(1):437-44.

12. Shashkin P, Dragulev B, Ley K. Macrophage differentiation to foam cells. Curr Pharm Des 2005; 11(23):3061-72.

13. Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. FASEB J 2001; 15(12):2073-84.

14. Akkerman JW. From low-density lipoprotein to platelet activation. Int J Biochem Cell Biol 2008; 40(11):2374-8.

15. Dorr R. Chronic stable angina pectoris. A comparison of diagnostic pathways. Herz 2006; 31(9):827-35.

16. Fox K, Garcia MA, Ardissino D, Buszman P, Camici PG, Crea F, Daly C, Backer G, Hjemdahl P, Lopez-Sendon J, Marco J, Morais J, Pepper J, Sechtem U, Simoons M, Thygsen K; European Society of Cardiology. Guidelines on the management of stable angina pectoris; the experts of the European Society of Cardiology on the management of stable angina pectoris]. Kardiol Pol 2006; 64(8):823-80.

17. Theroux P, Fuster V. Acute coronary syndromes: unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. Circulation 1998; 97(12):1195- 206.

18. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined-a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 2000; 36(3):959-69.

19. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. Circulation 1995; 92(3):657-71.

20. Hamm CW. Guidelines: Acute coronary syndrome (ACS). II: Acute coronary syndrome with ST-elevation. Z Kardiol 2004; 93(4):324-41.

21. Bertrand ME, Simoons ML, Fox KA, Wallentin LC, Hamm CW, McFadden E, De Feyter PJ, Specchia G, Ruzyllo W; Task Force on the Management of Acute Coronary Syndromes of the European Society of Cardiology. Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. Eur Heart J 2002; 23(23):1809-40.

22. Langer H, Gawaz M. The role of platelets for the pathophysiology of acute coronary syndromes. Hamostaseologie 2006; 26(2):114-8.

23. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). N Engl J Med 1992; 326(5):310-8.

24. Gawaz, M., ed. Das Blutplättchen. 1999, Georg Thieme Verlag: Stuttgart

25. Bigalke B, Stellos K, Stakos D, et al. Influence of platelet count on the expression of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) in patients with acute coronary syndrome. Thromb Haemost 2009; 101(5):911-5.

26. Bigalke B, Stellos K, Weig HJ, Geisler T, Seizer P, Kremmer E, Pötz O, Joos T, May AE, Lindemann S, Gawaz M. Regulation of platelet glycoprotein VI (GPVI) surface expression and of soluble GPVI in patients with atrial fibrillation (AF) and acute coronary syndrome (ACS). Basic Res Cardiol 2009; 104(3):352- 7.

27. Stellos K, Gawaz M. Platelet interaction with progenitor cells: potential implications for regenerative medicine. Thromb Haemost 2007; 98(5):922-9.

28. Stellos K, Langer H, Daub K, Schoenberger T, Gauss A, Geisler T, Bigalke B, Mueller I, Schumm M, Schaefer I, Seizer P, Kraemer BF, Siegel-Axel D, May AE, Lindemann S, Gawaz M. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. Circulation 2008; 117(2):206-15.

29. Stellos K, Bigalke B, Langer H, Geisler T, Schad A, Kögel A, Pfaff F, Stakos D, Seizer P, Müller I, Htun P, Lindemann S, Gawaz M. Expression of stromal-cell-derived factor-1 on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndrome and correlates with the number of CD34+ progenitor cells. Eur Heart J 2009; 30(5):584-93.

30. Bjorkhem I, Meaney S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24(5):806-15.

31. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 1986; 232(4746):34-47.

32. Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. Pharmacol Ther 2006; 111(1):16- 26.

33. Wong ND, Gransar H, Narula J, Shaw L, Moon JH, Miranda-Peats R, Rozanski A, Hayes SW, Thomson LE, Friedman JD, Berman DS. Myeloperoxidase, subclinical atherosclerosis, and cardiovascular disease events. JACC Cardiovasc Imaging 2009; 2(9):1093-9.

