

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Interdisziplinäre Intensivstation und Intermediate Care Unit  
Leiter: Professor Dr. R. Riessen**

Effekt von Statinen auf den  
Thrombospondin-1-Gehalt humaner Thrombozyten

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

vorgelegt von  
**Melanie Silke Rapp**

aus  
Leonberg

2007

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Riessen

2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Quast

**Gewidmet**

meiner Familie und meinem Partner.

## Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| 1. Einleitung .....  | 6  |
| 1.1. Pathogenese der Arteriosklerose .....                               | 6  |
| 1.2. Thrombozytenaggregation .....                                       | 8  |
| 1.2.1. Primäre Hämostase – Bildung des plättchenreichen Thrombus ...     | 8  |
| 1.2.2. PF-4, $\beta$ -TG und P-Selektin .....                            | 10 |
| 1.2.3. Thrombozyten und Atherogenese .....                               | 11 |
| 1.2.4. Thrombozyten und akutes Koronarsyndrom .....                      | 11 |
| 1.3. Statine .....   | 12 |
| 1.3.1. Therapeutische Anwendung .....                                    | 12 |
| 1.3.2. Wirkungsmechanismus .....   | 13 |
| 1.3.3. Potentielle pleiotrope Effekte .....                              | 14 |
| 1.3.4. Statine und Blutgerinnung .....                                   | 15 |
| 1.4. Thrombospondin-1 .....  | 16 |
| 1.4.1. TSP-1 und Arteriosklerose .....                                   | 17 |
| 1.4.2. TSP-1 und Gerinnung .....   | 17 |
| 1.5. Fragestellung .....   | 18 |
| 2. Material und Methodik .....   | 21 |
| 2.1. Patienten .....   | 21 |
| 2.2. Studienablauf .....   | 21 |
| 2.3. Plättchenreiches und plättchenfreies Plasma .....                   | 23 |
| 2.4. Enzym-Immunoassays .....  | 24 |
| 2.4.1. Thrombospondin-1 .....  | 24 |
| 2.4.2. Plättchenfaktor-4, $\beta$ -Thromboglobulin und sP-Selektin ..... | 25 |
| 2.5. Aggregationsmessungen .....   | 27 |
| 2.5.1. Turbidometrische Aggregometrie .....                              | 27 |
| 2.5.2. In-vitro-Blutungszeit .....                                       | 29 |
| 2.6. Statistische Auswertung .....                                       | 30 |
| 3. Ergebnisse .....  | 32 |
| 3.1. Laborwerte .....  | 32 |
| 3.2. Enzym-Immunoassays .....  | 35 |
| 3.2.1. Thrombospondin-1 .....  | 35 |

|        |                                      |    |
|--------|--------------------------------------|----|
| 3.2.2. | Plättchenfaktor-4 .....              | 36 |
| 3.2.3. | $\beta$ -Thromboglobulin .....       | 37 |
| 3.2.4. | sP-Selektin .....                    | 38 |
| 3.3.   | Aggregationsmessungen .....          | 38 |
| 3.3.1. | Turbidometrische Aggregometrie ..... | 38 |
| 3.3.2. | In-vitro-Blutungszeit .....          | 39 |
| 4.     | Diskussion .....                     | 40 |
| 5.     | Zusammenfassung .....                | 48 |
| 6.     | Abkürzungen .....                    | 50 |
| 7.     | Literaturverzeichnis .....           | 53 |
| 8.     | Anhang .....                         | 68 |
| 9.     | Danksagung .....                     | 71 |
| 10.    | Lebenslauf .....                     | 72 |

### 1. Einleitung

Die medikamentöse Behandlung mit Statinen (HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren) senkt die Mortalität von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) signifikant (4S Group, 1994; LIPID Study Group, 1998). Bislang ist nicht genau geklärt, wieweit dieser Effekt allein auf die cholesterinsenkende Wirkung der Statine zurückzuführen ist oder ob weitere, sogenannte pleiotrope Effekte der Statine auf andere Stoffwechselfvorgänge z.B. in der Gefäßwand oder korpuskulären Blutbestandteilen hier eine zusätzliche Rolle spielen.

#### 1.1. Pathogenese der Arteriosklerose

Die Arteriosklerose und ihre Folgeerkrankungen wie KHK, Myokardinfarkt, zerebraler Insult und periphere arterielle Verschlusskrankheit sind die häufigsten Todesursachen in den westlichen Industriestaaten. Ein breites Spektrum an Risikofaktoren beeinflusst die Entwicklung der Arteriosklerose, die Atherogenese. Dazu zählen vor allem Fettstoffwechselstörungen, insbesondere die Hypercholesterinämie, sowie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Rauchen, Adipositas und erhöhtes Homocystein.

Die Atherogenese ist ein multifaktorieller Prozess, an dem Endothelzellen, Gefäßmuskelzellen, Lymphozyten, Makrophagen und Thrombozyten beteiligt sind. Erste, noch reversible Gefäßwandveränderungen entstehen schon im frühen Kindesalter. Aufgrund mechanischer Beanspruchung, z.B. an Gefäßbifurkationen des Koronarsystems, kommt es zu einer Intimaverdickung und zur Ansammlung von lipidbeladenen und Makrophagen (Typ I - oder Initialläsion) (Stary et al., 1992). Die weitere Entwicklung führt über sogenannte „Fatty Streaks“ (Typ II), Präatherome (Typ III), Atherome (Typ IV) und Fibroatherome (Typ V) zu den komplizierten und stenosierenden Läsionen (Typ VI) (Stary et al., 1994, 1995).

Arteriosklerotische Läsionen (Plaques) zeigen Merkmale einer chronischen Entzündungsreaktion (Ross, 1999). Nach der gängigen „Response to injury“ - Theorie von Ross ist eine Störung der Endothelzellfunktion durch die oben

genannten Risikofaktoren als Ursache der Arterioskleroseentstehung zu sehen (Ross, 1986). Der nachfolgende Einstrom von Lipiden, vor allem von Low-density-Lipoprotein (LDL), in die geschädigte Gefäßwand wird begünstigt durch erhöhte LDL-Serumspiegel, eine gesteigerte Endothel-Permeabilität, eine vermehrte Bindung an die Extrazellulärmatrix (EZM) der Gefäßwand oder eine verminderte Aktivität des Lipid-Rücktransportsystems (High-density-Lipoprotein, HDL) (Berliner et al., 1995; Guyton et al., 1996; Ross, 1999). Durch Lipidperoxidation innerhalb der Gefäßwand entsteht oxidiertes LDL (oxLDL), dieser Vorgang wird durch Sauerstoffradikale und andere reaktive Verbindungen initiiert. OxLDL und aktivierte Thrombozyten sind in der Lage, Endothelzellen zu aktivieren, die daraufhin Adhäsionsmoleküle (VCAM-1, P-Selektin, E-Selektin) und Monozytenaktivatoren (MCP-1, MCSF) bilden. Dadurch werden Monozyten stimuliert, an die Gefäßwand zu adhären, sie dringen in die Intima ein (Transmigration) und differenzieren sich dort zu Makrophagen (Holvoet et al., 1997). Diese nehmen oxLDL über Scavenger-Rezeptoren auf und werden so zu Schaumzellen (Steinberg et al., 1989). Die Apoptose solcher Schaumzellen trägt zur Bildung des Lipidkerns fortgeschrittener Plaques bei, der aus Zelltrümmern und Lipiden besteht (Geng et al., 1995).

Die verminderte endotheliale Produktion des vasodilatatorisch wirkenden Mediators Stickstoffmonoxid (NO) führt unter anderem zu einer erhöhten Thrombozytenaggregation, da NO zur Stabilisation der Thrombozytenmembran beiträgt (Radomski et al., 1991). Vermutlich hemmt NO auch die Proliferation von glatten Muskelzellen der Gefäßwand (Garg et al., 1989). Darüber hinaus können aktivierte Endothelzellen und Makrophagen durch die Sekretion von verschiedenen Zytokinen die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen in die Intima anregen (Schwartz et al., 1995). Eine wichtige Rolle spielt auch die Vasokonstriktion durch Mediatoren wie Endothelin-1 (Biegelsen et al., 1999).

Eine besondere klinische Bedeutung hat die Unterscheidung von stabilen und instabilen Plaques. Stabile Plaques weisen eine ausgeprägte fibröse Kappe auf, die den Lipidkern vom Gefäßlumen trennt. Diese Kappe besteht aus glatten

Muskelzellen und einer EZM aus Kollagen und Proteoglykanen. Durch eine Akkumulation der EZM können das Gefäßlumen eingeengt und die Symptome einer stabilen Angina pectoris hervorgerufen werden. Vermutlich durch eine erhöhte entzündliche Aktivität entstehen instabile, sogenannte vulnerable Plaques (Lee et al., 1997). Diese sind durch einen großen Lipidkern, eine dünne fibröse Kappe und eine große Anzahl an Entzündungszellen charakterisiert (Boyle, 1997; Kristensen et al., 1997). Vor allem durch Makrophagen, aber auch durch glatte Muskelzellen, werden verschiedene Proteinase (z.B. Matrix-Metallo-Proteinase, MMP) produziert, die die vaskuläre EZM enzymatisch abbauen (Kleiner et al., 1993; Boyle, 1997; Lee et al., 1997). Dadurch kann es zu Plaquerupturen kommen, wodurch der Lipidkern und die Kollagen-reiche EZM freigelegt werden. Es folgen die Aktivierung der plasmatischen Gerinnung und die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten (Van-Zanten et al., 1994). Diese sezernieren wiederum vasoaktive und proliferationsfördernde Substanzen, z.B. Thromboxan  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>), PDGF, EGF, TGF- $\beta$  und Thrombospondin-1 (TSP-1) (Fuster, 1995). Nach kleineren Plaquerupturen oder -fissuren kann der Plaque durch Organisation des Thrombus an Größe zunehmen (Stary et al., 1995), bei großen Rupturen bildet sich ein partiell oder vollständig okkludierender Thrombus, was sich klinisch in einem akuten Koronarsyndrom manifestiert.

### **1.2. Thrombozytenaggregation**

#### **1.2.1. Primäre Hämostase – Bildung des plättchenreichen Thrombus**

Durch die Betrachtung der einzelnen Vorgänge während der Thrombusbildung wird deutlich, wie vielfältig und folgenreich die Reaktionen der Thrombozyten auf vasoaktive Faktoren sind (Gawaz, 1999). Dies ist für das Verständnis ihrer besonderen Rolle bei der Atherogenese und beim akuten Koronarsyndrom wichtig.

Thrombozyten sind mit einem Durchmesser von 2-4  $\mu\text{m}$  die kleinsten korpuskulären Blutbestandteile. Sie entstehen im Knochenmark durch

Zytoplasmaabschnürungen von Megakaryozyten, enthalten also keinen Zellkern und nur Reste von mRNA.

Der erste Schritt der Hämostase ist die **Adhäsion** noch ruhender Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand. Verschiedene membranständige Adhäsionsrezeptoren erkennen Strukturen der extrazellulären Matrix des Subendothels und der Media, die aus verschiedenen Kollagentypen, elastischen Fasern, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und Glykoproteinen besteht. Der erste Kontakt entsteht über von-Willebrand-Faktor (vWF), der zum Teil kollagengebunden in der EZM vorliegt und mit dem Glykoprotein GPIb-V-IX der Thrombozytenmembran interagiert. Über weitere Adhäsionsrezeptoren (Kollagen-, Fibronektin- und Laminirezeptoren) wird die Adhäsion stabilisiert.

Der zweite Schritt, die **Aktivierung** der Thrombozyten, wird während der Adhäsion durch die Bindung von Kollagen an spezifische Rezeptoren (u.a. Integrin  $\alpha 2\beta 1$ ) ausgelöst. Aber auch lösliche Agonisten wie ADP oder Thrombin führen zur Aktivierung. Über verschiedene Signaltransduktionswege wird die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht, was eine Formveränderung der Thrombozyten („shape change“) mit Pseudopodienbildung und Spreizung zur Folge hat. Aus membranständiger Arachidonsäure wird mittels der Zyklooxygenase (COX-1) unter anderem  $\text{TXA}_2$  gebildet, das nach seiner Freisetzung in den Extrazellulärraum wiederum an Rezeptoren bindet und die Entleerung der thrombozytären Granula stimuliert (Sekretion). Der Fibrinogenrezeptor (Glykoprotein GPIIb-IIIa) wird von der ruhenden in die aktive Form überführt, nun können Fibrinogenbrücken zwischen Thrombozyten gebildet werden, ohne die Aggregation nicht möglich ist. Durch eine veränderte Orientierung der Membranphospholipide (aktivierte Oberfläche) können sich Gerinnungsfaktoren an die Thrombozyten anlagern und Faktorenkomplexe gebildet werden. Damit kann die plasmatische Gerinnung, also die Fibrinbildung, in Gang kommen.

Der dritte Schritt der Thrombusbildung ist die **Aggregation**, die Koadhäsion zwischen Thrombozyten. Durch die Sekretion von Granulainhaltsstoffen (vor allem durch ADP) werden noch ruhende Thrombozyten aus der Zirkulation rekrutiert. Die Interaktion mit den schon adhätierenden Thrombozyten erfolgt

über den Fibrinogenrezeptor GPIIb-IIIa und ist streng Kalzium-abhängig. Es bilden sich Fibrinogenbrücken, zuerst locker und reversibel (primäre Aggregation), dann fest und irreversibel (sekundäre Aggregation).

Eine wichtige Rolle bei diesen Vorgängen spielt die **Sekretion** der Thrombozyten. Es gibt drei verschiedene Arten von Granula: die dichten Granula, die  $\alpha$ -Granula und die Lysosomen. Die dichten Granula sind zusammen mit dem dichten tubulären System der Speicherort für Kalzium und ADP. Die Inhaltsstoffe der  $\alpha$ -Granula erfüllen vielfältige Aufgaben: zu den adhäsiven Proteinen zählen unter anderem Fibrinogen, Fibronectin, vWF, GPIIb-IIIa, P-Selektin und TSP-1, auf dessen Funktion später noch eingegangen wird. Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF- $\beta$  sind an proliferativen Vorgängen im Bereich der Gefäßwand beteiligt. Proinflammatorische Faktoren aus den  $\alpha$ -Granula sind z.B. Interleukin-1 (IL-1), CD40-Ligand (CD40-L, ein TNF- $\alpha$ -ähnliches Transmembranprotein), Plättchenfaktor-4 (PF-4) und  $\beta$ -Thromboglobulin ( $\beta$ -TG).

### 1.2.2. PF-4, $\beta$ -TG und P-Selektin

PF-4 und  $\beta$ -TG sind proinflammatorische thrombozytenspezifische Proteine der  $\alpha$ -Granula, die chemotaktisch auf Leukozyten und Fibroblasten wirken und die Aktivierung neutrophiler Granulozyten regulieren (Deuel et al., 1981; Senior et al., 1983; Brandt et al., 2000). PF-4 wird nach seiner Freisetzung aus Thrombozyten im Gegensatz zu  $\beta$ -TG auch von Endothelzellen gespeichert und unter Heparinstimulation wieder aus diesen freigesetzt (Goldberg et al., 1980; Dawes et al., 1982). Von beiden sind bei gesteigerter Thrombozytenaktivierung erhöhte Plasmaspiegel zu finden, allerdings auch bei Niereninsuffizienz, bedingt durch verminderte Ausscheidung (Endo, Y. et al., 1981; Kaplan et al., 1981).

P-Selektin (CD62P) ist ein Membranglykoprotein aus der Selektinfamilie, die aus den drei Adhäsionsrezeptoren E-, L- und P-Selektin besteht. P-Selektin kommt sowohl in Thrombozyten als auch in Endothelzellen vor und wird dort in den  $\alpha$ -Granula bzw. den Weibel-Palade-Körperchen gespeichert. Es wird nach Aktivierung dieser Zellen freigesetzt und auf der Zelloberfläche exprimiert (Hsu-

Lin et al., 1984; McEver et al., 1989). P-Selektin vermittelt die Leukozytenadhäsion an Endothelzellen und Thrombozyten im Bereich von Endothelläsionen und die Aktivierung von Leukozyten (Hamburger et al., 1990; Weyrich et al., 1995, 1996). Die lösliche Form, das sP-Selektin, hat keine Membranbindungsdomäne, ist im Plasma nachweisbar und zum Beispiel bei Patienten mit KHK erhöht. Für sP-Selektin werden unter anderem antientzündliche Funktionen diskutiert (Dunlop et al., 1992; Parker et al., 2001).

### **1.2.3. Thrombozyten und Atherogenese**

Zirkulierende Thrombozyten können durch kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie aktiviert werden (Broijersen et al., 1998). Durch die nachfolgende Sekretion von IL-1 und CD40-L werden die adhäsiven und chemotaktischen Eigenschaften von Endothelzellen beeinflusst. Sie sezernieren vermehrt MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), außerdem wird die Oberflächenexpression von ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) und VCAM-1 (Vascular Adhesion Molecule-1) erhöht (Gawaz et al., 1998). Dies könnte eine Ursache für die Chemotaxis, Adhäsion und Transmigration von Monozyten sein, ein früher Schritt der Atherogenese.

Die Entstehung einer systemischen Entzündungsreaktion mit CRP-Anstieg könnte zumindest teilweise durch die thrombozytäre Expression von CD40-L ausgelöst werden. Dieses induziert in Endothelzellen die Sekretion von Entzündungsmediatoren wie IL-6 und IL-8 (Henn et al., 1998). Erhöhte CRP-Plasmaspiegel werden als prognostisch ungünstig beim akuten Koronarsyndrom angesehen (Liuzzo et al., 1994).

Außerdem stimulieren Thrombozyten durch Sekretion von Wachstumsfaktoren (siehe oben) die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen (Ross et al., 1974; Raines, 2004).

### **1.2.4. Thrombozyten und akutes Koronarsyndrom**

Unter dem Begriff des akuten Koronarsyndroms werden die instabile Angina pectoris, sowie Myokardinfarkte mit und ohne ST-Hebung zusammengefaßt.

Pathophysiologisch liegt meist eine akute Plaqueruptur zugrunde, bei der thrombogenes Material wie Kollagen und vWF freigelegt wird, wodurch zirkulierende Thrombozyten aktiviert werden. Der Lipidkern arteriosklerotischer Plaques enthält Gewebethromboplastin (Tissue Factor) (Toschi et al., 1997), der mit dem Gerinnungsfaktor VIIa Komplexe bildet und so über Aktivierung der Faktoren IX und X die Bildung von Thrombin (Faktor IIa) induziert. Durch Thrombin werden zusätzliche Thrombozyten rekrutiert und die Thrombozytenaggregation verstärkt. Nach der Bindung des sogenannten Prothrombinasekomplexes (Faktor Va, Xa und Kalzium) an die aktivierte Thrombozytenmembran können Thrombin und schließlich Fibrin in großen Mengen gebildet werden. Ein thrombotischer Gefäßverschluss ist die Folge. Durch Sekretion von vasokonstriktorisches Mediatoren wie TXA<sub>2</sub> und Serotonin durch aktivierte Thrombozyten kann es zu Vasospasmen kommen, die die Ischämie noch verschlimmern. Nachfolgend kann die Organisation muraler Thrombozytenaggregate zur Plaqueprogression führen (Stary et al., 1995).

### **1.3. Statine**

Die Entdeckung der Statine revolutionierte die medikamentöse Behandlung der Hypercholesterinämie. Lovastatin wurde von Endo und Kuroda 1976 aus dem Schimmelpilz *Aspergillus terreus* isoliert (Endo, A. et al., 1977) und war der erste spezifische Hemmer der Cholesterinbiosynthese, der 1987 in den USA zugelassen wurde. Es folgte die Entwicklung synthetischer Statine (Fluvastatin, Atorvastatin, Cerivastatin), chemisch veränderter Pilzprodukte (Simvastatin) und durch Mikroben veränderter Pilzprodukte (Pravastatin).

