

**Aus der  
Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Direktor: Prof. Dr. Gerhard Steinbeck**

# **Einfluss von Flavonoiden auf Stress-induzierte Thrombozytenaktivierung**

**Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von  
Korbinian Johannes Lackermair**

**aus  
München**

**2012**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

**Berichterstatterin: Priv. Doz. Dr. Ute Wilbert-Lampen**

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. Clemens Schacky auf Schönfeld  
Prof. Dr. Thomas M. Schiele**

**Betreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Thomas Nickel**

**Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR**

**Tag der mündlichen Prüfung: 08.03.2012**

**Es gibt Tage, da verspeist man den Bären und Tage, da wird  
man eben vom Bären verspeist.**

*unbekannt*

**meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Pathophysiologie der Atherosklerose .....	1
1.2 Rolle der Thrombozyten bei der Entstehung von Atherosklerose .....	3
1.3 Stress .....	6
1.3.1 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse).....	7
1.3.2 Die Hypothalamus-Nebennierenmark-Achse (SA-Achse) .....	7
1.4 Flavonoide .....	8
1.5 Molekulare Wirkmechanismen von Flavonoiden auf Thrombozyten .....	10
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	13
2. Organisation, Material und Methoden .....	14
2.1 Die BeMaGIC Studie.....	14
2.1.1 Studienintention und Design.....	14
2.1.2 Zeitlicher Ablauf der BeMaGIC Studie .....	15
2.1.3 Einschlusskriterien.....	16
2.1.4 Ausschlusskriterien.....	17
2.1.5 Studiengetränk .....	17
2.1.6 Studienziel und Endpunkte.....	19
2.2 Thrombozytenaktivierung unter Einfluss von Stress - in vitro Studie .....	20
2.2.1 Studienintention und Design.....	20
2.2.2 Zeitlicher Ablauf der Studie .....	20
2.2.3 Einschlusskriterien.....	21
2.2.4 Fragestellung .....	21
2.3 Das Stressechokardiographie-Experiment .....	22
2.3.1 Zielsetzung des Experiments .....	22
2.4 Materialien .....	23

2.4.1	Gerätschaften .....	23
2.4.2	Chemikalien/Reagenzien .....	23
2.4.3	Antikörper.....	24
2.4.4	Behältnisse und Reaktionszellen .....	25
2.4.5	Statistik- und Steuersoftware.....	25
2.5	Experimentelle Methodik.....	26
2.5.1	Durchflusszytometrie .....	26
2.5.2	Impedanzaggregometrie (Multiplate) .....	29
2.5.3	Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Sandwich ELISA) .....	32
2.6	Statistik.....	36
3.	Ergebnisse.....	36
3.1	BeMaGIC Studie.....	36
3.1.1	Trinkmengen.....	37
3.1.2	Thrombozytenzahlen.....	38
3.1.3	Die Trinkgruppen .....	39
3.1.4	Impedanzaggregometrie .....	40
3.1.5	sP-Selectin .....	45
3.1.6	Serum Endothelin-1.....	46
3.2	in Vitro Studie .....	48
3.2.1	P-Selectin .....	48
3.2.2	Impedanzaggregometrie .....	49
3.3	Stressechokardiographie-Experiment .....	55
3.3.1	Thrombozytenzahl.....	55
3.3.2	Impedanzaggregometrie .....	56

4. Diskussion .....	59
4.1 Auswirkung von Stress auf Thrombozyten .....	59
4.2 Einordnung in den Stand der Wissenschaft .....	65
4.3 Der Einfluss der Flavonoide – Deutung der Erkenntnisse aus der BeMaGIC Studie .....	67
4.4 Limitationen.....	69
4.4.1 BeMaGIC Studie.....	69
4.4.2 in Vitro Studie.....	69
4.4.3 Stressechokardiographie-Experiment .....	69
4.5 Ausblick.....	70
5. Zusammenfassung.....	71
Literaturverzeichnis.....	73
Abbildungsverzeichnis.....	79
Tabellenverzeichnis .....	79
Danksagung .....	80

# 1. Einleitung

„Die Atherosklerose ist derzeit die häufigste Todesursache in modernen Industrienationen. In Deutschland wird eine kardiovaskuläre Mortalität von ca. 406.000 Betroffenen/Jahr dokumentiert, entsprechend einem Anteil von 48% an der Gesamtletalität. Die koronare Herzkrankheit (KHK) sowie der Apoplex werden zusammen im Jahre 2020, einer Schätzung der World Health Organization (WHO) zufolge, weltweit die Haupttodesursache und die Hauptursache für verlorene gesunde Lebensjahre sein. Bei weiter steigender Prävalenz ist es daher erforderlich zusätzliche kardiovaskuläre Risikofaktoren zu erforschen, um die individuelle Risikoabschätzung zu optimieren und eine Intensivierung medikamentöser und nicht-medikamentöser präventiver Maßnahmen zu ermöglichen.“<sup>1</sup>