34. Relou IA, Hackeng CM, Akkerman JW, Malle E. Low-density lipoprotein and its effect on human blood platelets. Cell Mol Life Sci 2003; 60(5):961-71.

35. Cavender MA, Rao SV. Bleeding associated with current therapies for acute coronary syndrome: What are the mechanisms? J Thromb Thrombolysis 2010.

36. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Matsuo T, Ogami M, Ikura Y, Itabe H, Komatsu R, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J. Pathophysiological role of oxidized low-density lipoprotein in plaque instability in coronary artery diseases. J Diabetes Complications 2002; 16(1):60-4.

37. Holvoet P. Oxidized LDL and coronary heart disease. Acta Cardiol 2004; 59(5):479-84.

38. Gawaz M, Neumann FJ, Schomig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy. Circulation 1999; 99(1):E1-11.

39. Fateh-Moghadam S, Bocksch W, Ruf A, Dickfeld T, Schartl M, Pogátsa-Murray G, Hetzer R, Fleck E, Gawaz M. Changes in surface expression of platelet membrane glycoproteins and progression of heart transplant vasculopathy. Circulation 2000; 102(8):890-7.

40. Bigalke B, Lindemann S, Ehlers R, Seizer P, Daub K, Langer H, Schonberger T, Kremmer E, Siegel-Axel D, May AE, Gawaz M. Expression of platelet collagen receptor glycoprotein VI is associated with acute coronary syndrome. Eur Heart J, 2006. 27(18): p. 2165-9.

41. Lütttmann, W., ed. Der Experimentator Immunologie. Durchflusszytometrie, ed. W. Lüttmann. Vol. 2. 2006, Spektrum Akademischer Verlag: München. 77 - 103.

42. Gawaz, M., F.J. Neumann, and A. Schomig, Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy. Circulation, 1999. 99(1): p. E1-E11.

43. Curtis JP, Sokol SI, Wang Y, Rathore SS, Ko DT, Jadbabaie F, Portnay EL, Marshalko SJ, Radford MJ, Krumholz HM. The association of left ventricular ejection fraction, mortality, and cause of death in stable outpatients with heart failure. J Am Coll Cardiol, 2003. 42(4): p. 736-42.

44. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Matsuo T, Ogami M, Ikura Y, Itabe H, Komatsu R, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J. Pathophysiological role of oxidized low-density lipoprotein in plaque instability in coronary artery diseases. J Diabetes Complications 2002; 16(1):60-4.

45. Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, Valeri CR.*In-vivo* tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-Selektin but continue to circulate and function. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 15;93(21):11877-82.

46. Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. Cell. 1989 Oct 20;59(2):305-12.

47. Holvoet P, Collen D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. FASEB J 1994; 8(15):1279-84.

48. Fogelman AM, Shechter I, Seager J, Hokom M, Child JS, Edwards PA. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to c holesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A 1980; 77(4):2214-8.

49. Marcus AJ, Silk ST, Safier LB, Ullman HL. Superoxide production and reducing activity in human platelets. J Clin Invest 1977; 59(1):149-58.

50. Chen M, Kakutani M, Naruko T, Ueda M, Narumiya S, Masaki T, Sawamura T. Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets. Biochem Biophys Res Commun 2001; 282(1):153-8.

51. Diaz-Ricart M, Tandon NN, Carretero M, Ordinas A, Bastida E, Jamieson GA. Platelets lacking functional CD36 (glycoprotein IV) show reduced adhesion to collagen in flowing whole blood. Blood 1993; 82(2):491-6.

52. Diaz-Ricart M, Tandon NN, Gómez-Ortiz G, Carretero M, Escolar G, Ordinas A, Jamieson GA. Antibodies to CD36 (GPIV) inhibit platelet adhesion to subendothelial surfaces under flow conditions. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16(7):883-8.

53. Chen R, Chen X, Salomon RG, McIntyre TM. Platelet activation by low concentrations of intact oxidized LDL particles involves the PAF receptor. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009; 29(3):363-71.