#### **1.3.1. Therapeutische Anwendung**

Große klinische Studien zeigen, dass Statine das Gesamtcholesterin um 15-40%, LDL um 20-60% und Triglyceride um 10-30% gegenüber dem Ausgangswert senken und HDL um 5-15% erhöhen (La Rosa et al., 1999). Durch prospektive Studien wie die Framingham-Studie konnte schon früh der Zusammenhang zwischen erhöhtem Serumcholesterin und Myokardinfarkten

gezeigt werden (Kannel et al., 1971). Die Ergebnisse einiger multizentrischer kontrollierter Studien belegen die signifikante Senkung der Myokardinfarktinzidenz und der Gesamtmortalität durch eine Statintherapie (4S, WOSCOPS, CARE, AFCAPS/TexCAPS, LIPID) (4S Group, 1994; Shepherd et al., 1995; Sacks et al., 1996; Downs et al., 1998; LIPID Study Group, 1998). Es wurden sowohl Primär- als auch Sekundärpräventionsstudien durchgeführt, die Patienten hatten zum Teil stark erhöhte und zum Teil mäßig erhöhte bis durchschnittliche Serumcholesterinwerte.

### **1.3.2. Wirkungsmechanismus**

Statine hemmen kompetitiv und reversibel die HMG-CoA-Reduktase (Endo, A. et al., 1977). Dieses Enzym katalysiert die Reduktion von 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym A zu L-Mevalonat, was der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Cholesterinbiosynthese aus aktivierter Essigsäure (Acetyl-CoA) ist. Durch die Absenkung des intrazellulären Cholesteringehalts wird über Geninduktion die Neusynthese und Expression von LDL-Rezeptoren gesteigert. Dadurch kann mehr zirkulierendes LDL in die Zellen aufgenommen werden und der Plasmaspiegel sinkt (Reihner et al., 1990). Durch das erniedrigte LDL und erhöhte HDL nimmt die Größe des Lipidkerns der arteriosklerotischen Plaques ab. Es konnte gezeigt werden dass Statine die Cholesterinakkumulation in Makrophagen inhibieren, und somit die Schaumzellbildung (Kempen et al., 1991). Allerdings wird der Stenosegrad betroffener Koronararterien durch eine Statintherapie nur um 1-2% vermindert (MAAS Investigators, 1994; Rossouw, 1995). Eine Nachauswertung der WOSCOP-Studie ergab außerdem, dass Patienten der Verumgruppe (Pravastatin) mit gleichen LDL-Cholesterinspiegeln wie die korrespondierende Placebogruppe 45% weniger Koronarereignisse erlitten (WOSCOPS Group, 1998). Diese Fakten sprechen für Cholesterin-unabhängige Effekte einer Statintherapie, die z.B. durch Stabilisierung der Plaques deren Ruptur verhindern können.

### 1.3.3. Potentielle pleiotrope Effekte

Bislang ist noch nicht abschließend geklärt, in welchem Maß nicht-Cholesterinvermittelte, sogenannte pleiotrope Effekte der Statintherapie zur Senkung der Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse beitragen. Mevalonat, das Produkt der HMG-CoA-Reduktase, ist nicht nur eine Vorläufersubstanz der Cholesterinbiosynthese, sondern auch einiger phosphorylierter Isoprenoide wie Geranylgeranyl, Farnesyl und Dolichol (Goldstein et al., 1990). Geranylgeranyl- und Farnesylpyrophosphat sind für die posttranslationale Modifikation von Signaltransduktionsproteinen wie zum Beispiel der GTP-bindenden Proteine Ras und Rho notwendig (Casey, 1995). Die Rho-Kinase, das durch Rho aktivierte Zielenzym, spielt eine Rolle bei der Atherogenese, indem sie unter anderem verschiedene Funktionen von Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen beeinflusst (Seasholtz et al., 2004).

Einige Studien belegen, dass die vorwiegend lipophilen Statine Lovastatin, Simvastatin, Atorvastatin, Cerivastatin und Fluvastatin die Proliferation und Migration von Gefäßmuskelzellen *in vitro* hemmen, und dass dieser Effekt durch Mevalonatzugabe reversibel ist. Bei dem stark hydrophilen Pravastatin ist die Proliferationshemmung kaum ausgeprägt (Corsini et al., 1993; Munro et al., 1994; Rogler et al., 1995; Negre-Aminou et al., 1997; Axel et al., 2000; Siegel-Axel et al., 2003). Lipophile Statine können Zellmembranen durch passive Diffusion überwinden, Pravastatin dagegen gilt als hepatoselektiv (Hatanaka et al., 1998). Unsere Arbeitsgruppe konnte außerdem zeigen, dass sowohl Lovastatin, als auch ein Geranylgeranyl-Transferase-Inhibitor und ein Rho-Kinase-Inhibitor die Proliferation humaner Gefäßmuskelzellen und die TSP-1-Expression durch diese Zellen hemmen. Dies zeigt, dass die proliferationshemmende Statinwirkung zumindest teilweise über die verminderte Bildung von Geranylgeranylpyrophosphat und die daraus folgende Hemmung des Rho-Kinase-Signaltransduktionsweges vermittelt wird (Paulowitsch 2005). Für die statinbedingte Stabilisierung vulnerabler Plaques könnten mehrere Mechanismen wie die Hemmung der MMP-Expression durch Makrophagen und glatte Muskelzellen (Bellosta et al., 1998; Wong et al., 2001), die gesteigerte

Expression von Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)-2 (Siegel-Axel et al., 2003) und die verminderte Anzahl an Entzündungszellen in den Plaques (Vaughan et al., 2000; Crisby et al., 2001) verantwortlich sein.

Durch eine Statintherapie wird bei KHK-Patienten der CRP-Spiegel deutlich gesenkt, wobei dieser Effekt in den meisten Studien als lipidunabhängig beschrieben wird (Balk et al., 2003). Verantwortlich dafür könnte eine Hemmung der Produktion von Il-6 und anderer proinflammatorischer Mediatoren sein (Musial et al., 2001; Wang et al., 2003).

Ein weiterer wichtiger Effekt ist eine verbesserte Endothelfunktion durch die vermehrte Expression endothelialer NO-Synthase (Laufs et al., 1998) und die verminderte Produktion prokoagulatorischer oder vasokonstriktorischer Mediatoren (Tissue Factor, Endothelin-1) durch Endothelzellen (Hernandez-Perera et al., 1998; Eto et al., 2002). Die myokardiale Perfusion kann somit erhöht werden.

### **1.3.4. Statine und Blutgerinnung**

Hypercholesterinämie geht mit einer erhöhten Thrombozytenaktivierung einher (Broijersen et al., 1998). Es wird angenommen, dass ein erhöhtes Cholesterin/Phospholipid-Verhältnis der Thrombozytenmembran (Hochgraf et al., 1994), eine vermehrte Expression von TXA<sub>2</sub> (Notarbartolo et al., 1995) und  $\alpha_2$ -adrenerger Rezeptoren (Baldassarre et al., 1997) und ein erhöhter zytoplasmatischer Kalziumspiegel (Le Quan Sang et al., 1995) dafür verantwortlich sind. Es gibt einige Studien, die sowohl eine Verminderung der Thrombozytenaktivierung und -aggregation als auch der plasmatischen Gerinnung unter einer Statintherapie beobachten. Die Gabe von Lovastatin hemmt bei Patienten mit Hypercholesterinämie signifikant die Thrombozytenaggregation (Mayer et al., 1992; Hochgraf et al., 1994). Aviram et al. konnten zeigen, dass Fluvastatin und Lovastatin, aber nicht Pravastatin nach vierwöchiger Therapie das Cholesterin/Phospholipid-Verhältnis der Thrombozytenmembran vermindern und die Aggregation signifikant hemmen. Fluvastatin konnte die Aggregation in den folgenden 20 Wochen noch um

weitere 15% senken, obwohl der LDL-Cholesterinspiegel stagnierte (Aviram et al., 1998). Dies spricht dafür, dass Cholesterin-unabhängige Mechanismen zumindest teilweise eine Rolle spielen. Notarbartolo et al. untersuchten in einer plazebokontrollierten, doppelblinden Studie den Einfluss von Simvastatin auf die TXA<sub>2</sub>-Synthese und Funktion von Thrombozyten. Beide Parameter wurden signifikant gesenkt (Notarbartolo et al., 1995). Fluvastatinbehandlung vermindert die Oberflächenexpression der thrombozytären Aktivitätsmarker P-Selektin (CD62) und CD63 (Huhle et al., 1999). Atorvastatin hemmt ebenfalls die Thrombozytenaggregation, genauso wie die Plasmaviskosität und den Gerinnungsfaktor VII (Dujovne et al., 2000). Banyai et al. stellten fest, dass Atorvastatin auch bei Patienten, deren LDL-Spiegel durch Aphaese-Therapie bereits gesenkt waren, die Thrombozytenaggregation hemmt (Banyai et al., 2001). Auch dies kann als Hinweis auf Lipid-unabhängige Statineffekte gewertet werden. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Simvastatin die plasmatische Gerinnung beeinflusst, und zwar über die Hemmung der Aktivierung von Prothrombin, Faktor V und Faktor VIII, die Hemmung der Fibrinbildung aus Fibrinogen und die vermehrte Inaktivierung von Faktor Va durch Protein C (Undas et al., 2001).

### **1.4. Thrombospondin-1**

Thrombospondin-1 (TSP-1) ist ein homotrimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 420000 Dalton (Lawler et al., 1986). Es gehört zur Familie der Thrombospondine, der zur Zeit fünf verschiedene Glykoproteine zugeordnet werden (Bornstein et al., 1994). TSP-1 wurde erstmals aus den  $\alpha$ -Granula von Thrombin-stimulierten Thrombozyten isoliert (Baenziger et al., 1971; Lawler et al., 1978). In-vivo-Experimente konnten zeigen, dass verschiedene andere Zelltypen ebenfalls TSP-1 sezernieren: Gefäßmuskelzellen (Mumby et al., 1984), Endothelzellen (McPherson et al., 1981; Mosher et al., 1982), Monozyten (Jaffe et al., 1985) und Fibroblasten (Jaffe et al., 1983).

### 1.4.1. TSP-1 und Arteriosklerose

TSP-1 ist ein Teil der EZM humaner arteriosklerotischer Gefäßläsionen und restenotischer Gefäße (Wight et al., 1985; Riessen et al., 1998). Tierexperimentelle Studien ergaben, dass glatte Gefäßmuskelzellen TSP-1 in der frühen Phase nach einer Gefäßverletzung exprimieren (Raugi et al., 1990; Miano et al., 1993). Die an sich niedrige TSP-1-Expression der Gefäßmuskelzellen kann durch PDGF-Zugabe deutlich verstärkt werden (Majack et al., 1985, 1987). So wird TSP-1 der Gruppe der sogenannten Intermediate-early Genes zugeordnet, die als Reaktion auf Wachstumsstimulanzien nach einer experimentellen Gefäßverletzung exprimiert werden (Majack et al., 1987; Miano et al., 1993). Die Migration glatter Gefäßmuskelzellen scheint durch TSP-1 stimuliert zu werden, synergistisch mit PDGF-vermittelter Migrationsstimulation (Yabkowitz et al., 1993). Patel und Mitarbeiter konnten zeigen, dass TSP-1 die DNA-Synthese, Proliferation und Chemotaxis humaner Gefäßmuskelzellen signifikant erhöht, und zwar PDGF-unabhängig (Patel et al., 1997).

### 1.4.2. TSP-1 und Gerinnung

TSP-1 ist ein wichtiger Kofaktor der Blutgerinnung, besonders der Thrombozytenaggregation. In-vitro-Studien ergaben, dass monoklonale TSP-1-Antikörper die Thrombozytenaggregation hemmen (Boukerche et al., 1988), und dass die Zugabe von TSP-1 oder dessen carboxy-terminalen Ende die Aggregation stimulieren (Tuszynski et al., 1988; Dorahy et al., 1997). Nach der Ausschüttung von TSP-1 aus den  $\alpha$ -Granula aktivierter Thrombozyten bindet es Kalzium-abhängig an deren Oberfläche (Bornstein, 2001). Es wurden verschiedenen Rezeptoren beschrieben, mit denen TSP-1 vermutlich interagiert. Unter physiologischen Scherkräften bildet es über GPIIb-IIIa-gebundenes Fibrinogen Brücken zwischen Thrombozyten, bindet aber nicht direkt an GPIIb-IIIa. Hierbei ist das amino-terminale Ende ausschlaggebend (Bonney et al., 2001). TSP-1 bindet über sein carboxy-terminales Ende an IAP (Integrin-associated Protein, CD47), das GPIIb-IIIa und die Integrine  $\alpha v \beta 3$

(Vitronektinrezeptor) und  $\alpha 2\beta 1$  (Kollagenrezeptor) stimuliert. Über Freisetzung von ADP und  $\text{TXA}_2$  wird so die Aggregation weiter vorangetrieben (Chung et al., 1997, 1999). Trumel et al. konnten aber auch zeigen, dass die aggregationsstimulierende Wirkung des carboxy-terminale Ende von TSP-1 zum Teil unabhängig von Fibrinogen, IAP und GPIIb-IIIa abläuft, und zwar über Proteinphosphorylierung (Trumel et al., 2003). Unter erhöhten Scherkräften, wie sie in stenosierten Arterien zu finden sind, könnte TSP-1 über GPIb (vWF-Rezeptor) an Thrombozyten binden. Dabei ist die Anwesenheit von vWF nicht nötig (Jurk et al., 2003). Die Bindung an GPIV (GPIIIb, CD36), einem Rezeptor für Kollagen I, IV und V, aber auch für oxLDL (Scavenger-Rezeptor) wird ebenfalls beschrieben (McGregor et al., 1989; Asch et al., 1992; Endemann et al., 1993). Erhöhte TSP-1-Plasmaspiegel werden als Marker für eine intravaskuläre Thrombozytenaktivierung angesehen (McCrohan et al., 1987; Kehrel et al., 1996). Die plasmatische Gerinnung könnte durch TSP-1 beeinflusst werden, indem es in Fibrinthromben eingebaut wird und an Plasmaproteine wie Fibrinogen, Plasminogen und Histidin-reiches Glykoprotein bindet (Bornstein, 2001).

### 1.5. Fragestellung

Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Riessen und PD Dr. Siegel-Axel beschäftigt sich schon seit einigen Jahren mit der Erforschung der Thrombospondine. Die Expression von TSP-1 in humanen arteriosklerotischen und restenotischen Gefäßen konnte immunhistologisch nachgewiesen werden (Riessen et al., 1998). In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass TSP-5 ein Bestandteil der humanen vaskulären EZM ist, und dass die Expression von TSP-5 in Gefäßmuskelzellen im Vergleich zur Expression von TSP-1 und TSP-2 unterschiedlich reguliert ist (Riessen et al., 2001).

Die Basis für diese Dissertation „Effekt von Statinen auf den Thrombospondin-1-Gehalt humaner Thrombozyten“ liefert eine Studie, in der der Effekt von Statinen auf die TSP-1-mRNA-Expression in humanen Gefäßmuskelzellen untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass lipophile Statine wie

Lovastatin und Simvastatin, aber nicht Pravastatin, *in vitro* selektiv die Expression von TSP-1 vermindern, während die Expression von anderen extrazellulären Matrixmolekülen wie Fibronectin, Kollagen Typ I und Biglykan unbeeinflusst bleibt (Riessen et al., 1999). In einer weiteren Studie wurde der Effekt von Cerivastatin auf die EZM-Expression humaner Gefäßmuskelzellen untersucht. Die TSP-1-Expression wurde hier ebenfalls signifikant vermindert (Siegel-Axel et al., 2003). In beiden Studien konnte der Statineffekt durch Mevalonatzugabe, nicht aber durch Dolichol- oder LDL-Zugabe aufgehoben werden. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe in einer weiteren Studie zeigen, dass die statinbedingte Hemmung der Gefäßmuskelproliferation und der TSP-1-Expression zumindest teilweise über die verminderte Bildung von Geranylgeranylpyrophosphat und die daraus folgende Hemmung des Rho-Kinase-Signaltransduktionsweges vermittelt werden (Paulowitsch, 2005).

Der Beweis, dass diese Effekte auch bei Patienten unter Gabe üblicher Statin-Dosierungen auftreten und eine therapeutische Relevanz haben, ist an Gefäßmuskelzellen praktisch nicht durchzuführen, da sich die Entnahme von Gefäßbiopsien im Rahmen einer klinische Studie verbietet. Die Untersuchung des TSP-1-Gehaltes zirkulierender Thrombozyten ist dagegen technisch problemlos möglich und eventuell von noch größerer klinischer Relevanz im Hinblick auf die vielfältigen biologischen Effekte von TSP-1 im Bereich des Gerinnungssystems. Der Effekt von Statinen auf die TSP-1-Expression in Magakaryozyten bzw. auf den TSP-1-Gehalt von Thrombozyten ist bislang nicht untersucht. Einige Studien, die eine Verminderung der Thrombozytenaktivierung und der plasmatischen Gerinnung unter Statintherapie beobachtet haben, wurden schon im Kapitel 1.3.4. beschrieben (Mayer et al., 1992; Hochgraf et al., 1994; Notarbartolo et al., 1995; Aviram et al., 1998; Huhle et al., 1999; Dujovne et al., 2000; Banyai et al., 2001; Undas et al., 2001).

Die vorliegende Studie sollte nun untersuchen, ob unter einer Therapie mit lipophilen Statinen der TSP-1-Gehalt von Thrombozyten, analog zu der *in vitro* an humanen Gefäßmuskelzellen beobachteten TSP-1-Expressionshemmung, gesenkt wird. Parallel zur Messung des thrombozytären TSP-1-Gehaltes im plättchenreichen Plasma (PRP) wurden als Kontrollparameter die

Thrombozytenproteine PF-4,  $\beta$ -TG und sP-Selektin bestimmt. Zudem wurde die spontane Freisetzung von TSP-1, PF-4,  $\beta$ -TG und sP-Selektin im plättchenfreien Plasma (PFP) ermittelt, um den Aktivierungszustand der Thrombozyten oder die Freisetzung aus anderen Zelltypen (z.B. Endothelzellen, glatte Muskelzellen) ins Plasma einschätzen zu können.

## 2. Material und Methodik

### 2.1. Patienten

Untersucht wurden im Zeitraum von 2/2002 – 8/2003 24 Patienten, bei denen in der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen klinisch und koronarangiographisch die Diagnose einer stabilen KHK gestellt wurde. Der Altersmittelwert der Patienten betrug  $66 \pm 10$  Jahre. Bei allen Patienten bestand bei LDL-Cholesterinwerten von über 100 mg/dl die Indikation zu einer cholesterinsenkenden Therapie mit Statinen. Aufgrund der KHK nahmen fast alle teilnehmenden Patienten Thrombozytenaggregationshemmer ein (23 Patienten ASS, Clopidogrel oder beide kombiniert; ein Patient nahm Phenprocoumon als Antikoagulanzen ein). Als Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme galten, neben den Kontraindikationen für eine Statintherapie, unter anderem der Beginn einer Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern vor weniger als 3 Tagen, akutes Koronarsyndrom oder Lysetherapie vor weniger als 14 Tagen und eine schon laufende Therapie mit cholesterinsenkenden Medikamenten jeglicher Art.

### 2.2. Studienablauf

Nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung (Formular siehe Anhang) wurden den Patienten insgesamt knapp 50 ml venöses Blut nach einem gleichbleibenden Verfahren mit einer S-Monovetten-Kanüle® 20Gx1,5“ (Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland) entnommen. Um eine Thrombozytenaktivierung zu vermeiden wurde die Stauungszeit möglichst kurz gehalten. Entnommene Proben:

3 x 10 ml Citrat; 2 x 2,9 ml CTAD (Citrat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol); 3 ml Citrat; 2,7 ml EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) und 5 ml Lithium-Heparin (jeweils S-Monovette®, Sarstedt).