## 1.1 Pathophysiologie der Atherosklerose

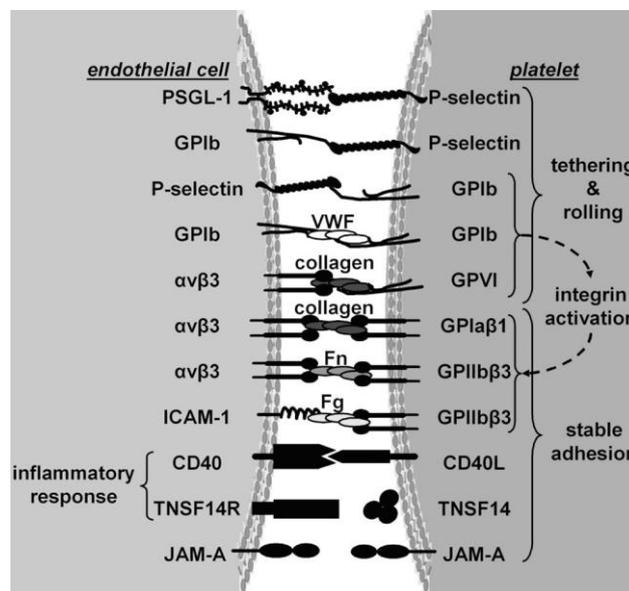
Das Verständnis der Atherosklerose befindet sich seit einigen Jahren im Wandel. Zunächst ging man davon aus, dass verschiedene Noxen wie LDL-Cholesterin, arterielle Hypertonie oder Nikotinkonsum und ähnliches zum Auftreten von Dysfunktionen auf Seiten des Endothels führen. Diese schädigenden Einflüsse induzieren eine Imbalance der endokrinen und parakrinen Endothelfunktionen bis zum Verlust physiologischer Funktionen<sup>1-3</sup>.

Neuere Forschungen insbesondere im Bereich der vaskulären Biologie haben jedoch gezeigt, dass diese Vorstellung die Atherogenese nur unvollständig beschreibt<sup>1</sup>. Vielmehr muss die Atherosklerose als ein hochkomplexer, aktiver und multifaktorieller Prozess verstanden werden, bei dem vor allem eine inflammatorische Reaktion der Gefäßwand entscheidend ist<sup>4,5</sup>. Die primäre Schädigung des Endothels führt initial zur gesteigerten Durchlässigkeit für verschiedene inflammatorische Mediatoren. Dies führt zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen<sup>6</sup>. Die Folge ist eine vermehrte Adhäsion von

Monozyten, T-Lymphozyten und Thrombozyten am Endothel, zum Teil gefolgt von einer Migration der Zellen in den subintimalen Raum<sup>1,5,7</sup>. Die Differenzierung der Monozyten in Makrophagen mit Lipidbeladung führt zur Bildung der Schaumzelle als charakteristischen Zelltyp des arteriosklerotischen Plaques<sup>1,4,5</sup>. Die Freisetzung von weiteren proinflammatorischen Botenstoffen (wie z.B. Cytokine und Chemokine) befördern die Einwanderung glatter Muskelzellen aus der Media in die sich entwickelnde intimale Läsion<sup>1</sup>. Im Verlauf bewirken Matrixmetalloproteinasen im Rahmen des proinflammatorischen Milieus eine Destabilisierung der Plaque, diese stabile Plaque wird vulnerabel bis zur manifesten Plaqueruptur<sup>1,8</sup>. Die Folge ist ein kompletter Verschluss des betroffenen Gefäßes.

## 1.2 Rolle der Thrombozyten bei der Entstehung von Atherosklerose

Thrombozyten sind in der Lage direkt an Endothelzellen zu binden, selbst wenn keine Dysfunktion vorliegt<sup>9-13</sup>. Das initiale Anheften erfolgt dabei vor allem über P-Selectin, über Signalkaskaden erfolgt die Stabilisierung. In der Folge kommt es, vermittelt über CD40 und den TNFSF14-Rezeptor, zur Auslösung einer inflammatorischen Reaktion am Endothel (vgl. Abbildung 1)<sup>14</sup> mit Freisetzung von RANTES und PF4.



**Abbildung 1: molekulare Thrombozyten-Endothel-Interaktionen.** Die Liganden-Rezeptorkomplexe P-Selectin, PSGL-1 und GPIb sind für das primäre Anheften von Bedeutung. Durch die Aktivierung von Integrinen erfolgt eine stabile Adhäsion (durch Bindungen über Fibronectin (Fn), Fibrinogen (Fg) und von Willebrand Faktor (VWF)). Durch die nachfolgende Bindung an CD40 sowie TNFSF14R kommt es zur Induktion einer inflammatorischen Reaktion auf Seiten des Endothels (nach van Gils et al.<sup>14</sup>).

Weiter führt die Bindung des Thrombozyten zur Steigerung der ROS Produktion sowie der NFκB-Aktivität in den Endothelzellen, was in einer Steigerung der Expression von Adhäsionsmolekülen und Exkretion von weiteren Chemokinen resultiert (vgl. Abbildung 2).

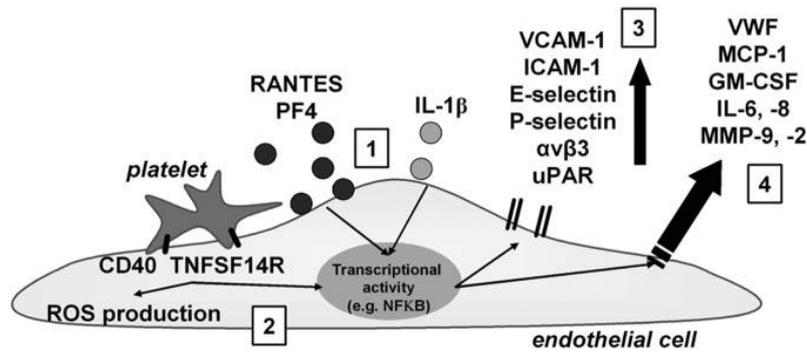


Abbildung 2: Aktivierung des Endothels nach Thrombozytenbindung. Akut kommt es zur Freisetzung von Chemokinen wie RANTES und PF4 [1]. Weiter kommt es zur Veränderung der transkriptionellen Aktivität sowie der Produktion von ROS [2], gefolgt von einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen [3] sowie Steigerung der Sekretion von diversen Chemokinen [4] (nach van Gils et al.<sup>14</sup>).