54. Siegel-Axel D, Daub K, Seizer P, Lindemann S, Gawaz M. Platelet lipoprotein interplay: trigger of foam cell formation and driver of atherosclerosis. Cardiovasc Res 2008; 78(1):8-17.

55. Stellos K, Gawaz M. Platelets and stromal cell-derived factor-1 in progenitor cell recruitment. Semin Thromb Hemost. 2007 Mar;33(2):159-64.

56. Zhao B, Dierichs R, Miller FN, Dean WL. Oxidized low density lipoprotein inhibits platelet plasma membrane Ca(2+)-ATPase. Cell Calcium 1996; 19(5):453-8.

57. Kaul S, Waack BJ, Padgett RC, Brooks RM, Heistad DD. Altered vascular responses to platelets from hypercholesterolemic humans. Circ Res 1993; 72(4):737-43.

58. Schmid W, Assinger A, Lee A, Bielek E, Koller E, Volf I. Platelet-stimulating effects of oxidized LDL are not attributable to toxic properties of the lipoproteins. Thromb Res 2008; 122(5):630-9.

59. Zhao B, Dierichs R, Harrach-Ruprecht B, Winterhorff H. Oxidized LDL induces serotonin release from blood platelets. Am J Hematol 1995; 48(4):285-7.

60. Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. FASEB J 2001; 15(12):2073-84.

61. Stellos K, Bigalke B, Stakos D, Henkelmann N, Gawaz M. Platelet-bound P-Selektin expression in patients with coronary artery disease: impact on clinical presentation and myocardial necrosis, and effect of diabetes mellitus and anti-platelet medication. J Thromb Haemost. 2010 Jan;8(1):205-7. Epub 2009 Oct 23.

62. Daub K, Seizer P, Stellos K, Krämer BF, Bigalke B, Schaller M, Fateh-Moghadam S, Gawaz M, Lindemann S. Oxidized LDL-activated platelets induce vascular inflammation. Semin Thromb Hemost. 2010 Mar;36(2):146-56.

7 Danksagung

Herrn Professor Dr. M. Gawaz danke ich für die freundliche Überlassung dieses interessanten Themas, sowie für seine fachkundige Unterstützung und kritische Hilfestellung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Konstantinos Stellos, meinem Betreuer, der mich sehr schnell in das Thema eingearbeitet hat und auf dessen Unterstützung ich jederzeit zählen konnte. Ich konnte sehr von seiner wissenschaftlichen Erfahrung profitieren, was das gute Gelingen dieser Arbeit ermöglichte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Hannah Schnell für ihre geduldige und intensive Einweisung im Labor und die Unterstützung tagsüber, ohne die eine studienbegleitende Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ebenso danke ich Frau Viktoria Mozes für die gute Zusammenarbeit in dieser Studie, sowie für die Unterstützung bei den Bereitschaftsdiensten und der Arbeit im Labor.

Weiterhin möchte ich mich beim Team des Herzkatheterlabors der Abteilung III der Medizinischen Klinik für die geduldige und überwiegend nächtliche Unterstützung bedanken.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Juliane Grimm
Geburtstag	28. September 1981
Geburtsort	Stuttgart

Ausbildung

Seit 07/2010	Assistenzarztausbildung Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitäts- Frauenklinik Tübingen
04/06 – 05/10	Studium der Humanmedizin, Klinik
28.05.2010	Zweites Staatsexamen Eberhard Karls Universität Tübingen
10/05 – 03/06	Studium der Humanmedizin, Klinik Medizinische Universität Wien
09/03 – 06/05	Studium Humanmedizin, Vorklinik
20.06.2005	Erstes Staatsexamen University of Szeged Szeged/Ungarn
12/02 – 03/03	Klinikum Ludwigsburg Pflegepraktikum
10/01 – 07/02	Christian-Hiller-Schule Freiwilliges Soziales Praktikum Schule für geistig behinderte Kinder
08/92 – 06/01	Lise-Meitner-Gymnasium Remseck am Neckar
2001	Allgemeine Hochschulreife
08/88 – 07/92	Grundschule Remseck am Neckar