Es wurden folgende Parameter aus den Blutproben bestimmt:

- TSP-1, PF-4,  $\beta$ -TG und sP-Selektin, jeweils in plättchenreichem Plasma (PRP) und plättchenfreiem Plasma (PFP)
- Gesamtcholesterin, LDL, HDL, CRP, CK,  $\gamma$ -GT, GPT, GOT, LDH, AP, Gesamtbilirubin, Kreatinin, Harnstoff, Hb, Thrombozyten, Quick, PTT, Fibrinogen, AT III, D-Dimere
- Turbidometrische Aggregometrie, In-vitro-Blutungszeit

Danach erhielten die Patienten die Erstdosis des ärztlich verordneten lipophilen Statins (19 Patienten Atorvastatin 10-40 mg, 5 Patienten Simvastatin 20-40 mg). Die jeweiligen Hausärzte wurden schriftlich über die Studienteilnahme ihrer Patienten informiert, mit der Bitte, uns über Medikationsänderungen und eventuell auftretende Nebenwirkungen der Statintherapie zu unterrichten. Nach einer mindestens vierwöchigen Behandlungsperiode wurden im Rahmen einer ambulanten Wiedervorstellung noch einmal die gleichen Laborparameter wie vor Beginn der Statintherapie bestimmt. Da die durchschnittliche Lebensdauer von Thrombozyten ca. 1 Woche beträgt, sollte zu diesem Zeitpunkt die Bildung aller zirkulierenden Thrombozyten unter der Einwirkung von Statinen erfolgt sein. Damit war für die Patienten die Studienteilnahme beendet, die Statintherapie wurde unter hausärztlicher Kontrolle fortgeführt.

Primärer Zielparameter der Studie war der TSP-1-Gehalt/ $10^6$  Thrombozyten. Die sekundären Zielparameter waren: TSP-1-Konzentration im PFP als Indikator für die spontane Plättchenaktivierung; PF-4,  $\beta$ -TG und sP-Selektin als etablierte in-vivo-Marker der Thrombozytenaktivierung, gemessen sowohl im PRP als auch im PFP. TSP-1, PF-4,  $\beta$ -TG und sP-Selektin wurden mit Hilfe von Enzym-Immunoassay gemessen. In einem Subkollektiv der Patienten (n=9) wurde zusätzlich der Effekt der Statine auf die Thrombozytenaggregation untersucht.

Als Marker für eine regelmäßige Medikamenteneinnahme wurden die im Routinelabor der Uniklinik Tübingen bestimmten Blutfettwerte

(Gesamtcholesterin, LDL, HDL) und das CRP herangezogen. Zur Kontrolle von Kontraindikationen bzw. Nebenwirkungen der Statingabe dienten Kreatinkinase (CK, erhöht bei Myopathie / Rhabdomyolyse), Leberenzyme und Cholestaseparameter ( $\gamma$ -GT, GPT, GOT, LDH, AP, Gesamtbilirubin), Nierenretentionsparameter (Kreatinin und Harnstoff wegen erhöhtem Myopathierisiko bei Nierenfunktionsstörung) und Blutbild (Hb und Thrombozytenzahl wegen Thrombopenie und Anämie als seltene Nebenwirkungen). Zum Ausschluss vorbestehender Gerinnungsstörungen wurden Quick, PTT, Fibrinogen, AT III und D-Dimere bestimmt.

### **2.3. Plättchenreiches und plättchenfreies Plasma**

Die Gewinnung von PRP erfolgte aus 3 x 10 ml mit Citrat antikoaguliertem Blut. Nach 10-minütigem Abzentrifugieren der Erythrozyten mit 1000 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau) wurden pro S-Monovette® 2 ml Überstand vorsichtig abgehoben. Der übrige Inhalt wurde weitere 10 Minuten mit 3500 rpm zentrifugiert, um PFP zu gewinnen, womit das PRP nach maschinellem Zählen der Thrombozyten (Sysmex SE-9000, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt) auf 300000/ $\mu$ l verdünnt werden konnte. Mit einem Teil des PRP wurden nun die Aggregationsversuche durchgeführt. Im restlichem Material zerstörten wir durch 5-maliges Einfrieren (15 min, -70 °C) und Auftauen (5 min Wasserbad, 37 °C) die Thrombozytenzellmembranen und Granula, um die intrazellulären Proteine freizusetzen. Die weitere Aufbewahrung erfolgte bei -70 °C. Das so gewonnene lysierte Citrat-PRP wurde für die Proteinbestimmungen verwendet.

Das PFP für die Proteinbestimmungen gewannen wir aus 2 x 2,9 ml mit CTAD antikoaguliertem Blut, wie von den Herstellern der verwendeten ELISA-Kits (s.u.) empfohlen. Dieses wurde sofort nach Entnahme im Eiskübel für mindestens 15 Minuten gekühlt und anschließend 30 min bei 4 °C mit 3000 g zentrifugiert (Universal 320R, Hettich AG, Bäch, Schweiz). Aus der Mitte des Überstandes wurden jeweils 1 ml PFP vorsichtig abgehoben und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### 2.4. Enzym-Immunoassays

Ein Enzym-Immunoassay (EIA) ist eine empfindliche und spezifische immunologische Methode zur Bestimmung antigener Substanzen (Proteine, Hormone, Pharmaka u.a.) in Flüssigkeiten, z.B. im Plasma. Es wurden enzymmarkierte spezifische Antikörper oder Antigene vom gleichen Typ wie das zu bestimmende Antigen verwendet. Ein EIA kann unter anderem als ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) oder als EMIT (enzyme multiplied immunotechnique) durchgeführt werden.

Ein ELISA ist ein heterogener EIA, bei dem die gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten Antikörper an eine Trägersubstanz gebunden vorliegen. An die nach Inkubation mit der Probe gebildeten Immunkomplexe lagern sich in einem nachfolgenden Schritt zugefügte, mit einem Enzym markierte Antikörper an (Sandwichmethode). Durch Zugabe eines chromogenen Substrats zum Reaktionsansatz wird eine enzymatische Farbreaktion ausgelöst, die photometrisch gemessen werden kann. Die Antigenkonzentration in der Probe wird durch Vergleich mit Standardreihen bekannter Antigenkonzentration ermittelt. Dabei ist die Antigenkonzentration proportional zur Enzymaktivität.

Ein EMIT ist ein homogener EIA, bei dem das zu untersuchende Antigen enzymmarkiertes Testantigen des gleichen Typs aus einer Immunkomplexbindung mit spezifischen Antikörpern verdrängt. Wie beim ELISA wird durch Substratzugabe eine enzymatische Farbreaktion ausgelöst, die photometrisch gemessen werden kann. Die Antigenkonzentration der Probe ist dabei umgekehrt proportional zur Enzymaktivität.

#### 2.4.1. Thrombospondin-1

Die TSP-1-Konzentration im lysierten Zitrat-PRP wurde mit dem EMIT „ChemiKine™ Human TSP-1 EIA Kit“ (CHEMICON® International, Inc., Temecula, USA) bestimmt. Aus diesem Wert (ng/ml) und der eingesetzten Thrombozytenanzahl von 300000/ $\mu$ l ließ sich der TSP-1-Gehalt bezogen auf  $10^6$  Thrombozyten berechnen. Die Bestimmung von TSP-1 im CTAD-PFP erfolgte ebenfalls mit dem genannten EMIT.

### Testablauf:

Die Reagenzien und Lösungen wurden nach Packungsanleitung vorbereitet und verdünnt. Von den Patientenproben (Verdünnungsfaktoren PRP 1:400, PFP 1:10) und Standardlösungen (3,91 – 1000 ng/ml) wurden je 100 µl in die 96 Vertiefungen einer mit Anti-Kaninchen-Antikörpern beschichteten Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zugabe von 25 µl verdünntem polyklonalem Anti-TSP-1-Antikörper (vom Kaninchen) und 3 h Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 25 µl verdünntes, Biotin-markiertes TSP-1 hinzugefügt. Die so entstandenen markierten Anti-TSP-1-Komplexe besetzten die freien Antikörper der Platte. Je mehr TSP-1 in der Probe war, desto weniger biotinyliertes TSP-1 wurde also gebunden. Nach 30 min Inkubation und 5-maligem Waschen mit je 250 µl Pufferlösung wurde das Enzym (Straptavidin-Alkaline Phosphatase, je 50 µl verdünnte Lösung) hinzugegeben, das an das biotinylierte TSP-1 bindet. Nach weiteren 30 min und erneutem Waschen wurde schließlich das farbbildende Substrat (je 200 µl) zugegeben. Die Farbreaktion lief in zwei Schritten ab: zuerst die Dephosphorylierung von NADPH zu NADP, welches dann als Kofaktor eine Redoxreaktion aktivierte, die zur Farbbildung (Formazan) führte. Nach 20 min wurde die Farbreaktion durch Zugabe einer Stopplösung (je 50 µl 0,5 M Sulfursäure) beendet und die optische Dichte bei 490 nm im ELISA-Reader (Microplate Reader Model 550, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) gemessen. Anhand der Standardkurve (Cubic Spline) und den Verdünnungsfaktoren berechnete ein Computerprogramm (Microplate Manager® 4.0, Bio-Rad Laboratories) die in den Proben vorhandenen TSP-1 Konzentrationen. Es wurden grundsätzlich Doppelbestimmungen durchgeführt.

### **2.4.2. Plättchenfaktor-4, β-Thromboglobulin und sP-Selektin**

PF-4, β-TG und sP-Selektin wurden mit Hilfe der folgenden ELISA-Testkits gemessen: Asserachrom® PF-4/β-TG (Diagnostica Stago, Asnières sur Seine, Frankreich); Parameter® human sP-Selectin (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA).

### Testablauf PF-4 und $\beta$ -TG:

Die Reagenzien und Lösungen wurden nach Packungsanleitung vorbereitet und verdünnt. Von den Patientenproben (Verdünnungsfaktoren PF-4 PRP 1:300 und PFP 1:2;  $\beta$ -TG 1:600 und 1:10), Standardlösungen (6,25 – 100 IU/ml bzw. 12,5 – 200 IU/ml) und Kontrolllösungen wurden je 200  $\mu$ l in die 96 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, die mit Anti-PF-4- bzw.  $\beta$ -TG-Antikörpern vom Kaninchen beschichtet war. In den Proben enthaltenes PF-4 bzw.  $\beta$ -TG bindet an diese Antikörper. Nach 1 h Inkubationszeit bei Raumtemperatur folgte 5maliges Waschen mit je 250  $\mu$ l Waschlösung. Dann wurden Peroxidase-markierte Anti-PF-4- bzw. Anti- $\beta$ -TG-Antikörpern (je 200  $\mu$ l Antikörper-POD-Konjugat) zugegeben, die Menge der so gebildeten Sandwich-Komplexe ist das Maß für den PF-4- bzw.  $\beta$ -TG-Gehalt der Probe. Nach 1 h Inkubation wurde im darauffolgenden Waschschrift das nicht gebundene POD-Konjugat entfernt. Das Substrat aus Harnstoffperoxid und o-Phenylendiamin wurde zugegeben (je 200  $\mu$ l), die Farbreaktion wurde nach exakt 3 min durch Zugabe einer Stopplösung (je 100  $\mu$ l 1 M Salzsäure) beendet. Nach 10 min Inkubation konnte die optische Dichte bei 492 nm im ELISA-Reader (s.o.) gemessen werden. Anhand der Standardkurve und den Verdünnungsfaktoren berechnete das Computerprogramm (s.o.) die in den Proben vorhandenen PF-4- bzw.  $\beta$ -TG-Konzentrationen. Es wurden grundsätzlich Doppelbestimmungen durchgeführt.

### Testablauf sP-Selektin:

Die Reagenzien und Lösungen wurden nach Packungsanleitung vorbereitet und verdünnt. Von den Patientenproben (Verdünnungsfaktor PRP und PFP 1:10), der Standardlösung (1,32 – 56,0 ng/ml) und Kontrolllösung wurden je 100  $\mu$ l in die 96 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, die mit Anti-sP-Selektin-Antikörpern von der Maus beschichtet war. In den Proben enthaltenes P-Selektin bindet an diese Antikörper. Direkt im Anschluss wurden 100  $\mu$ l Konjugat (Peroxidase-markierter Anti-sP-Selektin-Antikörper vom Schaf) zugegeben, die Menge der so gebildeten Sandwich-Komplexe ist das Maß für den sP-Selektin-Gehalt der Probe. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur

wurde im darauffolgenden Waschschrift (3maliges Waschen mit je 300  $\mu$ l Waschlösung) das nicht gebundene POD-Konjugat entfernt. Das Substrat Tetramethylbenzidin wurde nun zugegeben (je 100  $\mu$ l), nach 15 min wurde die Farbreaktion durch Zugabe einer Stopplösung (je 100  $\mu$ l) beendet. Die optische Dichte konnte innerhalb von 30 min bei 450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) im ELISA-Reader (s.o.) gemessen werden. Anhand der Standardkurve (Four Parameter Logistic) und den Verdünnungsfaktoren berechnete das Computerprogramm (s.o.) die in den Proben vorhandenen sP-Selektin-Konzentrationen. Es wurden grundsätzlich Doppelbestimmungen durchgeführt.

## 2.5. Aggregationsmessungen

### 2.5.1. Turbidometrische Aggregometrie

Die Messung der Thrombozytenaggregation erfolgte mit Hilfe eines Whole Blood Lumi-Aggregometers® (Chrono-log Corp., Havertown, USA), unter Zugabe der Gerinnungsagonisten ADP, Kollagen und U-46619 (TXA<sub>2</sub>-Rezeptoragonist). Die Methode der turbidometrischen (engl. turbidity: Trübheit, Dicke) Aggregometrie wurde von Born entwickelt (Born, 1962; O'Brien J.R., 1962) und beruht auf der Messung der optischen Dichte von PRP mit Hilfe von Infrarot-Licht und einem Photodioden-Detektor, der die Lichttransmission als elektrische Spannung registriert. Ein geeichtes Schreibgerät zeichnet die Messkurve auf skaliertem Papier auf. Da das PRP durch ein magnetisch angetriebenes Rührstäbchen kontinuierlich gerührt wird, lassen die aufgewirbelten Thrombozyten nur einen Teil des Lichtstrahls durch die Probe (geringe Transmission, Grundlinie bei 10%). PFP desselben Patienten, das sich in einer zweiten Messstelle befindet, weist keine Trübung durch Thrombozyten auf (hohe Transmission, Grundlinie bei 90%). Bei Zugabe von Gerinnungsagonisten zum PRP wird die Thrombozytenaggregation stimuliert, sodass sich größere Aggregate bilden und mehr Licht durch die Probe gelangt – die Transmission nimmt zu und wird als Kurve gegen die Zeit aufgezeichnet.

Als Gerinnungsagonisten wurden von uns ADP, Kollagen (Platelet Aggregation Reagents, Sigma Diagnostics, St.Louis, USA) und der TXA<sub>2</sub>-Rezeptoragonist U-46619 (Calbiochem®, San Diego, USA) verwendet, mit folgenden Verdünnungen bzw. Endkonzentrationen (EK):

**ADP-Lösung** 200 µmol/l → Zugeben von 5 µl zu 400µl PRP ergibt EK von 2,5 µmol/l, Zugeben von 10 µl zu 400 µl PRP ergibt EK von 5 µmol/l

**Kollagen-Lösung** 1 mg/ml → Verdünnung von 50 µl mit 200 µl Kollagen-Pufferlösung ergibt Konzentration von 2,5 µg/ml → weitere Verdünnung von 50 µl mit 200 µl Pufferlösung ergibt Konzentration von 0,5 µg/ml → Zugeben von jeweils 5 µl verdünnter Kollagen-Lösung zu 400 µl PRP ergibt EK von 30 ng/ml bzw. 6 ng/ml

**U-46619-Lösung** 3 mmol/l → Verdünnung von 5 µl mit 300 µl PBS-Puffer ergibt Konzentration von 50 µmol/l → Zugeben von 4 µl zu 400 µl PRP ergibt EK von 0,5 µmol/l, Zugeben von 8 µl zu 400 µl PRP ergibt EK von 1 µmol/l

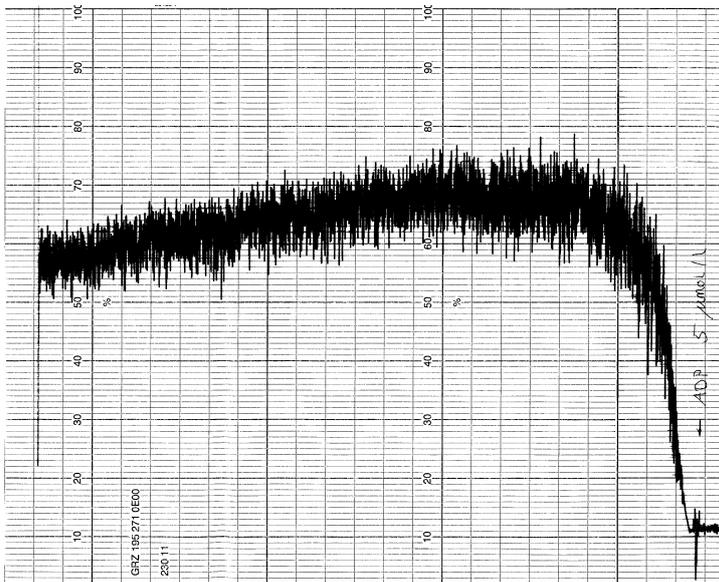
Testablauf:

Zuerst wurden die gelösten, gekühlt aufbewahrten Reagenzien ADP, Kollagen und U-46619 verdünnt (s.o.) und 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Vorwärmen des Aggregometers auf 37°C wurde in die Glasküvette der Messstelle „PRP“ zuerst ein teflonbeschichtetes Rührstäbchen gegeben und dann 400 µl PRP hineinpipettiert. In die Küvette der Messstelle „PPP“ (platelet poor plasma) wurden 450 µl PFP hineinpipettiert und der Deckel über den Messstellen geschlossen. Der Schalterknopf „Set Baselines“ musste einige Sekunden gedrückt werden, bis der Stift am Schreibergerät die PFP-Grundlinie bei 90% der Skala des Papiers zeichnete, sobald der Schalter gelöst wurde, wanderte der Stift automatisch auf 10% der Skala (PRP-Grundlinie). Der gewünschte Gerinnungsagonist wurde nach 90 s Inkubationszeit mit Druck in die PRP-Küvette hineinpipettiert, der Deckel wurde sofort wieder geschlossen. Nach 3-5 Minuten trat die maximale Aggregation ein, der Versuch konnte

beendet werden, sobald die Kurve wieder abfiel. Die prozentuale Transmissionszunahme konnte nun mit Hilfe der folgenden Formel berechnet werden:

$$T = \frac{x-10}{90-10} \times 100 = \frac{x-10}{80} \times 100$$

Dabei entspricht x dem auf der Skala abgelesenen Wert der maximalen Kurvenhöhe.



**Abb. 2.1.:** Beispielkurve Aggregometrie nach Born  
Die Zugabe von ADP (EK 5 µmol/l) ist markiert.

### 2.5.2. In-vitro-Blutungszeit

Das PFA-100® In Vitro Diagnostic System (Dade Behring, Deerfield, USA) ist ein automatisches Analysensystem zur Messung der primären Hämostasekapazität in Citrat-antikoaguliertem Vollblut. Die primäre Hämostasekapazität beschreibt die Bildung eines Blutpfropfes in vitro durch Thrombozytenadhäsion und -aggregation unter dem Einfluss von physiologischen Gerinnungsagonisten.