Über die Interaktion mit Endothelzellen hinaus ist eine enge Interaktion mit Leukozyten, vor allem Monozyten, bekannt. Über P-Selectin auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten kommt es zur initialen Bindung an Monozyten.

Die Monozyten-Thrombozyten Bindung wird über weitere Oberflächeninteraktionen zusätzlich stabilisiert (vgl. Abbildung 3), die entstandene Zellverbindung wird als PMC (Platelet Monocyte Complex) bezeichnet und kann als kardiovaskulärer Risikofaktor verstanden werden<sup>14-16</sup>.

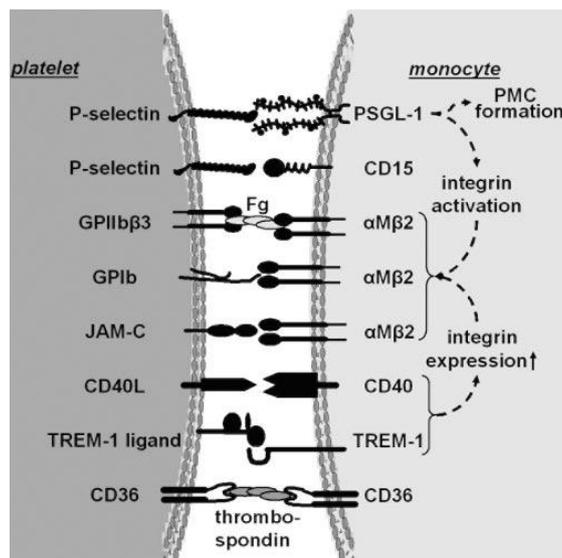


Abbildung 3: Thrombozyten-Monozyten-Interaktion. P-Selectin bewirkt über PSGL1 und CD15 das initiale Anheften. Die Bindung an PSGL1 führt über Integrinaktivierung zur weiteren Fixierung des PMC (nach van Gils et al.<sup>14</sup>).

Die Bildung von PMCs hat dabei mehrere Effekte:

Chemokine wie RANTES und PF4 werden freigesetzt. Oberflächenrezeptoren, die der Anheftung dienen, werden vermehrt an der Zelloberfläche präsentiert. Die Genexpression wird verändert, sodass es zu einer vermehrten proinflammatorischen Aktivität des Monozyten kommt (vgl. Abbildung 4).

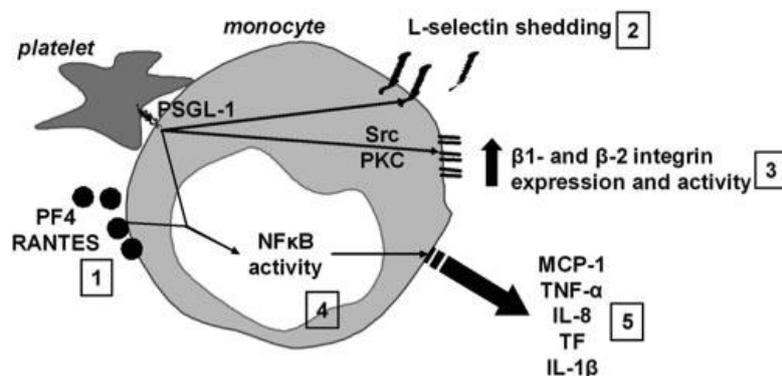


Abbildung 4: Monozytenaktivierung nach Bindung an Thrombozyten. Initial werden Chemokine wie PF4 und RANTES freigesetzt [1]. Ein Signalweg über PSGL-1 führt zur Freisetzung von L-Selectin [2] und zur Zunahme der Expression und Aktivität von  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Integrinen [3]. Darüber hinaus wird eine Steigerung der NF $\kappa$ B-Aktivität [4] sowie in Folge eine vermehrte Sekretion von verschiedenen Chemokinen ausgelöst [5] (nach van Gils et al.<sup>14</sup>).

Insgesamt wird dem Monozyten durch die Verbindung mit dem Thrombozyten, die Adhäsion und damit die Transmigration durch das Endothel erleichtert.

Daraus lässt sich ableiten, dass Thrombozyten einen nicht unwesentlichen Beitrag zum Entstehen eines inflammatorischen Milieus liefern, resultierend in einer Induktion und Progression der atherosklerotische Läsion<sup>17-19</sup>. So wurde in einem Tiermodell mit ApoE-defizienten Mäusen gezeigt, dass das Auftreten atherosklerotischer Läsionen durch Blockade der Thrombozyten-Endothel-Interaktion verhindert werden kann<sup>9</sup>.

Auch im klinischen Bereich konnte ein Zusammenspiel zwischen thrombozytärer Aktivität und atherosklerotischen Komplikationen gezeigt werden; bei Patienten mit instabiler Angina pectoris ließ sich eine vermehrte thrombozytäre Ausschüttung von inflammatorischem Interleukin 7 sowie von P-Selectin zeigen<sup>20,21</sup>. Ebenso kommt es bei Patienten mit

Hypercholesterinämie oder metabolischem Syndrom zu einer Steigerung der Thrombozytenaktivität<sup>22,23</sup>.

### **1.3 Stress**

Schon der griechische Philosoph Hippokrates (460-377 v. Chr.) definiert den Begriff Stress als Bedrohung der Homöostase und die folgende Adaptation an diese. Für den Stressforscher W. B. Cannon (1871-1945) umfasst der Begriff Stress die Auswirkungen emotionaler Prozesse auf physiologische Funktionen<sup>1</sup>. H. Selye (1907 - 1982) dagegen versteht Stress als unspezifische Reaktion des Organismus auf übermäßige Belastungen<sup>1</sup>. Dabei unterscheidet er nach der Wirkung zwei verschiedene Kategorien des Stress. „Distress“ beschreibt einen als unangenehm erlebten, also negativ interpretierten Stress, der zu einer stark erhöhten Anspannung des Körpers mit Abnahme der Aufmerksamkeit und Leistungsfähigkeit führt<sup>1</sup>. Bei Langzeitwirkung von Distress sowie fehlenden Kompensationsmöglichkeiten kommt es zur Schädigung des Organismus<sup>1</sup>. „Eustress“ beschreibt hingegen den positiven Aspekt des Stress. Er erhöht die Aufmerksamkeit und fördert die Leistungsfähigkeit des Körpers ohne schädigenden Effekt<sup>1,24</sup>.

Üblicherweise wird mit Stress die schädigende Form, der Distress, oder der chronische Zustand der Imbalance im Sinne einer Stressreaktion beschrieben. Einen Zusammenhang von derartigen zentralnervösen Vorgängen und Atherosklerose beschreibt erstmals Gutstein<sup>25</sup>. Er konnte in einem Tierversuch zeigen, dass es durch chronische elektrische Stimulation des Hypothalamus zu Vasospasmen und Endothelschäden sowie zu einer Proliferation von glatten Muskelzellen der Intima kommt.

Der Stressor kann sehr unterschiedlicher Natur sein (körperlich, emotional, psychisch,...), die Reaktion des Körpers läuft dabei jedoch über feststehende Achsen.

### **1.3.1 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse)**

Die HPA-Achse beschreibt ein neuroendokrines System aus drei Gliedern. Oberstes Glied ist dabei der Hypothalamus, der die Stressreaktion im Körper initiiert. Dazu setzt er verschieden Neurotransmitter frei, wobei CRH (Corticotropin-Releasing Hormone) eine Schlüsselrolle einnimmt<sup>1</sup>. Über das Pfortadersystem zur Hypophyse gelangt, bewirkt dies die Ausschüttung von ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) mit nachfolgender Glucocorticoidsynthese in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde. Glucocorticoide bewirken die Bereitstellung von Energie durch Induktion der Gluconeogenese, des Aminosäureabbaus sowie der Lipolyse und sichern somit eine gesteigerte Leistungsanpassung an Stressoren<sup>1</sup>.

Durch einen negativen Feedbackmechanismus mit Hemmung von Hypothalamus und Hypophyse kann die Stress-Reaktion bei fehlenden Stressoren wieder terminiert werden<sup>26</sup>.

### **1.3.2 Die Hypothalamus-Nebennierenmark-Achse (SA-Achse)**

Der zweite Weg der physiologischen Stressreaktion geht auch vom Hypothalamus aus. Hierbei erfolgt jedoch eine direkte Stimulation des Erfolgsorganes, des Nebennierenmarks. Konsekutiv kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Katecholaminen wie Adrenalin und Noradrenalin. Diese führen neben einem energiebereitstellenden Effekt auf Stoffwechselfunktionen auch zum Anstieg von Herzfrequenz und Blutdruck<sup>1</sup>. Zusammengefasst führt diese Achse zur Steigerung der körperlichen Widerstandsfähigkeit.

## 1.4 Flavonoide

Flavonoide sind ubiquitär in pflanzlicher Nahrung vorkommende Polyphenole (vgl. Abbildung 5). Es sind über 6000 verschiedenen Flavonoide beschrieben<sup>27</sup>.

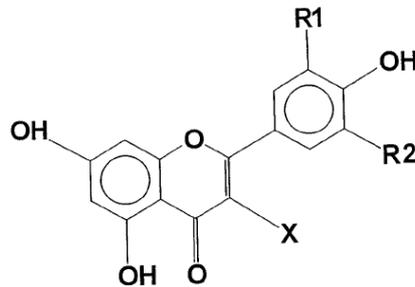


Abbildung 5: Flavonoidstruktur. Flavonole (z.B. Quercetin, Kaempferol, Myricetin) X = OH  
Flavone (z.B. Apigenin, Luteolin) X = H (nach Jansen et al.<sup>28</sup>)

Ein besonders hoher Gehalt an Flavonoiden findet sich dabei in roten Weintrauben, Rotwein, Zwiebeln, Nüssen und Tee.