Das Gerät arbeitet nach dem von Kratzer und Born erstmals beschriebenen Prinzip zur Bestimmung der Blutungszeit in vitro (Kratzer et al., 1985). Die

Einweg-Messzellen werden vor Versuchsbeginn in das Gerät eingesetzt und mit 800 µl Vollblut befüllt. Sie enthalten eine Stahlkapillare, durch die das Blut unter definiertem Sog auf eine 150 µm große Öffnung in der mit Agonisten beschichteten Membran zuströmt. Durch hohe Scherkräfte und Kontakt mit der beschichteten Membran werden die Thrombozyten aktiviert und adhären an der Membranöffnung. Eine Messzelle ist mit Kollagen und Epinephrin (Adrenalin) (Koll/Epi), die andere mit Kollagen und ADP (Koll/ADP) beschichtet. Messgröße ist die Verschlusszeit in Sekunden, also die Zeit von Beginn des Blutflusses durch die Kapillare bis zum Zeitpunkt, an dem der Fluss durch Verschluss der Membranöffnung zusammenbricht. Die Referenzzeiten variieren je nach verwendetem Blutabnahmesystem. Bei der von uns benutzten S-Monovette® mit 3,2% (0,106M) ungepuffertem Natrium-Citrat als Antikoagulans liegen die Normbereiche bei 73-140s (Koll/Epi) und 63-106s (Koll/ADP) (Heilmann et al., 1997). Verlängerte Verschlusszeiten weisen auf eine eingeschränkte Thrombozytenfunktion hin, verkürzte Verschlusszeiten zeigen eine erhöhte Aktivierung der Thrombozyten an. Die Koll/Epi-Messzelle dient der Erfassung primärer Hämostasedefekte wie des von-Willebrand Syndroms und besonders der Erfassung erworbener Thrombozytendefekte durch Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern. Die Koll/ADP-Messzelle dient zur Differenzierung der verschiedenen Ursachen und liefert bei ASS-Einnahme normale Testergebnisse.

### **2.6. Statistische Auswertung**

Da sich mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Tests für die gewonnenen Daten eine Normalverteilung bestätigt hat, verwendeten wir zur statistischen Auswertung der verbundenen Stichproben den Student-t-Test (Microsoft Office Excel 2003). Trotz vorliegender Hinweise, dass die Zielparameter durch die Statingabe erniedrigt werden könnten, konnten wir eine Erhöhung der Parameter nicht ausschließen. Deshalb wurde der t-Test zweiseitig durchgeführt. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wählten wir  $\alpha=0,05$ .

Außerdem wurden die Zielparameter und die Routinelaborwerte durch Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) beschrieben (Microsoft Office Excel 2003).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Laborwerte

Die Kontrollparameter für die regelmäßige Medikamenteneinnahme (Gesamtcholesterin, LDL und CRP) veränderten sich nach 4-wöchiger Statintherapie wie erwartet. Das Gesamtcholesterin sank um  $28,0 \pm 13,2$  % (Mittelwert  $\pm$  SD; n=24), das LDL sank um  $38,4 \pm 13,7$  % (n=18, bei 6 Patienten konnte das LDL aus labortechnischen Gründen nicht bestimmt werden), CRP sank um  $48,2 \pm 26,0$  % (n=20, bei 3 Patienten stieg der Wert um  $>100$  %, was am ehesten infektbedingt war, bei einem Patienten wurde kein CRP bestimmt). Das HDL verhielt sich uneinheitlich, im Mittel sanken die Werte um  $4,5 \pm 14,9$  % (n=18, siehe LDL).

**A** = Ergebnisse vor Statingabe

**B** = Ergebnisse nach mindestens vierwöchiger Statingabe

| Parameter           | A               | B               | B-A              | p     |
|---------------------|-----------------|-----------------|------------------|-------|
| Cholesterin (mg/dl) | $227 \pm 32$    | $163 \pm 35$    | $-64 \pm 31$     | <0,01 |
| LDL (mg/dl)         | $160 \pm 29$    | $98 \pm 25$     | $-61 \pm 23$     | <0,01 |
| HDL (mg/dl)         | $52 \pm 7$      | $50 \pm 10$     | $-2 \pm 8$       | n.s.  |
| CRP (mg/dl)         | $0,64 \pm 0,40$ | $0,33 \pm 0,34$ | $-0,31 \pm 0,26$ | <0,01 |

**Tab. 3.1.:** Kontrollparameter Medikamenteneinnahme  
(Mittelwert  $\pm$  SD)

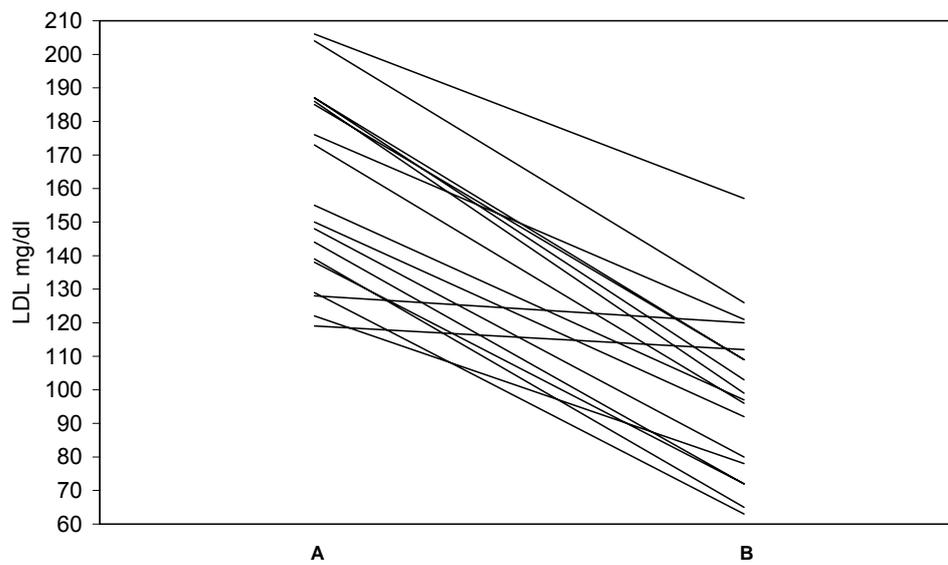


Diagramm 3.1.: LDL

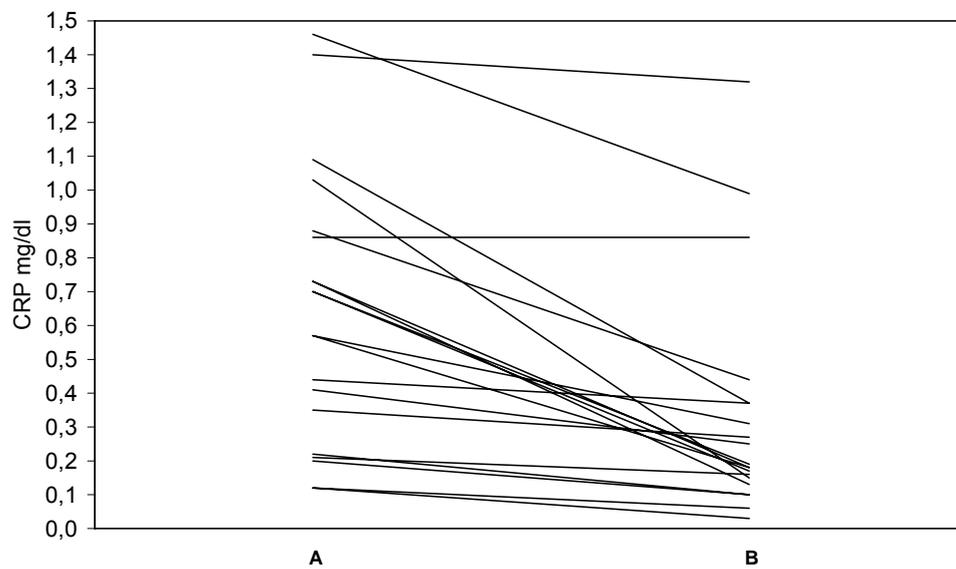


Diagramm 3.2.: CRP

Die Kontrollparameter für Kontraindikationen bzw. Nebenwirkungen der Statintherapie waren bis auf wenige Ausnahmen (Transaminasen-/CK-Erhöhung vor bzw. nach Therapiebeginn < zweifacher Normwert) unauffällig. Bei keinem Patienten stiegen nach Beginn der Statintherapie die Transaminasen auf die dreifache Norm oder die CK auf die fünffache Norm, was einen Therapieabbruch zur Folge gehabt hätte.

| <b>Parameter</b> |           | <b>A</b>   | <b>B</b>   | <b>B-A</b> | <b>p</b> |
|------------------|-----------|------------|------------|------------|----------|
| CK               | (U/l)     | 76 ± 49    | 81 ± 43    | 5 ± 23     | n.s.     |
| γ-GT             | (U/l)     | 20 ± 15    | 20 ± 15    | 0 ± 9      | n.s.     |
| GPT              | (U/l)     | 14 ± 6     | 14 ± 7     | 0 ± 5      | n.s.     |
| GOT              | (U/l)     | 12 ± 3     | 13 ± 5     | 1 ± 4      | n.s.     |
| LDH              | (U/l)     | 156 ± 30   | 159 ± 39   | 3 ± 28     | n.s.     |
| AP               | (U/l)     | 116 ± 32   | 114 ± 29   | -2 ± 21    | n.s.     |
| Gesamtbilirubin  | (mg/dl)   | 0,9 ± 0,2  | 0,8 ± 0,2  | -0,1 ± 0,2 | n.s.     |
| Kreatinin        | (mg/dl)   | 1,1 ± 0,1  | 1,1 ± 0,2  | 0,0 ± 0,2  | n.s.     |
| Harnstoff        | (mg/dl)   | 37 ± 8     | 36 ± 8     | -1 ± 9     | n.s.     |
| Hb               | (g/dl)    | 14,6 ± 1,4 | 14,2 ± 1,5 | -0,4 ± 0,8 | n.s.     |
| Thrombozyten     | (1000/μl) | 284 ± 82   | 274 ± 70   | -10 ± 49   | n.s.     |

**Tab. 3.2.:** Kontrollparameter Kontraindikationen und Nebenwirkungen  
(Mittelwert ± SD)

Die Gerinnungsparameter lagen bei fast allen Patienten im Normbereich. Bei einem Patienten, der den Vitamin-K-Antagonisten Phenprocoumon einnahm, waren die Quick-Werte mit 24 % (A) und 23 % (B) deutlich erniedrigt. Bei mehreren Patienten lagen die Fibrinogenwerte zwischen 410 und 600 mg/dl und damit oberhalb der Normgrenze.

| Parameter                    | A             | B             | B-A            | p    |
|------------------------------|---------------|---------------|----------------|------|
| Thrombozyten (1000/ $\mu$ l) | 284 $\pm$ 82  | 274 $\pm$ 70  | -10 $\pm$ 49   | n.s. |
| Quick (%)                    | 98 $\pm$ 23   | 100 $\pm$ 22  | 2 $\pm$ 19     | n.s. |
| PTT (s)                      | 29 $\pm$ 3    | 29 $\pm$ 2    | 0 $\pm$ 4      | n.s. |
| Fibrinogen (mg/dl)           | 381 $\pm$ 112 | 385 $\pm$ 92  | 5 $\pm$ 108    | n.s. |
| AT III (%)                   | 91 $\pm$ 10   | 96 $\pm$ 9    | 6 $\pm$ 9      | n.s. |
| D-Dimere ( $\mu$ g/ml)       | 0,6 $\pm$ 0,4 | 0,6 $\pm$ 0,4 | -0,1 $\pm$ 0,1 | n.s. |

**Tab. 3.3.:** Kontrollparameter Gerinnung  
(Mittelwert  $\pm$  SD)

### 3.2. Enzym-Immunoassays

#### 3.2.1. Thrombospondin-1

Der TSP-1-Gehalt/ $10^6$  Thrombozyten betrug 79,2  $\pm$  19,4 ng, nach Statingabe lagen die Werte bei 79,6  $\pm$  20,0 ng (n=24).

Die TSP-1-Konzentration im PFP betrug 661  $\pm$  237 ng/ml vor und 626  $\pm$  181 ng/ml nach Statingabe (n=23). Dies entspricht einem geringfügigen, nicht signifikanten Absinken um 35  $\pm$  201 ng/ml.

| Parameter                       | A               | B               | B - A          | p    |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|------|
| TSP-1/ $10^6$ Thrombozyten (ng) | 79,2 $\pm$ 19,4 | 79,6 $\pm$ 20,0 | 0,4 $\pm$ 18,2 | n.s. |
| TSP-1 im PFP (ng/ml)            | 661 $\pm$ 237   | 626 $\pm$ 181   | -35 $\pm$ 201  | n.s. |

**Tab. 3.4.:** TSP-1  
(Mittelwert  $\pm$  SD)

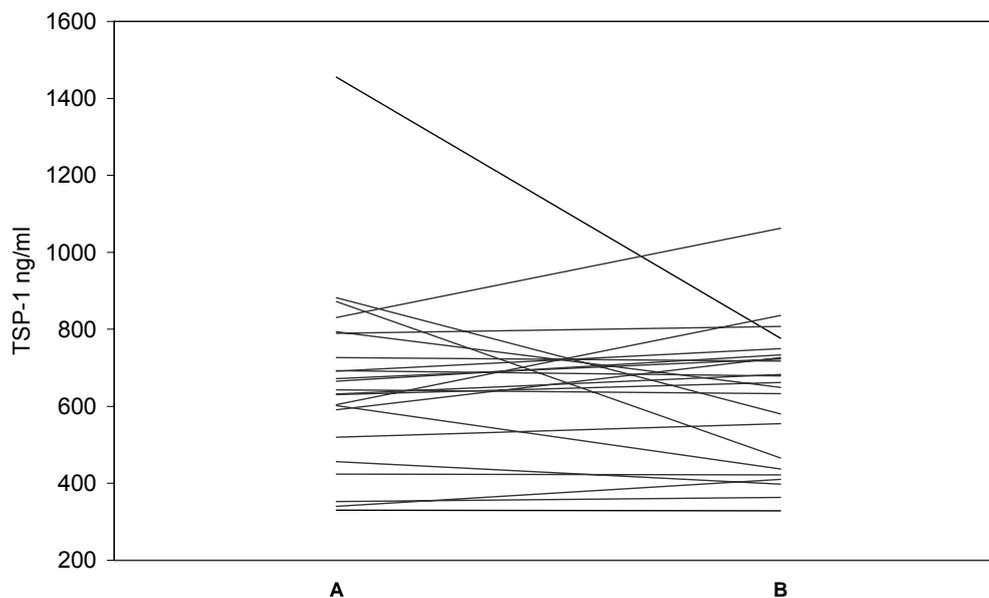


Diagramm 3.3.: TSP-1-Konzentration im PFP

### 3.2.2. Plättchenfaktor-4

Der PF-4-Gehalt/ $10^6$  Thrombozyten betrug  $15,0 \pm 6,4$  IU, nach Statingabe lagen die Werte bei  $17,8 \pm 5,0$  IU (n=20, bei 4 Patienten lagen die Werte außerhalb der Bestimmungsgrenzen des Tests). Dies entspricht einem Anstieg um  $2,8 \pm 4,9$  IU (p=0,02).

Die PF-4-Konzentration im PFP betrug  $6,4 \pm 3,5$  IU/ml vor und  $6,1 \pm 2,6$  IU/ml nach Statingabe (n=21, siehe oben).

| Parameter                      | A              | B              | B - A          | p    |
|--------------------------------|----------------|----------------|----------------|------|
| PF-4/ $10^6$ Thrombozyten (IU) | $15,0 \pm 6,4$ | $17,8 \pm 5,0$ | $2,8 \pm 4,9$  | 0,02 |
| PF-4 im PFP (IU/ml)            | $6,4 \pm 3,5$  | $6,1 \pm 2,6$  | $-0,3 \pm 2,4$ | n.s. |

Tab. 3.5.: PF-4  
(Mittelwert  $\pm$  SD)

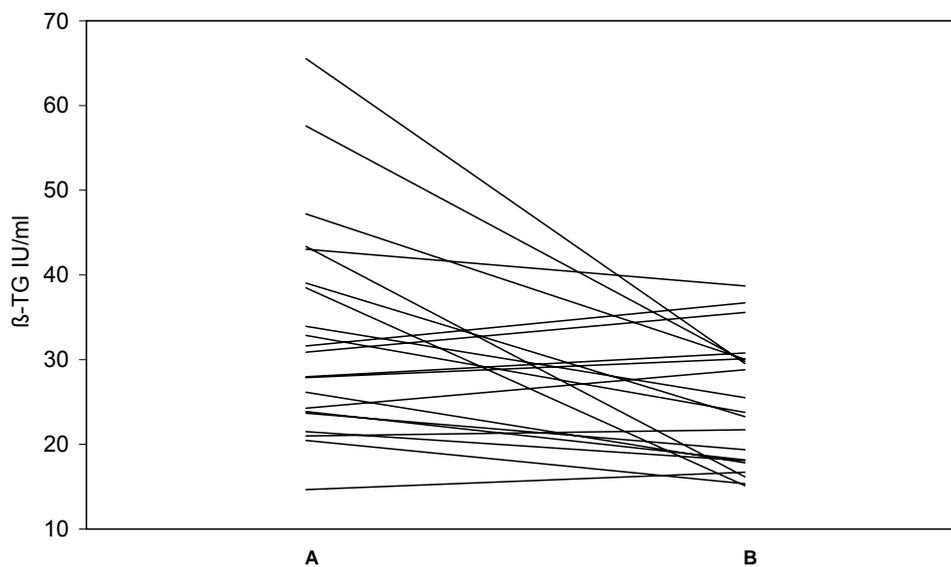
### 3.2.3. $\beta$ -Thromboglobulin

Der  $\beta$ -TG-Gehalt/ $10^6$  Thrombozyten betrug  $26,0 \pm 4,9$  IU, nach Statingabe lagen die Werte bei  $27,6 \pm 3,7$  IU (n=20, siehe PF-4).

Die  $\beta$ -TG-Konzentration im PFP betrug  $33,1 \pm 12,8$  IU/ml vor und  $24,8 \pm 7,5$  IU/ml nach Statingabe (n=21, siehe PF-4). Dies entspricht einem Absinken um  $8,3 \pm 12,0$  IU/ml (p=0,005).

| Parameter                             | A               | B              | B - A           | p     |
|---------------------------------------|-----------------|----------------|-----------------|-------|
| $\beta$ -TG/ $10^6$ Thrombozyten (IU) | $26,0 \pm 4,9$  | $27,6 \pm 3,7$ | $1,6 \pm 3,8$   | n.s.  |
| $\beta$ -TG im PFP (IU/ml)            | $33,1 \pm 12,8$ | $24,8 \pm 7,5$ | $-8,3 \pm 12,0$ | 0,005 |

**Tab. 3.6.:**  $\beta$ -TG  
(Mittelwert  $\pm$  SD)



**Diagramm 3.4.:**  $\beta$ -TG im PFP

### 3.2.4. sP-Selektin

Der sP-Selektin-Gehalt/ $10^6$  Thrombozyten betrug  $0,55 \pm 0,13$  ng, nach Statingabe lagen die Werte bei  $0,53 \pm 0,12$  ng (n=24).

Die sP-Selektin-Konzentration im PFP betrug  $49,1 \pm 13,9$  ng/ml vor und  $47,8 \pm 12,7$  ng/ml nach Statingabe (n=24).

| Parameter                                | A               | B               | B - A            | p    |
|--|-----------------|-----------------|------------------|------|
| sP-Selektin/ $10^6$<br>Thrombozyten (ng) | $0,55 \pm 0,13$ | $0,53 \pm 0,12$ | $-0,01 \pm 0,11$ | n.s  |
| sP-Selektin im PFP (ng/ml)               | $49,1 \pm 13,9$ | $47,8 \pm 12,7$ | $-1,4 \pm 4,9$   | n.s. |

**Tab. 3.7.:** sP-Selektin  
(Mittelwert  $\pm$  SD)

## 3.3. Aggregationsmessungen

### 3.3.1. Turbidometrische Aggregometrie

Die Messungen mit den Gerinnungsagonisten ADP und Kollagen wurden bei 10 Patienten, die Messungen mit dem  $TXA_2$ -Rezeptoragonisten U-46619 bei 6 Patienten durchgeführt.