Durch das Eingreifen in verschiedenste zelluläre Signalwege können Flavonoide vielfältige Wirkungen auf den Körper ausüben. So ist eine antikarzinogene Wirkung ebenso beschrieben<sup>29,30</sup> wie eine Wirkung gegen die Progredienz einer HIV Infektion<sup>29</sup>, eine präventive Wirkung hinsichtlich Diabetes mellitus<sup>27</sup> und vor allem ein die kardiovaskuläre Mortalität positiv beeinflussender Effekt<sup>27,31-38</sup>. Einen ersten Hinweis lieferte dabei das sog. French Paradoxon<sup>18,39,40</sup>. Es beschreibt, dass in der französischen Bevölkerungen trotz erhöhter kardiovaskulärer Risikofaktoren (Nikotinkonsum, Hypercholesterinämie, etc.), die kardiovaskuläre Mortalität verhältnismäßig niedrig ist. Der Effekt wurde zunächst dem landestypisch als Rotwein konsumierten Alkohol zugeschrieben. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Alkohol zwar durch eine Erhöhung des HDL-Cholesterin zur Risikoreduktion induziert<sup>41</sup>, dieser Effekt jedoch die Reduktion des Risikos alleine nicht erklärt<sup>41</sup>. In zahlreichen in vitro Studien und Untersuchungen am Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Flavonoide die Blutgerinnung sowohl auf zellulärer, thrombozytärer<sup>28,31,39,41-48</sup> wie auch

plasmatischer Ebene<sup>41</sup> hemmend beeinflussen. Dieser Effekt geht dabei, im Falle von Rotwein, über die Wirkung von Ethanol hinaus, was in vergleichenden in vitro und Tiermodell Untersuchungen zwischen Rotwein, flavonoidarmem Weißwein und rotem Traubensaft gezeigt werden konnte<sup>39</sup>.

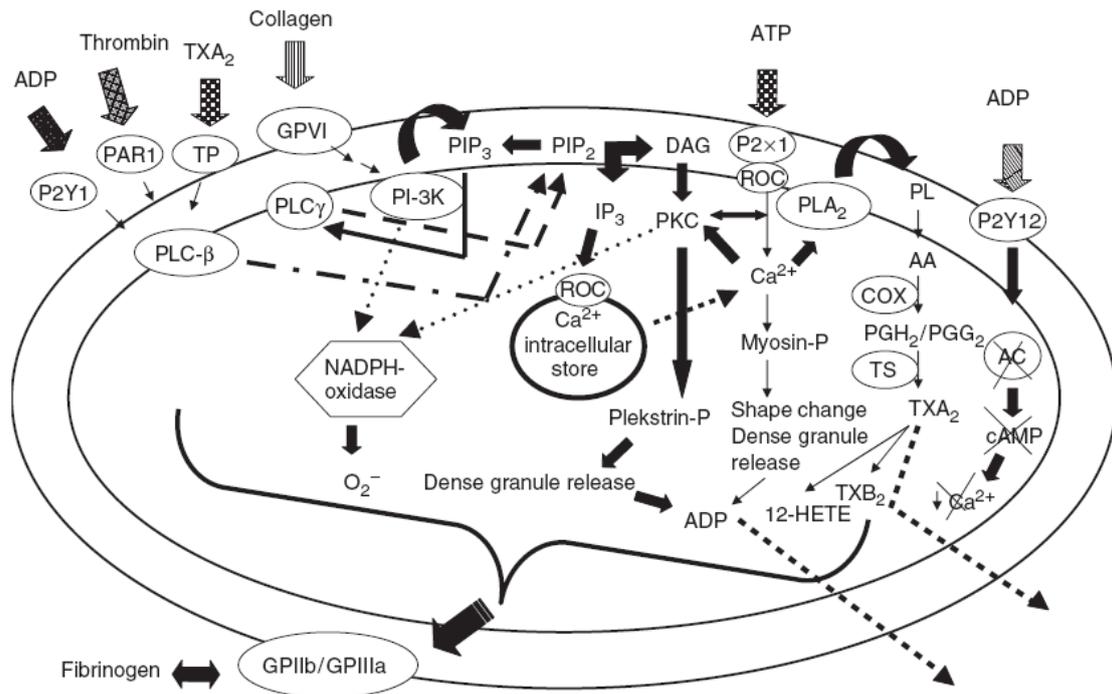
Im in vivo Modell am Menschen zeigt sich das Bild gespalten. Zwar konnte dargestellt werden, dass moderater Alkoholkonsum keine hemmend Wirkung hinsichtlich einer Aktivierung von Thrombozyten bewirkt<sup>49</sup>. Das Erreichen der benötigten Konzentrationen an Flavonoiden ist in der Literatur widersprüchlich beschrieben<sup>18,28,41,42,50-55</sup>.

## **1.5 Molekulare Wirkmechanismen von Flavonoiden auf Thrombozyten**

Der Aktivitätszustand des Thrombozyten ist durch mannigfaltige Signalwege beeinflussbar. Das Binden von Aktivatoren (ADP, Thrombin, Thromboxan, Kollagen) auf der Zelloberfläche bewirkt über komplexe intrazelluläre Signalkaskaden die Freisetzung von Granula, die wiederum Rezeptoren (GPIIb/IIa, P-Selectin, ...) enthalten, die zur Aggregation erforderlich sind (vgl. Abbildung 6).

Neben diesen „Aktivierungswegen“ besteht aber auch weitere Beeinflussbarkeit. So ist zum Beispiel nachgewiesen, dass auf der Zelloberfläche Rezeptoren vom  $\alpha_{2A}$ -Typ für Katecholamine zu finden sind<sup>19</sup>. Auch andere Stoffe wie Serotonin oder diverse Komplementfaktoren können über entsprechende Rezeptoren die Aktivität der Thrombozyten beeinflussen<sup>19</sup>. Zellbiologische Untersuchungen zeigen, dass Flavonoide an verschiedenen Punkten dieser Signalwege regulierend auf die Aktivität der Thrombozyten einwirken können. Ein Mechanismus ist dabei die Hemmung des Abbaus von cAMP über einen Phosphodiesterase-hemmenden Mechanismus<sup>56-58</sup>, ein anderer die Steigerung der cAMP Produktion durch die Adenylatcyclase als Reaktion auf Prostaglandine<sup>59</sup>.

Durch die in beiden Fällen resultierende Erhöhung des intrazellulären cAMP Spiegels wird die intrazelluläre  $Ca^{2+}$  Konzentration niedrig gehalten, was aggregationshemmend wirkt (vgl. Abbildung 6). Einen anderen Ansatzpunkt stellt der Arachidonsäure-Signalweg dar. Flavonoide hemmen die Bildung von  $TXA_2$  durch Behindern der Arachidonsäurefreisetzung sowie Inhibierung der  $TXA_2$ -Synthetase<sup>45,48,58,60</sup>. Die Reduktion des gebildeten  $TXA_2$  bewirkt konsekutiv ein Unterbrechen des oben beschriebenen Feed-back Mechanismus und damit eine Behinderung der Aggregation (vgl. Abbildung 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Thrombozytenaktivierung** Dargestellt sind die Hauptwege der thrombozytären Aktivierung. Die Bindung von Kollagen an den entsprechenden Rezeptor (GPVI) resultiert in der Phosphorylierung von verschiedenen Kinasen, was zur Rekrutierung von Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) und Phosphoinositid 3 Kinase (PI-3K) führt. Die Aktivierung der PLC $\gamma$  wird dabei zusätzlich durch das Produkt der PI-3K, das Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat (PIP $_3$ ) unterstützt. Inositol (1,4,5)-triphosphat (IP $_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) entstehen durch Hydrolyse von Phosphatidylinositol (4,5)-diphosphat (PIP $_2$ ). IP $_3$  bewirkt die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern durch den receptor-operated channel (ROC), DAG aktiviert Proteinkinase C (PKC). Die Phosphorylierung von Plekstrin und Myosin durch die aktivierte PKC führt zur Sekretion der dichten Granula und ADP. Die aktivierte PKC und die intrazelluläre Ca $^{2+}$  Erhöhung stimulieren die Phospholipase A2 (PLA $_2$ ), die die Hydrolyse der Arachidonsäure (AA) aus Membranphospholipiden katalysiert. AA wird durch die Cyclooxygenase (COX) zu den Prostaglandin Endoperoxiden PGH $_2$ /PGG $_2$  umgewandelt, die dann durch die Thromboxansynthetase (TS) zu TXA $_2$  werden. In einem positiven Feed-back Mechanismus diffundiert TXA $_2$  aus der Zelle und bindet an seinen Rezeptor (TP), was zu einer Aktivierung von PLC $\beta$  führt, die die Hydrolyse von PIP $_2$  katalysiert. Thrombin wirkt durch einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (PAR1) der die PLC $\beta$  aktiviert. Die Wirkung von ADP wird über mindestens drei purinerge Rezeptoren vermittelt. Die Bindung an P2Y1 induziert PLC $\beta$ ; die Bindung an P2X1 bewirkt über ROC das Einströmen von extrazellulärem Ca $^{2+}$ ; die Bindung an P2Y12 führt zur Hemmung der Adenylatcyclase (AC), die die Synthese von cAMP katalysiert, welches die intrazelluläre Ca $^{2+}$  Konzentration herab reguliert und die Aktivität cAMP-abhängiger Kinasen kontrolliert. All diese Signalwege resultieren letztendlich in einer Aktivierung des Fibrinogenrezeptors und andere Rezeptoren, die die Aggregation ermöglichen. (nach Nardini et al. <sup>58</sup>)

Weiter ist beschrieben, dass Flavonoide über eine Hemmung der PKC und der NADPH Oxidase sowie eine Steigerung der NO Produktion<sup>58</sup> aggregationshemmend wirken (NADPH Oxidase und NO Synthetase nicht im Bild)<sup>61</sup>. Ein Ansatzpunkt, der sehr früh in den Signalkaskaden eingreift, ist die Hemmung der PLC Aktivierung (vgl. Abbildung 6)<sup>58</sup>. Proteinkinasen, die durch ihrer Phosphorylierung von Thyrosinkinasen von der Initiation bis

zur Spätphase der Aggregation von entscheidender Bedeutung sind, können ebenfalls in ihrer Aktivität durch Flavonoide gehemmt werden<sup>58</sup>.

Nicht zuletzt können Flavonoide auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die über NADPHoxidasen produziert werden und aggregationsfördernd wirken, durch ihre antioxidativen Eigenschaften hemmend beeinflussen<sup>58,61</sup>. Dies führt ebenfalls zu einer Senkung der Aggregationsbereitschaft.

## **1.6 Zielsetzung der Arbeit**

Wie dargestellt, spielen Thrombozyten in der Initiation und Progression der Atherosklerose eine entscheidende Rolle. Die Identifizierung von Einflüssen, die aktivitätssteigernd oder hemmend auf Thrombozyten wirken, muss somit als klinisch bedeutend angesehen werden.

Ziel der Arbeit ist es infolgedessen:

1. Den Einfluss von körperlicher Extrembelastung (Stress) auf die Thrombozytenaktivität zu untersuchen
2. Im in vitro Ansatz den Effekt der Hormone der o.g. Stressachsen auf Thrombozyten zu quantifizieren
3. Das protektive Potential einer flavonoidreichen Diät unter körperlicher Extrembelastung zu prüfen

## **2. Organisation, Material und Methoden**

### ***2.1 Die BeMaGIC Studie***

#### **2.1.1 Studienintention und Design**

Die **BeMaGIC** Studie (**B**eer **M**arathon **G**enetics **I**nflamation and **C**ardiovascular System Study) untersuchte den Einfluss von in Sauergutprodukten enthaltenen Polyphenolen auf die Effekte schwerer körperlicher Belastung im Rahmen eines Marathons.