Die Berechnung der Transmissionszunahme (T in%) nach der Formel

$$T = \frac{x-10}{80} \times 100 \quad \text{ergab folgende Werte:}$$

| Agonist  | EK         | A           | B           | B-A         | p    |
|----------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ADP      | 2,5 µmol/l | 52,1 ± 8,2  | 53,4 ± 5,9  | 1,3 ± 8,2   | n.s. |
| ADP      | 5 µmol/l   | 59,4 ± 11,9 | 60,4 ± 4,9  | 1,0 ± 12,8  | n.s. |
| Kollagen | 30 ng/ml   | 49,3 ± 13,6 | 47,9 ± 17,0 | -1,4 ± 22,5 | n.s. |
| Kollagen | 6 ng/ml    | 7,3 ± 6,7   | 10,8 ± 19,4 | 3,5 ± 16,5  | n.s. |
| U-46619  | 1 µmol/l   | 69,0 ± 1,8  | 67,9 ± 7,3  | -1,0 ± 7,6  | n.s. |
| U-46619  | 0,5 µmol/l | 58,8 ± 24,6 | 66,3 ± 7,9  | 7,5 ± 25,9  | n.s. |

**Tab. 3.8.:** Turbidometrische Aggregometrie  
(Mittelwert ± SD; EK = Endkonzentration des Agonisten)

### 3.3.2. In-vitro-Blutungszeit

Bei 9 Patienten wurde vor bzw. 4 Wochen nach Beginn der Statingabe die In-vitro-Blutungszeit bestimmt. Bei 4 Patienten war die Blutungszeit gemessen mit der Koll/Epi-Messzelle zum Zeitpunkt A im Normbereich (73-140 s) und zum Zeitpunkt B verlängert, bei insgesamt 5 von 9 Patienten war die Blutungszeit nach vierwöchiger Statintherapie länger als vor Therapiebeginn. Der Anstieg von  $24 \pm 61$  s war nicht signifikant.

Die Blutungszeit gemessen mit der Koll/ADP-Messzelle war nur bei einem von 8 Patienten pathologisch verlängert (Normbereich 63-106 s; n=8, bei einem Patienten wurde die Messung durch das Gerät mehrmals abgebrochen).

| Parameter |     | A        | B        | B-A     | p    |
|-----------|-----|----------|----------|---------|------|
| Koll/Epi  | (s) | 146 ± 71 | 170 ± 59 | 24 ± 61 | n.s. |
| Koll/ADP  | (s) | 73 ± 14  | 76 ± 23  | 3 ± 17  | n.s. |

**Tab. 3.9.:** In-vitro-Blutungszeit  
(Mittelwert ± SD)

### 4. Diskussion

Die Frage nach dem Einfluss einer mindestens vierwöchigen Statintherapie auf den TSP-1-Gehalt humaner Thrombozyten als mögliche Erklärung für eine statinbedingte Aggregationshemmung war der Ausgangspunkt für die vorliegende Studie. Bei den von uns untersuchten 24 Patienten wurde in der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen die Diagnose einer stabilen KHK gestellt und gleichzeitig eine Hypercholesterinämie mit LDL-Werten von über 100 mg/dl festgestellt. Deshalb wurde vom behandelnden Arzt ein lipophiles Statin – entweder Simvastatin oder Atorvastatin – verordnet.

Grundlage unserer Überlegung, den Effekt von Statinen auf den TSP-1-Gehalt humaner Thrombozyten zu untersuchen, waren Studien, die in vitro eine verminderte TSP-1-mRNA-Expression durch humane Gefäßmuskelzellen nach Statinbehandlung dieser Zellen belegen (Riessen et al., 1999; Siegel-Axel et al., 2003). Ob dieser Effekt auch unter therapeutischen Statindosierungen in vivo beobachtet werden kann, ist an humanen Gefäßmuskelzellen kaum zu untersuchen, da dafür Gefäßbiopsien nötig wären. Dies verbietet sich im Rahmen einer klinischen Studie aus ethischen Gründen. Die Untersuchung von Thrombozyten dagegen, die gespeichertes TSP-1 enthalten, lässt sich mit einer venösen Blutentnahme problemlos durchführen. Der thrombozytäre TSP-1-Gehalt spiegelt dabei die TSP-1-mRNA-Expression von Megakaryozyten wieder, aus denen in Knochenmark die zellkernlosen Thrombozyten gebildet werden. Angesichts der vielfältigen biologischen Effekte von TSP-1 im Bereich des Gerinnungssystems und der bisher ungeklärten Frage, über welchen Mechanismus Statine die Thrombozytenaggregation hemmen, ist die Untersuchung des Effekts von Statinen auf den TSP-1-Gehalt humaner Thrombozyten von möglicher klinischer Relevanz. Parallel wurden der PF-4-,  $\beta$ -TG- und sP-Selektin-Gehalt der Thrombozyten und der Plasmaspiegel aller vier Proteine gemessen, um so den Aktivierungszustand der Thrombozyten einschätzen zu können. Sollten die Plasmaspiegel sowohl von TSP-1 als auch der Kontrollparameter durch die Statintherapie beeinflusst werden, könnte dies

als Hinweis auf übergeordnete, TSP-1-unabhängige Mechanismen gewertet werden. Eine allgemeine Hemmung der Sekretion von Granulainhaltsstoffen würde zum Beispiel auf einen solchen Effekt hindeuten.

Der TSP-1-Gehalt/ $10^6$  Thrombozyten betrug vor Statingabe  $79,2 \pm 19,4$  ng und nach mindestens vierwöchiger Therapie  $79,6 \pm 20$  ng. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die lipophilen Statine Atorvastatin und Simvastatin keinen Einfluss auf die TSP-1-mRNA-Expression von Megakaryozyten und somit auf den TSP-1-Gehalt der  $\alpha$ -Granula zirkulierender Thrombozyten haben. Theoretisch könnten In-vitro-Untersuchungen an Megakaryozyten hilfreich sein, um verschiedene Statine und Dosierungen zu testen. Allerdings ist die Gewinnung und Untersuchung humaner Megakaryozyten sehr aufwändig.

Der  $\beta$ -TG- und sP-Selektin-Gehalt der Thrombozyten, sowie die Plasmaspiegel von TSP-1, PF-4 und sP-Selektin blieben nach Statintherapie weitgehend unverändert. Nur der PF-4-Gehalt/ $10^6$  Thrombozyten stieg geringfügig von  $15 \pm 6,4$  IU auf  $17,8 \pm 5$  IU ( $p=0,02$ ) und der  $\beta$ -TG-Plasmaspiegel sank von  $33,1 \pm 12,8$  IU/ml auf  $24,8 \pm 7,5$  IU/ml ( $p=0,005$ ). In der Literatur sind zum Teil gegensätzliche Daten zu finden, wie Statine auf thrombozytäre Aktivitätsmarker wirken. Für PF-4 gibt es kaum Studien, bei Mäusen allerdings wurden reduzierte PF-4- und  $\beta$ -TG-Plasmaspiegel nach 14tägiger Atorvastatinbehandlung nachgewiesen (Laufs et al., 2000). Der  $\beta$ -TG-Plasmaspiegel von Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie wurde durch Simvastatin (20 und 40 mg/d) in zwei Studien nicht beeinflusst (Broijersen et al., 1997; Undas et al., 2005). In einer Studie wurde eine moderate Reduktion von  $\beta$ -TG beschrieben (Bo et al., 1991). Die Statinwirkung auf P-Selektin ist gut untersucht, eine deutliche Reduktion sowohl des sP-Selektin-Plasmaspiegels als auch der P-Selektin-Oberflächenexpression auf Thrombozyten wurde nachgewiesen (Huhle et al., 1999; Kirk et al., 1999; Romano et al., 2000; Cha et al., 2004; Hwang et al., 2004; Bruni et al., 2005; Puccetti et al., 2005; Undas et al., 2005; Marschang et al., 2006). Eine plausible Erklärung dafür, dass dieser Effekt bei unseren Patienten nicht eingetreten ist, könnte die vorhergegangene

Medikation mit ASS oder Clopidogrel sein. Ferroni et al. konnten zeigen, dass ASS (100 mg/d) den sP-Selektin-Plasmaspiegel in vergleichbarem Umfang wie Simvastatin (20 mg/d) senkt (Ferroni et al., 2003). Clopidogrel senkt zumindest die thrombozytäre P-Selektin-Oberflächenexpression (Moshfegh et al., 2000; Seyfarth et al., 2002). Somit waren die sP-Selektin-Spiegel unserer Patienten eventuell schon vor der ersten Blutentnahme durch die eingenommenen Aggregationshemmer gesenkt. Zwei Studien ergaben erste Hinweise, dass eine Therapie mit ASS auch die thrombozytäre TSP-1-Oberflächenexpression und Freisetzung ins Plasma vermindert (Savi et al., 2000; Serebruany et al., 2004). Eine signifikante Beeinflussung von PF-4- oder  $\beta$ -TG-Plasmaspiegeln durch ASS oder Clopidogrel wurde bisher nicht nachgewiesen (Minar et al., 1988; Kamath et al., 2002).

Der von uns vor Statingabe gemessenen TSP-1-Gehalt von im Mittel  $79,2 \pm 19,4$  ng/ $10^6$  Thrombozyten entspricht in seiner Größenordnung denen, die von Dawes et al. und Kao et al. beschrieben wurden. In diesen Studien wurden bei gesunden Probanden  $89,1 \pm 28,3$  ng und 75 ng/ $10^6$  Thrombozyten gemessen (Dawes et al., 1983; Kao et al., 1986). Bergseth et al. fanden im Blutplasma gesunder Probanden mithilfe eines von dieser Gruppe erstmals beschriebenen Enzym-Immunoassays eine TSP-1-Konzentration von 43 ng/ml (Median) (Bergseth et al., 2000). In weiteren Studien wurden bei gesunden Probanden Mittelwerte zwischen 65 und 120 ng/ml beschrieben (Dawes et al., 1983; Kao et al., 1986; Ozcebe et al., 2002). Unsere Messungen von TSP-1 im PFP ergaben dagegen einen Mittelwert  $661 \pm 237$  ng/ml vor Statingabe und liegen somit 5- bis 12-fach über den beschriebenen Normwerten für Gesunde. Dieser Unterschied ließe sich durch eine gesteigerten Thrombozytenaktivierung und daraus folgende TSP-1-Freisetzung erklären. Möglich wäre aber ebenso eine gesteigerte TSP-1-Sekretion z.B. aus Gefäßmuskelzellen oder Endothelzellen. Gegen eine TSP-1-Freisetzung als Folge einer Thrombozytenaktivierung entweder artifiziell durch die Behandlung der Proben oder in vivo durch veränderte Bedingungen im Kreislaufsystem der Patienten, z.B. im Rahmen einer Arteriosklerose, spricht, dass die PF-4-,  $\beta$ -TG- und sP-Selektin-

Spiegel im plättchenfreien Plasma allenfalls gering erhöht waren. Ein Messfehler unsererseits ist unwahrscheinlich, da für die Bestimmung des TSP-1-Gehalts/10<sup>6</sup> Thrombozyten der gleiche Test verwendet wurde und dieser ein plausibles, mit anderen Studien vergleichbares Ergebnis lieferte. Somit könnte die isolierte Erhöhung der TSP-1-Plasmaspiegel als Hinweis auf eine vermehrte Sekretion z.B. aus Endothel- oder Gefäßmuskelzellen interpretiert werden. Leider war im Studiendesign keine Kontrollgruppe mit gesunden Probanden vorgesehen, so dass diese Ergebnisse nur unter Vorbehalt gesehen werden können.

Bisher wurden allerdings keine erhöhten TSP-1-Plasmaspiegel bei Patienten mit KHK oder Hypercholesterinämie beschrieben. Erhöhte TSP-1-Plasmaspiegel wurden jedoch bereits in verschiedenen Studien im Rahmen maligner Erkrankungen oder Vaskulitiden dokumentiert. Die dort beschriebenen TSP-1-Mittelwerte lagen zwischen 200 und 1000 ng/ml, je nach Studie und untersuchter Erkrankung (McCrohan et al., 1987; Tuszynski et al., 1992; Nathan et al., 1994; Yamashita et al., 1998; Ozcebe et al., 2002). Auch Typ I-Diabetiker zeigten gering erhöhte TSP-1-Spiegel von 137 ng/ml im Vergleich zu gesunden Probanden mit 91 ng/ml (Bayraktar et al., 1994). Unsere Ergebnisse legen somit nahe, dass TSP-1 als Plasmamarker für die KHK in Frage kommt. Allerdings sollten weitere Studien durchgeführt werden, in denen die TSP-1-Plasmaspiegel von gesunden Probanden, Patienten mit stabiler KHK und akutem Koronarsyndrom verglichen werden. Möglicherweise kann von der Höhe des TSP-1-Spiegels auf das Ausmaß der Koronararteriosklerose geschlossen werden, analog zu den Ergebnissen anderer Studien, die eine Korrelation zwischen erhöhten TSP-1-Spiegeln und der Aktivität der untersuchten Erkrankungen (gynäkologische maligne Tumoren und kolorektale Karzinome) zeigten (Nathan et al., 1994; Yamashita et al., 1998).

Die von uns gemessenen PF-4- und  $\beta$ -TG-Plasmaspiegel vor Statingabe betragen  $6,4 \pm 3,5$  IU/ml und  $33,1 \pm 12,8$  IU/ml. In den ELISA-Testanleitungen sind Normalwerte von 0-5 IU/ml und 10-40 IU/ml angegeben, damit liegen unsere Ergebnisse für PF-4 knapp über den Normalwerten und für  $\beta$ -TG im

oberen Normbereich. In anderen Studien werden für PF-4 und  $\beta$ -TG bei Patienten mit stabiler KHK Werte um 3-10 und 15-45 ng/ml bzw. IU/ml beschrieben (De Caterina et al., 1988; Mant et al., 1988; Soeki et al., 2000). Messungen mit Radioimmunoassay (Einheit ng/ml) oder ELISA (Einheit IU/ml) liefern insgesamt sehr gut vergleichbare Ergebnisse (Bellon et al., 1993). Unser Ergebnis für sP-Selektin im Plasma vor Statingabe lag mit  $48,4 \pm 13,2$  ng/ml im Bereich der Ergebnisse für Patienten mit stabiler KHK einiger andere Studien (Parker et al., 2001; Draz et al., 2003; Senen et al., 2005). In der Testanleitung sind Normwerte von 20-44 ng/ml angegeben. In weiteren Studien wurden dagegen deutlich höhere Werte für alle drei Parameter gemessen, sowohl bei Gesunden als auch bei KHK-Patienten (Romuk et al., 2002; Guray et al., 2004; Tutluoglu et al., 2005). Insgesamt zeigten sich also in unserer Studie Werte für die drei übrigen Marker der Thrombozytenaktivierung im bzw. knapp über dem oberen Normbereich.

Eine gesteigerte Thrombozytenaktivierung bei Patienten mit Arteriosklerose ist bereits in anderen Studien beschrieben worden. Zum Beispiel zeigten Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie eine PF-4- und  $\beta$ -TG-Erhöhung im Plasma, vermehrte Ausscheidung von  $\text{TXA}_2$  -Metaboliten im Urin und gesteigerte Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation im Vergleich zu gesunden Probanden (Zahavi et al., 1981; Tremoli et al., 1984; Schror et al., 1989; Davi et al., 1992). Patienten mit instabiler KHK und erhöhtem LDL wiesen ebenfalls eine  $\beta$ -TG-Erhöhung im Plasma auf (Butkiewicz et al., 2003). De Caterina et al. fanden heraus, dass PF-4 und  $\beta$ -TG unabhängig von einer Hypercholesterinämie im Plasma von Patienten mit instabiler KHK signifikant erhöht sind, nicht aber bei Patienten mit stabiler KHK (De Caterina et al., 1988). Dagegen zeigte sich, dass sP-Selektin im Plasma bei instabiler KHK im Vergleich zu stabiler KHK erhöht ist, ebenso bei stabiler KHK im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (Parker et al., 2001; Draz et al., 2003; Guray et al., 2004; Senen et al., 2005). Somit scheint von den thrombozytären Proteinen, die bei Aktivierung aus den  $\alpha$ -Granula sezerniert werden, bisher nur sP-Selektin als Marker sowohl für instabile als auch für stabile KHK geeignet.

In einem Subkollektiv dieser Studie untersuchten wir den Effekt der Statintherapie auf die Thrombozytenaggregation. Allerdings nahmen 23 der Patienten schon vor Einschluss in die Studie aus klinischer Indikation aggregationshemmende Medikamente ein (ASS, Clopidogrel oder beide kombiniert), ein Patient nahm Phenprocoumon als Antikoagulanz ein. Deshalb war die Messung der Thrombozytenaggregation in vitro nur stark eingeschränkt interpretierbar. Aus diesem Grund wurde dieser methodisch sehr aufwändige Teil der Studie nach 10 Patienten beendet, zumal die aggregationshemmende Wirkung einer reinen Statintherapie bereits in verschiedenen Studien belegt wurde (siehe Einleitung). Trotzdem sollen die Ergebnisse hier kurz diskutiert werden.

Zur Kontrolle der Thrombozytenaggregation führten wir in dem Subkollektiv von 10 Patienten die turbidometrische Aggregometrie nach Born durch und bestimmten bei 9 Patienten die In-vitro-Blutungszeit. Als Gerinnungsagonisten für die Aggregometrie verwendeten wir ADP, Kollagen und den TXA<sub>2</sub>-Rezeptoragonist U-46619. Die Messung der In-vitro-Blutungszeit wurde mit zwei verschieden beschichteten Messzellen durchgeführt (Kollagen/Epinephrin und Kollagen/ADP). Welchen Einfluss die eingenommenen Aggregationshemmer auf diese Versuche hatten, wird verständlich, wenn man den Wirkungsmechanismus von ASS und Clopidogrel betrachtet (Gawaz, 1999):

ASS führt zu einer irreversiblen, dosisabhängigen Hemmung der Zyklooxygenase (im Thrombozyten Isoenzym COX-1) und damit der TXA<sub>2</sub>-Synthese aus Arachidonsäure. Die Thrombozytenaktivierung wird nicht direkt gehemmt, aber die normalerweise aus der TXA<sub>2</sub>-Freisetzung folgende Sekretion und Vasokonstriktion. Bei Kollagen-stimulierten Thrombozyten stellt die TXA<sub>2</sub>-Sekretion neben der GPIIb-IIIa-Aktivierung den Hauptmechanismus dar, deshalb ist besonders die Kollagen-induzierte Aggregation gehemmt (um etwa 70% bei 100 mg ASS/d). Die Adrenalin (Epinephrin)-induzierte Aggregation wird ebenfalls gehemmt. In geringerem Maß wird die ADP-induzierte Aggregation beeinflusst, da Arachidonsäurefreisetzung und daraus

folgende TXA<sub>2</sub>-Synthese nur einer von vielen Mechanismen ist, über die ADP-Rezeptoren die Aggregation stimulieren.

Clopidogrel wirkt als irreversibler Antagonist an einem der drei verschiedenen thrombozytären ADP-Rezeptoren, dem P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor (P2Y<sub>AC</sub>). Dieser senkt normalerweise über Inhibition der Adenylatzyklase den cAMP-Spiegel im Thrombozyten. Somit wird unter anderem die durch ADP vermittelte GPIIb-IIIa-Aktivierung blockiert, daraus resultiert die Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation (Geiger et al., 1999).