Die primären Endpunkte der Studie waren mögliche Modifikationen von Aktivität und Zahl der Thrombozyten und Expression von thrombogenen Rezeptoren. Die Untersuchung erfolgte im Rahmen eines Marathons, wobei zwei Studiengruppen untersucht wurden, die sich durch die zusätzliche Gabe eines flavonoidreichen Getränkes unterschieden.

Die BeMaGIC Studie wurde als Placebo-kontrollierte, randomisierte Doppelblindstudie konzipiert, von der Ehtikkommission der Technischen Universität unter der Nummer 2384/09 freigegeben und von Juni bis Oktober 2009 durchgeführt. Eingeschlossen wurden insgesamt 369 Probanden, von denen 250 das gesamte Protokoll absolvierten. Aufgrund der circadianen Beeinflussung der von uns untersuchten Parameter konnten in unsere Untersuchung insgesamt 170 Probanden eingeschlossen werden, die sich ausschließlich zu Untersuchungstermine zwischen 8.00 und 12.00 Uhr vorstellten. Von diesen Probanden verblieben nach Durchlaufen aller Untersuchungstermine 115.

## 2.1.2 Zeitlicher Ablauf der BeMaGIC Studie

Das Protokoll sah für jeden Probanden insgesamt 5 Untersuchungstermine (im Folgenden „Visits“ oder kurz „V“) vor.

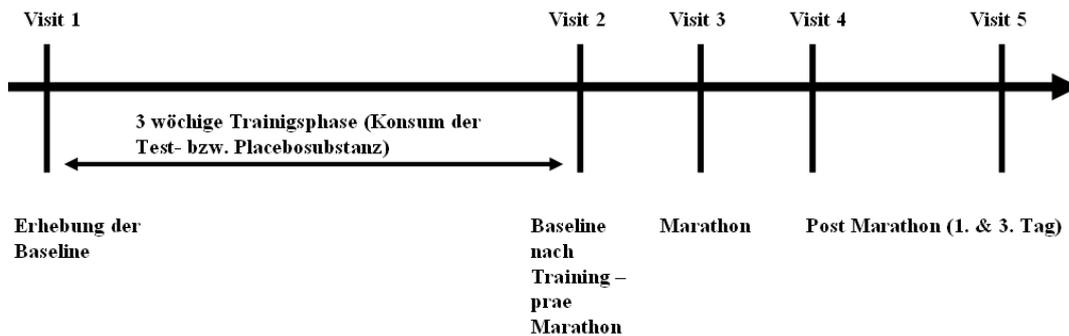


Abbildung 7: zeitlicher Ablauf der BeMaGIC Studie

Insgesamt wurde die Studie an zwei Zeiträumen durchgeführt: 09.06.2009 – 08.07.2009 (Teilnahme am Münchner Wissenschaftsmarathon) und 11.09.2009 – 14.10.2009 (Teilnahme am München Marathon).

Visit 1 (vgl. Abbildung 7) erfolgte bei beiden Läufen etwa einen Monat vor dem Marathon (09.06. – 10.06.2009 sowie 11.09. – 17.09.2009). Nachdem alle Probanden auf Ein- sowie Ausschlusskriterien überprüft, aufgeklärt und ihr Einverständnis schriftlich erklärt hatten, wurden bei dieser Eingangsuntersuchung Ausgangswerte für alle im Protokoll vorgesehenen Parameter erhoben. Die Probanden wurden randomisiert und doppelverblindet in zwei gleichstarke Gruppen eingeteilt (Team Blau – Team Rot). Um ein Confounding zu vermeiden wurden die Probanden darauf hingewiesen auf besonders flavonoidhaltige Nahrungsmittel zu verzichten, zudem erfolgte eine Einweisung über geplante Trinkmenge sowie Trinkbeginn (jeweils exakt drei Wochen vor dem Marathon – 1,5 Liter/die). Des Weiteren wurde den Probanden ein Trink- und Ernährungsprotokoll ausgehändigt, um eine exakte Dokumentation des individuellen Trink- und Ernährungsverhaltens zu ermöglichen.

Visit 2 (vgl. Abbildung 7) fand in der Woche vor dem Marathon statt (01.07. – 04.07.2009 sowie 06.10. – 10.10.2009). Aus logistischen Gründen war ein einziger Untersuchungstag nicht möglich, somit ergibt sich ein geringer Unterschied in der Anzahl der Interventionstage zwischen Visit 1 und Visit 2. Das Untersuchungsprozedere war dem von Visit 1 gleich.

Visit 3 (vgl. Abbildung 7) umfasst die Untersuchungen unmittelbar nach Zieleinlauf am jeweiligen Marthontag (05.07.2009 sowie 11.10.2009). Um den akuten Effekt der Belastung abzubilden, wurden alle Probanden sofort nach Zieleinlauf untersucht, daher konnte hier auf eine mögliche circadiane Rhythmik keine Rücksicht genommen werden.

Visit 4 (vgl. Abbildung 7) fand am jeweiligen Folgetag statt (06.07.2009 sowie 12.10.2009) und bestand aus der wiederholten Messung der schon bei den vorangegangenen Testtagen erhobenen Parameter.