Diese Wirkungsmechanismen machen deutlich, dass weder Kollagen- noch ADP-stimulierte turbidometrische Aggregometrie dazu geeignet sind, bei Patienten unter ASS- und/oder Clopidogrel-Medikation eine Aggregationshemmung durch Statine zu untersuchen. Die Ergebnisse für den TXA<sub>2</sub>-Rezeptoragonisten U-46619 zeigten jedoch ebenfalls keinen eindeutigen Trend. Die In-vitro-Blutungszeit gemessen mit der Koll/Epi-Messzelle sollte unter ASS-Medikation verlängert sein, während die Koll/ADP-Messzelle unter ASS meist normale Blutungszeiten liefert (Mammen et al., 1998). Die Ergebnisse gemessen mit der Koll/ADP-Messzelle scheinen durch Clopidogrel nicht beeinflusst zu werden (Geiger et al., 2005). Unsere Messungen zeigten nur bei 4 von 8 Patienten, die ASS einnahmen, eine verlängerte Blutungszeit (Koll/Epi-Messzelle). Allerdings lagen uns keine Daten zum Vergleich mit Werten vor Beginn der ASS-Einnahme vor. Auch bei diesen Messungen war bezüglich der Statintherapie kein eindeutiger Trend erkennbar.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie kein Effekt einer Statintherapie auf den TSP-1-Gehalt der Thrombozyten bzw. den TSP-1-Spiegel im Plasma gezeigt werden. Auch andere Marker der Thrombozytenaktivierung wie PF-4,  $\beta$ -TG und sP-Selektin wurden nicht oder nur geringfügig beeinflusst. Auffallend war jedoch eine deutliche Erhöhung der TSP-1-Plasmaspiegel bei den KHK-Patienten im Vergleich zu Normwerten gesunder Probanden, während die Plasmaspiegel der anderen Marker der Thrombozytenaktivierung allenfalls diskret erhöht waren. Es ist daher denkbar, dass die erhöhten TSP-1-Spiegel durch eine vermehrte Sekretion aus arteriosklerotisch veränderten Gefäßzellen

bedingt sind und dass der TSP-1-Plasmaspiegel somit als systemischer Marker für eine Arteriosklerose dienen könnte. Diese Hypothese bedarf jedoch der Bestätigung durch eine eigens darauf ausgerichtete Studie.

### 5. Zusammenfassung

Die medikamentöse Behandlung mit Statinen senkt die Mortalität von Patienten mit KHK signifikant. Neben der Cholesterinsenkung werden zur Zeit verschiedene pleiotrope Statineffekte untersucht, die dazu beitragen könnten. Die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch lipophile Statine wie Atorvastatin und Simvastatin wurde in mehreren Studien nachgewiesen, der zugrunde liegende Mechanismus ist aber noch nicht genau aufgeklärt.

TSP-1, ein Glykoprotein aus der Familie der Thrombospondine, wird von Thrombozyten, Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Monozyten und Fibroblasten sezerniert. TSP-1 erfüllt verschiedene Funktionen, z.B. als wichtiger Kofaktor der Blutgerinnung, besonders der Thrombozytenaggregation. Erhöhte TSP-1-Plasmaspiegel werden unter anderem als Marker für eine gesteigerte Thrombozytenaktivierung angesehen.

Lipophile Statine vermindern *in vitro* selektiv die Expression von TSP-1 durch humane Gefäßmuskelzellen, während die Expression von anderen extrazellulären Matrixmolekülen unbeeinflusst bleibt. Der vermutete Mechanismus dafür ist die durch HMG-CoA-Reduktase-Hemmung verminderte Aktivierung der Rho-Kinase. Unter therapeutischen Statindosierungen *in vivo* lässt sich dieser Effekt aber nur schwer nachweisen. Die vorliegende Studie sollte nun untersuchen, ob unter einer Therapie mit lipophilen Statinen der TSP-1-Gehalt humaner Thrombozyten ebenfalls gesenkt wird. Parallel dazu wurden als Kontrollparameter die Thrombozytenproteine PF-4,  $\beta$ -TG, sP-Selektin bestimmt.

Wir untersuchten 24 Patienten mit stabiler KHK, bei denen die Indikation zur Therapie mit Statinen gegeben war und führten vor Therapiebeginn mit Atorvastatin oder Simvastatin und nach mindestens vierwöchiger Therapie eine venöse Blutentnahme durch. Die Zielparameter TSP-1, PF-4,  $\beta$ -TG und sP-Selektin bestimmten wir mittels ELISA. Bei einem Subkollektiv von 10 Patienten untersuchten wir außerdem die Thrombozytenaggregation durch turbidometrische Aggregometrie und Bestimmung der In-vitro-Blutungszeit.

Die mindestens vierwöchige Therapie mit Atorvastatin oder Simvastatin hatte keinen Einfluss auf den thrombozytären TSP-1-,  $\beta$ -TG- und sP-Selektin-Gehalt, sowie auf die Plasmaspiegel von TSP-1, PF-4 und sP-Selektin. Wir stellten nur einen geringfügigen Anstieg des thrombozytären PF-4-Gehaltes und ein Absinken des  $\beta$ -TG-Plasmaspiegels um im Mittel 25 % fest. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die TSP-1-mRNA-Expression in Megakaryozyten und somit der TSP-1-Gehalt der  $\alpha$ -Granula zirkulierender Thrombozyten nicht von lipophilen Statinen beeinflusst wird.

Der TSP-1-Plasmaspiegel der untersuchten KHK-Patienten war mit  $661 \pm 237$  ng/ml deutlich, d.h. 5-12 mal erhöht verglichen mit den Plasmaspiegeln gesunder Probanden in anderen Studien. Die PF-4-,  $\beta$ -TG- und sP-Selektin-Plasmaspiegel unserer Patienten entsprachen denen, die für KHK-Patienten bisher veröffentlicht wurden und lagen allenfalls gering über den Normwerten gesunder Probanden. Die Erklärung dafür könnte eine gesteigerte TSP-1-Sekretion aus arteriosklerotisch veränderten Gefäßmuskelzellen oder Endothelzellen sein. Dieser Befund bedarf allerdings der Bestätigung durch eine auf diese Fragestellung ausgerichtete weitere Studie.

Die in verschiedenen Studien nachgewiesene Aggregationshemmung durch Statine war in unsere Studie aufgrund der klinisch indizierten aggregationshemmenden Begleitmedikation mit ASS und/oder Clopidogrel leider nicht suffizient zu beurteilen.

Zusammenfassend fand sich in dieser Studie kein Hinweis für die Hypothese, dass lipophile Statine bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung in therapeutischer Dosierung den TSP-1-Gehalt von Thrombozyten bzw. die TSP-1-Plasmaspiegel verringern.

### 6. Abkürzungen

|        |  |
|--------|--|
| β-TG   | β-Thromboglobulin                          |
| γ-GT   | γ-Glutamyl-Transferase                     |
| μg     | Mikrogramm                                 |
| μl     | Mikroliter                                 |
| μm     | Mikrometer                                 |
| μmol   | Mikromol                                   |
| ADP    | Adenosindiphosphat                         |
| AP     | Alkalische Phosphatase                     |
| ASS    | Azetylsalizylsäure                         |
| AT III | Antithrombin III                           |
| CD     | Cluster of differentiation                 |
| CD40-L | CD40-Ligand                                |
| CK     | Kreatinkinase                              |
| COX-1  | Zyklooxygenase-1                           |
| CRP    | C-reaktives Protein                        |
| CTAD   | Zitrat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol |
| dl     | Deziliter                                  |
| DNS    | Desoxyribonukleinsäure                     |
| EDTA   | Ethylendiamintetraessigsäure               |
| EGF    | Epidermal growth factor                    |
| EIA    | Enzym-Immunoassay                          |
| EK     | Endkonzentration                           |
| ELISA  | Enzyme-linked immunosorbent assay          |
| EMIT   | Enzyme-multiplied immunotechnique          |
| Epi    | Epinephrin                                 |
| EZM    | Extrazelluläre Matrix                      |
| g      | Gramm                                      |
| GOT    | Glutamat-Oxalacetat-Transaminase           |
| GP     | Glykoprotein                               |
| GPT    | Glutamat-Pyruvat-Transaminase              |

|            |   |
|------------|---|
| GTP        | Guanosintriphosphat                         |
| h          | Stunde(n)                                   |
| Hb         | Hämoglobinkonzentration                     |
| HDL        | High density lipoprotein                    |
| HMG-CoA    | Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A             |
| IAP        | Integrin associated protein                 |
| ICAM-1     | Intercellular adhesion molecule-1           |
| IL-1/-6/-8 | Interleukin-1/-6/-8                         |
| IU         | International Units                         |
| KHK        | Koronare Herzkrankheit                      |
| Koll       | Kollagen                                    |
| l          | Liter                                       |
| LDH        | Laktat-Dehydrogenase                        |
| LDL        | Low density lipoprotein                     |
| MCP-1      | Monocyte chemoattractant protein-1          |
| MCSF       | Macrophage colony stimulating factor        |
| mg         | Milligramm                                  |
| min        | Minute(n)                                   |
| ml         | Milliliter                                  |
| MMP        | Matrix-Metalloproteinasen                   |
| mRNA       | messenger-Ribonukleinsäure                  |
| n          | Anzahl                                      |
| NADP       | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotidphosphat |
| NADPH      | Hydrierte Form von NADP                     |
| ng         | Nanogramm                                   |
| nm         | Nanometer                                   |
| NO         | Stickstoffmonoxid (Nitric oxide)            |
| n.s.       | nicht signifikant                           |
| oxLDL      | oxidiertes LDL                              |
| p          | p-Wert                                      |
| PAI-1      | Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1           |
| PDGF       | Platelet derived growth factor              |

|                  |   |
|------------------|---|
| PF-4             | Plättchenfaktor-4                       |
| PFP              | Plättchenfreies Plasma                  |
| POD              | Peroxidase                              |
| PRP              | Plättchenreiches Plasma                 |
| PTT              | Partielle Thromboplastinzeit            |
| rpm              | revolutions per minute                  |
| SD               | Standardabweichung                      |
| sek              | Sekunde(n)                              |
| sP-Selektin      | soluble P-Selektin                      |
| T                | Transmission                            |
| TGF- $\beta$     | Transforming growth factor- $\beta$     |
| TIMP-2           | Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 |
| TNF- $\alpha$    | Tumornekrosefaktor- $\alpha$            |
| TSP-1/-2/-5      | Thrombospondin-1/-2/-5                  |
| TXA <sub>2</sub> | Thromboxan A <sub>2</sub>               |
| VCAM-1           | Vascular cell adhesion molecule-1       |
| vWF              | von-Willebrand-Faktor                   |

## 7. Literaturverzeichnis

4 S Group (1994)

Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S).  
Lancet, 344, 1383-1389

Asch, A.S., Silbiger, S., Heimer, E., Nachman, R.L. (1992)

Thrombospondin sequence motif (CSVTCG) is responsible for CD36 binding.  
Biochem Biophys Res Commun, 182, 1208-1217

Aviram, M., Hussein, O., Rosenblat, M., Schlezinger, S., Hayek, T., Keidar, S. (1998)

Interactions of platelets, macrophages, and lipoproteins in hypercholesterolemia: antiatherogenic effects of HMG-CoA reductase inhibitor therapy.  
J Cardiovasc Pharmacol, 31, 39-45

Axel, D.I., Riessen, R., Runge, H., Viebahn, R., Karsch, K.R. (2000)

Effects of cerivastatin on human arterial smooth muscle cell proliferation and migration in transfilter cocultures.  
J Cardiovasc Pharmacol, 35, 619-629

Baenziger, N.L., Brodie, G.N., Majerus, P.W. (1971)

A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes.  
Proc Natl Acad Sci USA, 68, 240-243

Baldassarre, D., Mores, N., Colli, S., Pazzucconi, F., Sirtori, C.R., Tremoli, E. (1997)

Platelet alpha 2-adrenergic receptors in hypercholesterolemia: relationship between binding studies and epinephrine-induced platelet aggregation.  
Clin Pharmacol Ther, 61, 684-691

Balk, E.M., Lau, J., Goudas, L.C., Jordan, H.S., Kupelnick, B., Kim, L.U., Karas, R.H. (2003)

Effects of statins on nonlipid serum markers associated with cardiovascular disease: a systematic review.  
Ann Intern Med, 139, 670-682

Banyai, S., Banyai, M., Falger, J., Jansen, M., Alt, E., Derfler, K., Koppensteiner, R. (2001)

Atorvastatin improves blood rheology in patients with familial hypercholesterolemia (FH) on long-term LDL apheresis treatment.  
Atherosclerosis, 159, 513-519

Bayraktar, M., Dundar, S., Kirazli, S., Teletar, F. (1994)

Platelet factor 4, beta-thromboglobulin and thrombospondin levels in type I diabetes mellitus patients.  
J Int Med Res, 22, 90-94

Bellon, J.L., Castellanos, C., Acevedo, L., Amiral, J. (1993)

Measurement of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 to follow up patients with artificial heart valves.  
Semin Thromb Hemost, 19 Suppl 1, 178-182

Bellosta, S., Via, D., Canavesi, M., Pfister, P., Fumagalli, R., Paoletti, R., Bernini, F. (1998)

HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol, 18, 1671-1678

- Bergseth, G., Lappegard, K.T., Videm, V., Molossi, S. (2000)  
A novel enzyme immunoassay for plasma thrombospondin. Comparison with beta-thromboglobulin as platelet activation marker in vitro and in vivo.  
*Thromb Res*, 99, 41-50
- Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., Frank, J.S., Demer, L.L., Edwards, P.A., Watson, A.D., Lusis, A.J. (1995)  
Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics.  
*Circulation*, 91, 2488-2496
- Biegelsen, E.S., Loscalzo, J. (1999)  
Endothelial function and atherosclerosis.  
*Coron Artery Dis*, 10, 241-256
- Bo, M., Bonino, F., Neirotti, M., Gottero, M., Pernigotti, L., Molaschi, M., Fabris, F. (1991)  
Hemorheologic and coagulative pattern in hypercholesterolemic subjects treated with lipid-lowering drugs.  
*Angiology*, 42, 106-113
- Bonnefoy, A., Hantgan, R., Legrand, C., Frojmovic, M.M. (2001)  
A model of platelet aggregation involving multiple interactions of thrombospondin-1, fibrinogen, and GPIIb/IIIa receptor.  
*J Biol Chem*, 276, 5605-5612
- Born, G.V. (1962)  
Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal.  
*Nature*, 194, 927-929
- Bornstein, P., Sage, E.H. (1994)  
Thrombospondins.  
*Methods Enzymol*, 245, 62-85
- Bornstein, P. (2001)  
Thrombospondins as matricellular modulators of cell function.  
*J Clin Invest*, 107, 929-933
- Boukerche, H., McGregor, J.L. (1988)  
Characterization of an anti-thrombospondin monoclonal antibody (P8) that inhibits human blood platelet functions. Normal binding of P8 to thrombin-activated Glanzmann thrombasthenic platelets.  
*Eur J Biochem*, 171, 383-392
- Boyle, J.J. (1997)  
Association of coronary plaque rupture and atherosclerotic inflammation.  
*J Pathol*, 181, 93-99
- Brandt, E., Petersen, F., Ludwig, A., Ehlert, J.E., Bock, L., Flad, H.D. (2000)  
The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation.  
*J Leukoc Biol*, 67, 471-478
- Broijerssen, A., Eriksson, M., Leijd, B., Angelin, B., Hjendahl, P. (1997)  
No influence of simvastatin treatment on platelet function in vivo in patients with hypercholesterolemia.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, 273-278

- Broijersen, A., Hamsten, A., Eriksson, M., Angelin, B., Hjendahl, P. (1998)  
Platelet activity in vivo in hyperlipoproteinemia--importance of combined hyperlipidemia.  
*Thromb Haemost*, 79, 268-275
- Bruni, F., Pasqui, A.L., Pastorelli, M., Bova, G., Cercignani, M., Palazzuoli, A., Sawamura, T., Auteri, A., Puccetti, L. (2005)  
Different effect of statins on platelet oxidized-LDL receptor (CD36 and LOX-1) expression in hypercholesterolemic subjects.  
*Clin Appl Thromb Hemost*, 11, 417-428
- Butkiewicz, A.M., Kemon, H., Dymicka-Piekarska, V., Bychowski, J. (2003)  
Beta-thromboglobulin and platelets in unstable angina.  
*Kardiol Pol*, 58, 449-455
- Casey, P.J. (1995)  
Protein lipidation in cell signaling.  
*Science*, 268, 221-225
- Cha, J.K., Jeong, M.H., Kim, J.W. (2004)  
Statin reduces the platelet P-selectin expression in atherosclerotic ischemic stroke.  
*J Thromb Thrombolysis*, 18, 39-42
- Chung, J., Gao, A.G., Frazier, W.A. (1997)  
Thrombospondin acts via integrin-associated protein to activate the platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3.  
*J Biol Chem*, 272, 14740-14746
- Chung, J., Wang, X.Q., Lindberg, F.P., Frazier, W.A. (1999)  
Thrombospondin-1 acts via IAP/CD47 to synergize with collagen in  $\alpha$ 2 $\beta$ 1-mediated platelet activation.  
*Blood*, 94, 642-648
- Corsini, A., Mazzotti, M., Raiteri, M., Soma, M.R., Gabbiani, G., Fumagalli, R., Paoletti, R. (1993)  
Relationship between mevalonate pathway and arterial myocyte proliferation: in vitro studies with inhibitors of HMG-CoA reductase.  
*Atherosclerosis*, 101, 117-126
- Crisby, M., Nordin-Fredriksson, G., Shah, P.K., Yano, J., Zhu, J., Nilsson, J. (2001)  
Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization.  
*Circulation*, 103, 926-933
- Davi, G., Aversa, M., Catalano, I., Barbagallo, C., Ganci, A., Notarbartolo, A., Ciabattoni, G., Patrono, C. (1992)  
Increased thromboxane biosynthesis in type IIa hypercholesterolemia.  
*Circulation*, 85, 1792-1798
- Dawes, J., Pumphrey, C.W., McLaren, K.M., Prowse, C.V., Pepper, D.S. (1982)  
The in vivo release of human platelet factor 4 by heparin.  
*Thromb Res*, 27, 65-76

- Dawes, J., Clementson, K.J., Gogstad, G.O., McGregor, J., Clezardin, P., Prowse, C.V., Pepper, D.S. (1983)  
A radioimmunoassay for thrombospondin used in a comparative study of thrombospondin, thromboglobulin and platelet factor 4 in healthy volunteers.  
*Thromb Res*, 29, 569-581
- De Caterina, R., Gazzetti, P., Mazzone, A., Marzilli, M., L'Abbate, A. (1988)  
Platelet activation in angina at rest. Evidence by paired measurement of plasma beta-thromboglobulin and platelet factor 4.  
*Eur Heart J*, 9, 913-922
- Deuel, T.F., Senior, R.M., Chang, D., Griffin, G.L., Henrikson, R.L., Kaiser, E.T. (1981)  
Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes.  
*Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 4584-4587
- Dorahy, D.J., Thorne, R.F., Fecondo, J.V., Burns, G.F. (1997)  
Stimulation of platelet activation and aggregation by a carboxyl-terminal peptide from thrombospondin binding to the integrin-associated protein receptor.  
*J Biol Chem*, 272, 1323-1330
- Downs, J.R., Clearfield, M., Weis, S., Whitney, E., Shapiro, D.R., Beere, P.A., Langendorfer, A., Stein, E.A., Kruyer, W., Gotto, A.M., Jr. (1998)  
Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study.  
*Jama*, 279, 1615-1622
- Draz, N., Hamdy, M.S., Gomaa, Y., Ramzy, A.A. (2003)  
Soluble P-selectin is a marker of plaque destabilization in unstable angina.  
*Egypt J Immunol*, 10, 83-87
- Dujovne, C.A., Harris, W.S., Altman, R., Overhiser, R.W., Black, D.M. (2000)  
Effect of atorvastatin on hemorheologic-hemostatic parameters and serum fibrinogen levels in hyperlipidemic patients.  
*Am J Cardiol*, 85, 350-353
- Dunlop, L.C., Skinner, M.P., Bendall, L.J., Favaloro, E.J., Castaldi, P.A., Gorman, J.J., Gamble, J.R., Vadas, M.A., Berndt, M.C. (1992)  
Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein.  
*J Exp Med*, 175, 1147-1150
- Endemann, G., Stanton, L.W., Madden, K.S., Bryant, C.M., White, R.T., Protter, A.A. (1993)  
CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein.  
*J Biol Chem*, 268, 11811-11816
- Endo, A., Tsujita, Y., Kuroda, M., Tanzawa, K. (1977)  
Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase.  
*Eur J Biochem*, 77, 31-36
- Endo, Y., Mamiya, S., Satoh, M., Takahashi, K., Harada, T. (1981)  
Plasma beta-thromboglobulin and platelet factor 4 in patients with chronic renal failure and effect of hemodialysis.  
*Tohoku J Exp Med*, 135, 349-358

- Eto, M., Kozai, T., Cosentino, F., Joch, H., Luscher, T.F. (2002)  
Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways.  
*Circulation*, 105, 1756-1759
- Ferroni, P., Martini, F., Cardarello, C.M., Gazzaniga, P.P., Davi, G., Basili, S. (2003)  
Enhanced interleukin-1beta in hypercholesterolemia: effects of simvastatin and low-dose aspirin.  
*Circulation*, 108, 1673-1675
- Fuster, V. (1995)  
Elucidation of the role of plaque instability and rupture in acute coronary events.  
*Am J Cardiol*, 76, 24C-33C
- Garg, U.C., Hassid, A. (1989)  
Nitric oxide-generation vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells.  
*JCI*, 83, 1774-1777
- Gawaz, M., Neumann, F.J., Dickfeld, T., Koch, W., Laugwitz, K.L., Adelsberger, H., Langenbrink, K., Page, S., Neumeier, D., Schomig, A., Brand, K. (1998)  
Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells.  
*Circulation*, 98, 1164-1171
- Gawaz, M. (1999)  
Das Blutplättchen.  
Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag
- Geiger, J., Brich, J., Honig-Liedl, P., Eigenthaler, M., Schanzenbacher, P., Herbert, J.M., Walter, U. (1999)  
Specific impairment of human platelet P2Y(AC) ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 2007-2011
- Geiger, J., Teichmann, L., Grossmann, R., Aktas, B., Steigerwald, U., Walter, U., Schinzel, R. (2005)  
Monitoring of clopidogrel action: comparison of methods.  
*Clin Chem*, 51, 957-965
- Geng, Y.-J., Libby, P. (1995)  
Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme.  
*Am J Pathol*, 147, 251-266
- Goldberg, I.D., Stemerman, M.B., Handin, R.I. (1980)  
Vascular permeation of platelet factor 4 after endothelial injury.  
*Science*, 209, 611-612
- Goldstein, J.L., Brown, M.S. (1990)  
Regulation of mevalonate pathway.  
*Nature*, 343, 425-430

- Guray, U., Erbay, A.R., Guray, Y., Yilmaz, M.B., Boyaci, A.A., Sasmaz, H., Korkmaz, S., Kutuk, E. (2004)  
Levels of soluble adhesion molecules in various clinical presentations of coronary atherosclerosis.  
*Int J Cardiol*, 96, 235-240
- Guyton, J.R., Klemp, K.F. (1996)  
Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16, 4-11
- Hamburger, S.A., Mcever, R.P. (1990)  
GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils.  
*Blood*, 75, 550-554
- Hatanaka, T., Honda, S., Sasaki, S., Katayama, K., Koizumi, T. (1998)  
Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation for tissue-selective inhibition of cholesterol synthesis by pravastatin.  
*J Pharmacokinet Biopharm*, 26, 329-347
- Heilmann, E.J., Kundu, S.K., Sio, R., Garcia, C., Gomez, R., Christie, D.J. (1997)  
Comparison of four commercial citrate blood collection systems for platelet function analysis by the PFA-100 system.  
*Thromb Res*, 87, 159-164
- Henn, V., Slupsky, J.R., Grafe, M., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Muller-Berghaus, G., Kroczeck, R.A. (1998)  
CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells.  
*Nature*, 391, 591-594
- Hernandez-Perera, O., Perez-Sala, D., Navarro-Antolin, J., Sanchez-Pascuala, R., Hernandez, G., Diaz, C., Lamas, S. (1998)  
Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells.  
*J Clin Invest*, 101, 2711-2719
- Hochgraf, E., Levy, Y., Aviram, M., Brook, J.G., Cogan, U. (1994)  
Lovastatin decreases plasma and platelet cholesterol levels and normalizes elevated platelet fluidity and aggregation in hypercholesterolemic patients.  
*Metabolism*, 43, 11-17
- Holvoet, P., Collen, D. (1997)  
Thrombosis and atherosclerosis.  
*Curr Opin Lipidol*, 8, 320-328
- Hsu-Lin, S., Berman, C.L., Furie, B.C., August, D., Furie, B. (1984)  
A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets.  
*J Biol Chem*, 259, 9121-9126
- Huhle, G., Abletshauser, C., Mayer, N., Weidinger, G., Harenberg, J., Heene, D.L. (1999)  
Reduction of platelet activity markers in type II hypercholesterolemic patients by a HMG-CoA-reductase inhibitor.  
*Thromb Res*, 95, 229-234

- Hwang, Y.S., Tsai, W.C., Lu, Y.H., Lin, C.C., Chen, Y.F. (2004)  
Effect of atorvastatin on the expression of CD40 ligand and P-selectin on platelets in patients with hypercholesterolemia.  
*Am J Cardiol*, 94, 364-366
- Jaffe, E.A., Ruggiero, J.T., Leung, L.K., Doyle, M.J., Mckeown-Longo, P.J., Mosher, D.F. (1983)  
Cultured human fibroblasts synthesize and secrete thrombospondin and incorporate it into extracellular matrix.  
*Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 998-1002
- Jaffe, E.A., Ruggiero, J.T., Falcone, D.J. (1985)  
Monocytes and macrophages synthesize and secrete thrombospondin.  
*Blood*, 65, 79-84
- Jurk, K., Clemetson, K.J., De Groot, P.G., Brodde, M.F., Steiner, M., Savion, N., Varon, D., Sixma, J.J., Van Aken, H., Kehrel, B.E. (2003)  
Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor.  
*Faseb J*, 17, 1490-1492
- Kamath, S., Blann, A.D., Chin, B.S., Lip, G.Y. (2002)  
A prospective randomized trial of aspirin-clopidogrel combination therapy and dose-adjusted warfarin on indices of thrombogenesis and platelet activation in atrial fibrillation.  
*J Am Coll Cardiol*, 40, 484-490
- Kannel, W.B., Castelli, W.P., Gordon, T., Mcnamara, P.M. (1971)  
Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study.  
*Ann Intern Med*, 74, 1-12
- Kao, K.J., Klein, P.A. (1986)  
A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of plasma thrombospondin.  
*Am J Clin Pathol*, 86, 317-323
- Kaplan, K.L., Owen, J. (1981)  
Plasma levels of  $\beta$ -thromboglobulin and platelet factor-4 as indices of platelet activation in vivo.  
*Blood*, 57, 199-202
- Kehrel, B., Flicker, E., Wigbels, B., Osterfeld, M., Van De Loo, J., Luscher, E.F. (1996)  
Thrombospondin measured in whole blood-an indicator of platelet activation.  
*Blood Coagul Fibrinolysis*, 7, 202-205
- Kempen, H.J., Vermeer, M., De Wit, E., Havekes, L.M. (1991)  
Vastatins inhibit cholesterol ester accumulation in human monocyte-derived macrophages.  
*Arterioscler Thromb*, 11, 146-153
- Kirk, G., McLaren, M., Muir, A.H., Stonebridge, P.A., Belch, J.J. (1999)  
Decrease in P-selectin levels in patients with hypercholesterolaemia and peripheral arterial occlusive disease after lipid-lowering treatment.  
*Vasc Med*, 4, 23-26
- Kleiner, D.E., Stetler-Stevenson, W.G. (1993)  
Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteinases.  
*Curr Opin Cell Biol*, 5, 891-897

- Kratzer, M.A., Born, G.V. (1985)  
Simulation of primary haemostasis in vitro.  
Haemostasis, 15, 357-362
- Kristensen, S.D., Ravn, H.B., Falk, E. (1997)  
Insights into the pathophysiology of unstable coronary artery disease.  
Am J Cardiol, 80, 5E-9E
- La Rosa, J.C., He, J., Vupputuri, S. (1999)  
Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials.  
Jama, 282, 2340-2346
- Laufs, U., La Fata, V., Plutzky, J., Liao, J.K. (1998)  
Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors.  
Circulation, 97, 1129-1135
- Laufs, U., Gertz, K., Huang, P., Nickenig, G., Bohm, M., Dirnagl, U., Endres, M., Vaughan, C.J. (2000)  
Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice.  
Stroke, 31, 2442-2449
- Lawler, J., Slayter, H.S., Coligan, J.E. (1978)  
Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets.  
J Biol Chem, 253, 8609-8616
- Lawler, J., Hynes, R.O. (1986)  
The structure of human thrombospondin: an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins.  
J Cell Biol, 103, 1635-1648
- Le Quan Sang, K.H., Levenson, J., Megnien, J.L., Simon, A., Devynck, M.A. (1995)  
Platelet cytosolic Ca<sup>2+</sup> and membrane dynamics in patients with primary hypercholesterolemia. Effects of pravastatin.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol, 15, 759-764
- Lee, R.T., Libby, P. (1997)  
The unstable atheroma.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol, 17, 1859-1867
- LIPID Study Group (1998)  
Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels.  
N Engl J Med, 339, 1349-1357
- Liuzzo, G., Biasucci, L.M., Gallimore, J.R., Grillo, R.L., Rebuzzi, A.G., Pepys, M.B., Maseri, A. (1994)  
The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina.  
N Engl J Med, 331, 417-424
- MAAS Investigators (1994)  
Effect of simvastatin on coronary atheroma: the Multicentre Anti-Atheroma Study (MAAS).  
Lancet, 344, 633-638

- Majack, R.A., Cook, S.C., Bornstein, P. (1985)  
Platelet-derived growth factor and heparin-like glycosaminoglycans regulate thrombospondin synthesis and deposition in the matrix by smooth muscle cells.  
*J Cell Biol*, 101, 1059-1071
- Majack, R.A., Milbrandt, J., Dixit, V.M. (1987)  
Induction of thrombospondin mRNA in rat aortic smooth muscle cells by PDGF.  
*J Biol Chem*, 262, 8821-8826
- Mammen, E.F., Comp, P.C., Gosselin, R., Greenberg, C., Hoots, W.K., Kessler, C.M., Larkin, E.C., Liles, D., Nugent, D.J. (1998)  
PFA-100 system: a new method for assessment of platelet dysfunction.  
*Semin Thromb Hemost*, 24, 195-202
- Mant, M.J., Kappagoda, C.T., Taylor, R.F., Quinlan, J.E. (1988)  
Transcoronary platelet activation and consumption in coronary artery disease: studies at rest.  
*Thromb Res*, 50, 201-211
- Marschang, P., Friedrich, G.J., Dittbacher, H., Stoeger, A., Nedden, D.Z., Kirchmair, R., Dienstl, A., Pachinger, O., Patsch, J.R. (2006)  
Reduction of soluble P-selectin by statins is inversely correlated with the progression of coronary artery disease.  
*Int J Cardiol*, 106, 183-190
- Mayer, J., Eller, T., Brauer, P., Solleder, E.M., Schafer, R.M., Keller, F., Kochsiek, K. (1992)  
Effects of long-term treatment with lovastatin on the clotting system and blood platelets.  
*Ann Hematol*, 64, 196-201
- McCrohan, M.B., Huang, S.W., Sleasman, J.W., Klein, P.A., Kao, K.J. (1987)  
Plasma thrombospondin as an indicator of intravascular platelet activation in patients with vasculitis.  
*Thromb Haemost*, 58, 850-852
- McEver, R.P., Beckstead, J.H., Moore, K.L., Marshall-Carlson, L., Bainton, D.F. (1989)  
GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies.  
*J Clin Invest*, 84, 92-99
- McGregor, J.L., Catimel, B., Parmentier, S., Clezardin, P., Dechavanne, M., Leung, L.L. (1989)  
Rapid purification and partial characterization of human platelet glycoprotein IIIb. Interaction with thrombospondin and its role in platelet aggregation.  
*J Biol Chem*, 264, 501-506
- McPherson, J., Sage, H., Bornstein, P. (1981)  
Isolation and characterization of a glycoprotein secreted by aortic endothelial cells in culture. Apparent identity with platelet thrombospondin.  
*J Biol Chem*, 256, 11330-11336
- Miano, J.M., Vlastic, N., Tota, R.R., Stemerman, M.B. (1993)  
Smooth muscle cell immediate-early gene and growth factor activation follows vascular injury. A putative in vivo mechanism for autocrine growth.  
*Arteriosclerosis Thromb.*, 13, 211-219

- Minar, E., Ehringer, H., Jung, M., Koppensteiner, R., Stumpflen, A. (1988)  
Lack of influence of low-dose acetylsalicylic acid (100 mg daily) on platelet survival time, beta-thromboglobulin and platelet factor 4 in patients with peripheral arterial occlusive disease.  
*Thromb Res*, 52, 219-226
- Mosher, D.F., Doyle, M.J., Jaffe, E.A. (1982)  
Synthesis and secretion of thrombospondin by cultured human endothelial cells.  
*J Cell Biol*, 93, 343-348
- Moshfegh, K., Redondo, M., Julmy, F., Wuillemin, W.A., Gebauer, M.U., Haeberli, A., Meyer, B.J. (2000)  
Antiplatelet effects of clopidogrel compared with aspirin after myocardial infarction: enhanced inhibitory effects of combination therapy.  
*J Am Coll Cardiol*, 36, 699-705
- Mumby, S.M., Raugi, G.J., Bornstein, P. (1984)  
Interactions of thrombospondin with extracellular matrix proteins: selective binding to type V collagen.  
*J Cell Biol*, 98, 646-652
- Munro, E., Patel, M., Chan, P., Betteridge, L., Clunn, G., Gallagher, K., Hughes, A., Schachter, M., Wolfe, J., Sever, P. (1994)  
Inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by lovastatin: the role of isoprenoid intermediates of cholesterol synthesis.  
*Eur J Clin Invest*, 24, 766-772
- Musial, J., Undas, A., Gajewski, P., Jankowski, M., Sydor, W., Szczeklik, A. (2001)  
Anti-inflammatory effects of simvastatin in subjects with hypercholesterolemia.  
*Int J Cardiol*, 77, 247-253
- Nathan, F.E., Hernandez, E., Dunton, C.J., Treat, J., Switalska, H.I., Joseph, R.R., Tuszynski, G.P. (1994)  
Plasma thrombospondin levels in patients with gynecologic malignancies.  
*Cancer*, 73, 2853-2858
- Negre-Aminou, P., Van Vliet, A.K., Van Erck, M., Van Thiel, G.C.F., Van Leeuwen, R.E.W., Cohen, L.H. (1997)  
Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors; comparison with other cell types.  
*Biochim Biophys Acta*, 1345, 259-268
- Notarbartolo, A., Davi, G., Averna, M., Barbagallo, C.M., Ganci, A., Giammarresi, C., La Placa, F.P., Patrono, C. (1995)  
Inhibition of thromboxane biosynthesis and platelet function by simvastatin in type IIa hypercholesterolemia.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15, 247-251
- O'Brien, J.R. (1962)  
Platelet aggregation: Part I Some effects of the adenosine phosphates, thrombin, and cocaine upon platelet adhesiveness.  
*J Clin Pathol*, 15, 446-452
- Ozcebe, O.I., Karakus, S., Haznedaroglu, I.C., Goker, H., Kosar, A., Kocoglu, H., Buyukasik, Y., Sayinalp, N., Kirazli, S. (2002)  
Plasma thrombospondin in immune thrombocytopenic purpura.  
*J Int Med Res*, 30, 52-55

- Parker, C., 3rd, Vita, J.A., Freedman, J.E. (2001)  
Soluble adhesion molecules and unstable coronary artery disease.  
*Atherosclerosis*, 156, 417-424
- Patel, M.K., Lymn, J.S., Clunn, G.F., Hughes, A.D. (1997)  
Thrombospondin-1 is a potent mitogen and chemoattractant for human vascular smooth muscle cells.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, 2107-2114
- Paulowitsch, S.A. (2005)  
Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP, Thrombospondin-5) in humanen glatten Muskelzellen: in vitro Untersuchungen zur Expression im Vergleich zu Thrombospondin-1.  
Dissertation aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
- Puccetti, L., Sawamura, T., Pasqui, A.L., Pastorelli, M., Auteri, A., Bruni, F. (2005)  
Atorvastatin reduces platelet-oxidized-LDL receptor expression in hypercholesterolaemic patients.  
*Eur J Clin Invest*, 35, 47-51
- Radomski, M.W., Moncada, S. (1991)  
Biological role of nitric oxide in platelet function.  
In: Moncada, S., Higgs, S., Berrazueta, J. (eds)  
Clinical relevance of nitric oxide in the cardiovascular system.  
Madrid: EDICOMPLET, 46-56
- Raines, E.W. (2004)  
PDGF and cardiovascular disease.  
*Cytokine Growth Factor Rev*, 15, 237-254
- Raugi, G.J., Mullen, J.S., Bark, D.H., Okada, T., Mayberg, M.R. (1990)  
Thrombospondin deposition in rat carotid artery injury.  
*Am J Pathol*, 137, 179-185
- Reihner, E., Rudling, M., Stahlberg, D., Berglund, L., Ewerth, S., Bjorkhem, I., Einarsson, K., Angelin, B. (1990)  
Influence of pravastatin, a specific inhibitor of HMG-CoA reductase, on hepatic metabolism of cholesterol.  
*N Engl J Med*, 323, 224-228
- Riessen, R., Kearney, M., Lawler, J., Isner, J.M. (1998)  
Immunolocalization of thrombospondin-1 in human atherosclerotic and restenotic arteries.  
*Am Heart J*, 135, 357-364
- Riessen, R., Axel, D., Fenchel, M., Herzog, U.U., Roßmann, H., Karsch, K.R. (1999)  
Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on extracellular matrix expression in human vascular smooth muscle cells.  
*Basic Res Cardiol*, 94, 322-332
- Riessen, R., Fenchel, M., Chen, H., Axel, D.I., Karsch, K.R., Lawler, J. (2001)  
Cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) is expressed by human vascular smooth muscle cells.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 47-54
- Rogler, G., Lackner, K.J., Schmitz, G. (1995)  
Mevalonate is essential for growth of porcine and human vascular smooth muscle cells in vitro.  
*Basic Res Cardiol*, 90, 443-450

- Romano, M., Mezzetti, A., Marulli, C., Ciabattini, G., Febo, F., Di Lenno, S., Roccaforte, S., Vigneri, S., Nubile, G., Milani, M., Davi, G. (2000)  
Fluvastatin reduces soluble P-selectin and ICAM-1 levels in hypercholesterolemic patients: role of nitric oxide.  
J Investig Med, 48, 183-189
- Romuk, E., Skrzep-Poloczek, B., Wojciechowska, C., Tomasik, A., Birkner, E., Wodniecki, J., Gabrylewicz, B., Ochala, A., Tendera, M. (2002)  
Selectin-P and interleukin-8 plasma levels in coronary heart disease patients.  
Eur J Clin Invest, 32, 657-661
- Ross, R., Glomset, J., Kariya, B., Harker, L. (1974)  
A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro.  
Proc Natl Acad Sci USA, 71, 1207-1210
- Ross, R. (1986)  
The pathogenesis of atherosclerosis - an update.  
N Engl J Med, 314, 488-500
- Ross, R. (1999)  
Atherosclerosis - An inflammatory disease.  
N Engl J Med, 340, 115-126
- Rossouw, J.E. (1995)  
Lipid-lowering interventions in angiographic trials.  
Am J Cardiol, 76, 86C-92C
- Sacks, F.M., Pfeffer, M.A., Moye, L.A., Rouleau, J.L., Rutherford, J.D., Cole, T.G., Brown, L., Warnica, J.W., Arnold, J.M.O., Wun, C.C., Davis, B.R., Braunwald, E. (1996)  
The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators.  
N Engl J Med, 335, 1001-1009
- Savi, P., Bernat, A., Lale, A., Roque, C., Zamboni, G., Herbert, J.M. (2000)  
Effect of aspirin on platelet desaggregation induced by SR121566, a potent GP-IIb/IIIa antagonist.  
Platelets, 11, 43-48
- Schorr, K., Lobel, P., Steinhagen-Thiessen, E. (1989)  
Simvastatin reduces platelet thromboxane formation and restores normal platelet sensitivity against prostacyclin in type IIa hypercholesterolemia.  
Eicosanoids, 2, 39-45
- Schwartz, S.M., Deblois, D., O'brien, E.R.M. (1995)  
The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis.  
Circ Res, 77, 445-465
- Seasholtz, T.M., Brown, J.H. (2004)  
RHO SIGNALING in Vascular Diseases.  
Mol Interv, 4, 348-357

- Senen, K., Ileri, M., Alper, A., Yetkin, F., Atak, R., Hisar, I., Yetkin, E., Turhan, H., Bardakci, H., Demirkan, D. (2005)  
Increased levels of soluble adhesion molecules E-selectin and P-selectin in patients with cardiac syndrome X.  
*Angiology*, 56, 273-277
- Senior, R.M., Griffin, G.L., Huang, J.S., Walz, D.A., Deuel, T.F. (1983)  
Chemotactic activity of platelet alpha granule proteins for fibroblasts.  
*J Cell Biol*, 96, 382-385
- Serebruany, V.L., Malinin, A.I., Oshrine, B.R., Sane, D.C., Takserman, A., Atar, D., Hennekens, C.H. (2004)  
Lack of uniform platelet activation in patients after ischemic stroke and choice of antiplatelet therapy.  
*Thromb Res*, 113, 197-204
- Seyfarth, H.J., Kokschi, M., Roethig, G., Rother, T., Neugebauer, A., Klein, N., Pfeiffer, D. (2002)  
Effect of 300- and 450-mg clopidogrel loading doses on membrane and soluble P-selectin in patients undergoing coronary stent implantation.  
*Am Heart J*, 143, 118-123
- Shepherd, J., Cobbe, S.M., Ford, I., Isles, C.G., Lorimer, A.R., Macfarlane, P.W., Mckillop, J.H., Packard, C.J. (1995)  
Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West Of Scotland Coronary Prevention Study Group.  
*N Engl J Med*, 333, 1301-1307
- Siegel-Axel, D.I., Runge, H., Seipel, L., Riessen, R. (2003)  
Effects of cerivastatin on human arterial smooth muscle cell growth and extracellular matrix expression at varying glucose and low-density lipoprotein levels.  
*J Cardiovasc Pharmacol*, 41, 422-433
- Soeki, T., Tamura, Y., Fukuda, N., Ito, S. (2000)  
Plasma and platelet plasminogen activator inhibitor-1 in patients with acute myocardial infarction.  
*Jpn Circ J*, 64, 547-553
- Stry, H.C., Blankenhorn, D.H., Chandler, A.B., Glagov, S., Insull, W., Richardson, M., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W. (1992)  
A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions.  
*Circulation*, 85, 391-405
- Stry, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W. (1994)  
A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis.  
*Circulation*, 89, 2462-2478
- Stry, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R.W. (1995)  
A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histologic classification of atherosclerosis.  
*Circulation*, 92, 1355-1374
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., Witztum, J.L. (1989)  
Beyond cholesterol: Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity.  
*N Engl J Med*, 320, 915-924

- Toschi, V., Gallo, R., Lettino, M., Fallon, J.T., Gertz, S.D., Fernandez-Ortiz, A., Chesebro, J.H., Badimon, L., Nemerson, Y., Fuster, V., Badimon, J.J. (1997)  
Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques.  
*Circulation*, 95, 594-599
- Tremoli, E., Maderna, P., Colli, S., Morazzoni, G., Sirtori, M., Sirtori, C.R. (1984)  
Increased platelet sensitivity and thromboxane B2 formation in type-II hyperlipoproteinaemic patients.  
*Eur J Clin Invest*, 14, 329-333
- Trumel, C., Plantavid, M., Levy-Toledano, S., Ragab, A., Caen, J.P., Aguado, E., Malissen, B., Payrastre, B. (2003)  
Platelet aggregation induced by the C-terminal peptide of thrombospondin-1 requires the docking protein LAT but is largely independent of alphaIIb/beta3.  
*J Thromb Haemost*, 1, 320-329
- Tuszynski, G.P., Rothman, V.L., Murphy, A., Siegler, K., Knudsen, K.A. (1988)  
Thrombospondin promotes the aggregation of platelets.  
*Prog Clin Biol Res*, 283, 211-217
- Tuszynski, G.P., Smith, M., Rothman, V.L., Capuzzi, D.M., Joseph, R.R., Katz, J., Besa, E.C., Treat, J., Switalska, H.I. (1992)  
Thrombospondin levels in patients with malignancy.  
*Thromb Haemost*, 67, 607-611
- Tutluoglu, B., Gurel, C.B., Ozdas, S.B., Musellim, B., Erturan, S., Anakkaya, A.N., Kilinc, G., Ulutin, T. (2005)  
Platelet function and fibrinolytic activity in patients with bronchial asthma.  
*Clin Appl Thromb Hemost*, 11, 77-81
- Undas, A., Brummel, K.E., Musial, J., Mann, K.G., Szczeklik, A. (2001)  
Simvastatin Depresses Blood Clotting by Inhibiting Activation of Prothrombin, Factor V, and Factor XIII and by Enhancing Factor Va Inactivation.  
*Circulation*, 103, 2248-2253
- Undas, A., Celinska-Lowenhoff, M., Domagala, T.B., Iwaniec, T., Dropinski, J., Lowenhoff, T., Szczeklik, A. (2005)  
Early antithrombotic and anti-inflammatory effects of simvastatin versus fenofibrate in patients with hypercholesterolemia.  
*Thromb Haemost*, 94, 193-199
- Van-Zanten, G.H., De-Graaf, S., Slootweg, P.J., Heijnen, H.F., Connolly, T.M., De-Groot, P.G., Sixma, J.J. (1994)  
Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries.  
*J Clin Invest*, 93, 615-632
- Vaughan, C.J., Gotto, A.M., Basson, C.T. (2000)  
The evolving role of statins in the management of atherosclerosis.  
*J Am Coll Cardiol*, 35, 1-10
- Wang, T.D., Chen, W.J., Lin, J.W., Cheng, C.C., Chen, M.F., Lee, Y.T. (2003)  
Efficacy of fenofibrate and simvastatin on endothelial function and inflammatory markers in patients with combined hyperlipidemia: relations with baseline lipid profiles.  
*Atherosclerosis*, 170, 315-323

- Weyrich, A.S., McIntyre, T.M., Mcever, R.P., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A. (1995)  
Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation.  
J Clin Invest, 95, 2297-2303
- Weyrich, A.S., Elstad, M.R., Mcever, R.P., McIntyre, T.M., Moore, K.L., Morrissey, J.H., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A. (1996)  
Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes.  
J Clin Invest, 97, 1525-1534
- Wight, T.N., Raugi, G.J., Mumby, S.M., Bornstein, P. (1985)  
Light microscopic immunolocalization of thrombospondin secretion in human tissues.  
J Histochem Cytochem, 33, 295-302
- Wong, B., Lumma, W.C., Smith, A.M., Sisko, J.T., Wright, S.D., Cai, T.Q. (2001)  
Statins suppress THP-1 cell migration and secretion of matrix metalloproteinase 9 by inhibiting geranylgeranylation.  
J Leukoc Biol, 69, 959-962
- WOSCOPS Group (1998)  
Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS).  
Circulation, 97, 1440-1445
- Yabkowitz, R., Mansfield, P.J., Ryan, U.S., Suchard, S.J. (1993)  
Thrombospondin mediates migration and potentiates platelet-derived growth factor-dependent migration of calf pulmonary artery smooth muscle cells.  
J Cell Physiol, 157, 24-32
- Yamashita, Y., Kurohiji, T., Tuszynski, G.P., Sakai, T., Shirakusa, T. (1998)  
Plasma thrombospondin levels in patients with colorectal carcinoma.  
Cancer, 82, 632-638
- Zahavi, J., Betteridge, J.D., Jones, N.A., Galton, D.J., Kakkar, V.V. (1981)  
Enhanced in vivo platelet release reaction and malondialdehyde formation in patients with hyperlipidemia.  
Am J Med, 70, 59-64

## 8. Anhang

### Patienteninformation zur Studie:

#### *„Effekt von Statinen auf den Thrombospondin-1-Gehalt humaner Thrombozyten“*

**Prüfarzt:**

PD Dr. med. Reimer Riessen, Med. Klinik, Tel.: 07071/29-82712

**Prüfzentrum:**

Universitätsklinikum Tübingen  
Medizinische Klinik und Poliklinik  
Abt. Innere Medizin III (Kardiologie)  
Otfried-Müller-Straße 10  
72076 Tübingen

Liebe Patientin, lieber Patient,

erhöhte Cholesterinspiegel sind eine wesentliche Ursache für die Ausbildung einer arteriosklerotischen Gefäßerkrankung z.B. am Herzen. Durch eine cholesterinsenkende Behandlung mit Medikamenten aus der Gruppe der Statine (z.B. Sortis<sup>®</sup>, Lipobay<sup>®</sup>, Mevinacor<sup>®</sup>, Zocor<sup>®</sup>) kann das Risiko einen Herzinfarkt zu erleiden oder an einer koronaren Herzerkrankung zu versterben um ca. 30% gesenkt werden. Ihr behandelnder Arzt hat Ihnen daher solch ein Medikament aus der Gruppe der Statine verschrieben.

Bislang ist nicht eindeutig geklärt, ob die Statine ihren günstigen Effekt nur über die Senkung des Cholesterins entfalten, oder ob noch andere Wirkungsmechanismen beteiligt sind, die z.B. das Wachstum der Blutgefäßzellen oder die Blutgerinnung betreffen. Wir haben in Zellkulturuntersuchungen nachweisen können, dass Statine auch die Bildung von Bindegewebsmolekülen wie Thrombospondin-1 in den glatten Muskelzellen der arteriellen Gefäßwand vermindert. Thrombospondin-1 fördert das Wachstum der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand. Thrombospondin-1 findet sich jedoch auch in den Blutplättchen und ist an der Blutgerinnung beteiligt.

In dieser Studie möchten wir nun untersuchen, ob unter einer medikamentösen Behandlung mit Statinen der Thrombospondin-1-Gehalt der Blutplättchen abfällt und ob dies günstige Auswirkungen auf die Blutgerinnung hat.

Ihr persönlicher Nutzen bei Teilnahme an dieser Studie besteht darin, dass das Ausmaß der Cholesterinsenkung durch die Statine bei Ihnen kontrolliert wird und zusätzlich Laborwerte bestimmt werden, die bei selten auftretenden Nebenwirkung erhöht sein könnten. Die Einnahme des cholesterinsenkenden Medikaments erfolgt rein aus medizinischer Indikation. Sie erhalten nur ein offiziell zugelassenes Medikament, keine spezielle Studienmedikation.

Die Untersuchung läuft folgendermaßen ab: Vor der Erstgabe des Statins werden bei Ihnen ca. 70 ml Blut venös abgenommen. Dies erfolgt wenn möglich im Rahmen einer Routineblutabnahme. Zum Vergleich: Bei einer Blutspende werden etwa 500 ml Blut entnommen. Sie nehmen danach das Statin und Ihre übrigen Medikamente so ein, wie Sie sie von Ihrem behandelnden Arzt verschrieben bekommen haben. Wenn möglich sollte während dieser Zeit an der Medikamentenverordnung nichts verändert werden. Nach vier Wochen erscheinen Sie zu einem ambulanten Termin, bei dem Ihnen erneut ca. 70 ml Blut venös entnommen werden. Nach dieser Blutentnahme ist die Teilnahme an der Studie für Sie beendet und Sie nehmen Ihre Medikamente unter der Kontrolle Ihres Hausarztes weiter ein.

### **Risiken und Nebenwirkungen:**

Die venöse Blutentnahme ist mit folgenden möglichen Risiken behaftet, die meist jedoch nur geringen Ausmaßes sind: Bluterguss, Infektion, Verhärtung an der Einstichstelle, Venenentzündung, Thrombose, Embolie, Missempfindungen im Bereich des Einstichs durch unbeabsichtigte Verletzung kleinster Hautnerven, Bildung von kleinen Narben, arterielle Fehlpunktion, vasovagale Reaktion.

Über alle Veränderungen des Gesundheitszustandes sollten die Prüfarzte sofort informiert werden, um alle unerwünschten Ereignisse erfassen zu können und die notwendigen Maßnahmen ergreifen zu können. Im Rahmen dieser Studie werden Sie neben dem Prüfarzt (PD Dr. Riessen) durch Doktoranden betreut.

Die Daten, die wir bei diesen Untersuchungen gewinnen, werden in anonymisierter Form von uns ausgewertet und helfen uns, die Wirkmechanismen der Statine besser zu verstehen und vielleicht für weitere Anwendungen nutzbar zu machen.

Die im Rahmen dieser Untersuchung gewonnenen Daten werden aufgezeichnet und (in anonymisierter Form) Dritten (z.B. Statistikern, Gesundheitsbehörden) zur Auswertung zugänglich gemacht. Staatliche Behörden oder Aufsichtspersonen, die die Richtigkeit der Daten überprüfen, dürfen Einsicht in die im Rahmen dieser klinischen Prüfung erfolgten Originalaufzeichnungen nehmen, insofern es zur Überprüfung der korrekten Datenerhebung erforderlich ist. Beim Umgang mit diesen Daten müssen die Bestimmungen des Datenschutzgesetzes beachtet werden.

Wir würden uns freuen, wenn Sie uns durch Ihre Teilnahme an dieser Studie helfen, die notwendigen Informationen zu bekommen.

**Sie sollten wissen, dass Sie Teilnahme an dieser Studie vollkommen freiwillig ist und Sie Ihre Zustimmung zur Teilnahme an dieser Studie jederzeit widerrufen können, ohne dass Ihnen dadurch Nachteile für die weitere Behandlung erwachsen.**

### **Fragen und Notizen zum Aufklärungsgespräch:**

**Patienteneinverständniserklärung**

*„Effekt von Statinen auf den  
Thrombospondin-1-Gehalt humaner Thrombozyten“*

**Prüfarzt:**

PD Dr. med. Reimer Riessen, Med. Klinik, Tel.: 07071/29-82712

**Prüfzentrum:**

Universitätsklinikum Tübingen  
Medizinische Klinik und Poliklinik  
Abt. Innere Medizin III (Kardiologie)  
Otfried-Müller-Straße 10  
72076 Tübingen

Ich habe die obige Patienteninformation erhalten und gelesen. Mit meinem behandelnden Arzt konnte ich alle mir noch offenen Fragen bezüglich des Ablaufs, der Vor- und Nachteile und der Risiken klären.

Ich bin mit der Durchführung dieser Studie einverstanden. Sie kann jederzeit, falls von mir gewünscht, abgebrochen werden, ohne dass dadurch irgendwelche Nachteile für mich entstehen.

Ich bin zugleich einverstanden, dass meine im Rahmen dieser Untersuchung gewonnenen Daten aufgezeichnet und (in anonymisierter Form) Dritten (z.B. Statistikern, Gesundheitsbehörden) zur Auswertung zugänglich gemacht werden. Daneben entbinde ich den behandelnden Arzt gegenüber staatlichen Behörden und Aufsichtspersonen, die die Richtigkeit der Daten überprüfen, von seiner Schweigepflicht, insofern es zur Überprüfung der korrekten Datenübertragung erforderlich ist, Einsicht in die im Rahmen dieser klinischen Prüfung erfolgten Originalaufzeichnungen zu nehmen. Beim Umgang mit diesen Daten müssen die Bestimmungen des Datenschutzgesetzes beachtet werden.

Ich, Frau/Herr ..... (Name, Vorname des Patienten), wurde von Frau/Herrn Dr. med. .... (Name, Vorname des aufklärenden Arztes) ausführlich aufgeklärt und erkläre mich hiermit bereit, an dieser Studie teilzunehmen.

.....  
**Datum und Unterschrift des Patienten**

Ich, Frau/Herr Dr. med. .... (Name, Vorname des aufklärenden Arztes), habe Frau/Herrn ..... (Name, Vorname des Patienten) über die Studie ausführlich aufgeklärt und ihr/ihm alle noch offenen Fragen beantwortet.

.....  
**Datum und Unterschrift des aufklärenden Arztes**

.....  
**Datum und Unterschrift des anwesenden Zeugen**

### 9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Reimer Riessen danke ich ganz herzlich für die hervorragende Betreuung während der gesamten Arbeit an dieser Dissertation, für die Bereitstellung des interessanten Themas und für seine Zeit und Geduld.

Frau Heike Runge und Frau PD Dr. Dorothea Siegel-Axel danke ich besonders für ihre Hilfsbereitschaft, für zahlreiche gute Ratschläge und ihre freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Jaschonek danke ich für die Möglichkeit, unsere Aggregationsversuche im Gerinnungslabor durchzuführen. Den Mitarbeiterinnen des Gerinnungslabors, vor allem Frau Rathloff, bin ich sehr dankbar für die fundierte Einarbeitung und Unterstützung.

Der Karl-Kuhn-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Studie.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Lebenspartner Alexander Burger für den bedingungslosen Rückhalt, den sie mir während meines gesamten Studiums gegeben haben.

## 10. Lebenslauf

|                                  |                  |   |
|----------------------------------|------------------|---|
| <b>Persönliche Daten</b>         | Name             | Melanie Silke Rapp  |
|                                  | Geburtsdatum     | 28.04.1980  |
|                                  | Geburtsort       | Leonberg  |
| <b>Schul-<br/>ausbildung</b>     | 1986 - 1990      | Grundschule in Aurich und Riet  |
|                                  | 1990 - 1999      | Friedrich-Abel-Gymnasium in Vaihingen/Enz   |
|                                  |                  | Abschluss: Allgemeine Hochschulreife  |
| <b>Hochschul-<br/>ausbildung</b> | 10/1999 – 9/2001 | Medizinstudium (Vorklinik) an der<br>Universität des Saarlandes                                     |
|                                  | 10.09.2001       | Ärztliche Vorprüfung  |
|                                  | 10/2001 – 5/2006 | Medizinstudium (Klinik) an der<br>Eberhard-Karls-Universität Tübingen                               |
|                                  | 29.08.2002       | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung   |
|                                  | 24.03.2005       | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  |
|                                  | 17.05.2006       | Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  |
|                                  | 22.05.2006       | Erhalt der Ärztlichen Approbation   |
|                                  |                  |   |
| <b>Praktika</b>                  | 9/2002 - 10/2002 | Radioonkologie (Universitätsklinik Tübingen)  |
|                                  | 2/2003 – 3/2003  | Pädiatrie (Universitätsklinik Tübingen)   |
|                                  | 9/2003           | Allgemeinmedizin (Frau Dr. Haller, Stuttgart)   |
|                                  | 3/2004           | Anästhesie (Marienhospital Stuttgart)   |
|                                  | 5/2004 – 6/2004  | Studentische Tutorin im Wochenpraktikum<br>Kinderheilkunde (Universitätsklinik Tübingen)            |
|                                  | 9/2004           | Chirurgie und Gynäkologie<br>(Handeni District Hospital, Tansania)                                  |
| <b>Praktisches Jahr</b>          | 4/2005 – 8/2005  | Chirurgie (Krankenhaus Bad Cannstatt)   |
|                                  | 8/2005 – 12/2005 | Pädiatrie (Olgahospital Stuttgart)  |
|                                  | 12/2005 – 2/2006 | Innere Medizin (Krankenhaus Bad Cannstatt)  |
| <b>Promotion</b>                 | 2002 – 2007      | Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik<br>Tübingen<br>Doktorvater: Professor Dr. R. Riessen |