Visit 5 (vgl. Abbildung 7) fand drei Tage nach dem Marathon (08.07.2009 sowie 14.10.2009) statt.

### **2.1.3 Einschlusskriterien**

- männliches Geschlecht
- Mindestalter 18 Jahre
- Höchstalter 60 Jahre
- anamnestisch gesunde Probanden
- mindestens ein Halbmarathon absolviert
- schriftliche Einverständniserklärung

#### **2.1.4 Ausschlusskriterien**

- manifeste Herzerkrankung, insbesondere Angina pectoris
- Diabetes mellitus Typ I
- Diabetes mellitus Typ II (medikamentös therapiebedürftig oder insulinpflichtig)
- muskuloskelettale Erkrankungen
- psychiatrische Erkrankungen
- Neoplasien
- akute oder chronische Infekte
- Alkoholismus oder Z.n. Alkoholabhängigkeit
- Malabsorptionssyndrome
- allergische Erkrankungen
- Medikamente mit Wirkung auf die Thrombozytenfunktion

#### **2.1.5 Studiengetränk**

Das Studiengetränk wurde von einer Traditionsbrauerei in Kooperation mit der TU Weihenstephan in in vitro Testreihen entwickelt. So enthielt das Testgetränk, in der Grundzusammensetzung an entalkoholisierendem Weißbier angelehnt, vor allem einen verringerten Gehalt an Kohlensäure. Das Placebogetränk glich dabei dem Verum bis auf den Flavonoidgehalt.

	mg/l
<b>Catechine und Proanthocyanidide</b>	
Catechin	0,597
Epicatechin	0,104
Procyanidin B3	0,420
sonstige	0,066
<b>Derivate der Benzoesäure</b>	
Vanilinsäure	0,196
Syringasäure	0,539
<b>Hydroxycimtsäuren</b>	
p-Cumarsäure	0,196
Ferularsäure	0,664
Sinapinsäure	0,059
Sonstige	0,123
<b>Flavanone und Chalkone</b>	
Isoxanthohumol	0,498
Xanathohumol	-
<b>Flavon(ol)e</b>	
Gesamtflavon(ol)e	0,694
<b>Gesamtgehalt aller Flavonoide</b>	<b>4,156</b>

Tabelle 1: Flavonoidprofil des Studiengetränkes

### **2.1.6 Studienziel und Endpunkte**

Ziel der Studie war es, einen möglichen Einfluss von körperlicher Extrembelastung auf das zelluläre Gerinnungssystem sowie einen etwaigen protektiven Effekt durch Flavonoide zu untersuchen. Die Untersuchungen umfasste folgende Surrogatparameter:

- Impedanzaggregometrische Messungen (unprovokiert sowie getriggert) zur Abbildung des augenblicklichen Aktivitätszustandes der Thrombozyten
- Serumspiegel von sP-Selectin zur Abbildung des Aktivitätszustandes über einen längeren Zeitraum
- Serumspiegel von Endothelin-1 (Serummarker für den eine pathophysiologische Bedeutung bei stressinduziertem Myokardinfarkten beschrieben ist)

#### **Fragestellung:**

- Hat das Durchlaufen des Studienprotokolls einen mit der gewählten Methodik abbildbaren Einfluss auf die Aktivität von Thrombozyten?
- Ist eine etwaige Steigerung der Aktivität durch die Gabe des Studiengetränkes zu beeinflussen?



entspannen um eine Beeinflussung der Ausgangsmesswerte durch unterschiedliche körperliche Aktivität vor der Blutentnahme auszuschließen. Nach dieser Ruhephase wurde standardisiert (mit identischem Material) Blut entnommen und unverzüglich der experimentellen Methodik zugeführt (modifizierte Impedanzaggregometrie, Durchflusszytometrie).

### 2.2.3 Einschlusskriterien

- Alter zwischen 18 und 50 Jahren
- männliches Geschlecht
- keine Vorerkrankungen
- keine akuten oder chronischen Infekte
- keine regelmäßige Einnahme von Medikamenten
- keine Medikamenteneinnahme für die eine Interaktion mit der Thrombozytenfunktion beschrieben ist (innerhalb von 10 Tagen vor Blutentnahme)
- kein Nikotinabusus

### 2.2.4 Fragestellung

- Lässt sich eine in der Literatur beschriebene Thrombozytenaktivierung durch Katecholamine<sup>67</sup> auch mittels Impedanzaggregometrie darstellen?
- Gibt es einen in vitro Effekt von CRH und Dexamethason<sup>63,64</sup> (als Vertreter der HPA-Achse) auf die Thrombozytenfunktion?
- Kann mittels Vergleich Impedanzaggregometrie - Durchflusszytometrie eine klare Aussage über den in der Literatur widersprüchlich eingeschätzte<sup>68-71</sup> Effekt von Endothelin-1 auf die Thrombozytenfunktion abgeleitet werden?

## **2.3 Das Stressechokardiographie-Experiment**

Die Untersuchung wurde in Kooperation mit der Herzchirurgischen Klinik des Klinikums Großhadern von November 2009 bis April 2010 durchgeführt. Untersucht wurde an herztransplantierten Patienten, die sich im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen einer Dobutamin-Stressechokardiographie unterzogen, der Einfluss von Stress in vivo auf die Thrombozytenfunktion. Ergänzend zu der routinemäßigen Blutuntersuchung wurde den Patienten 4,5 ml Blut für die Thrombozytenanalyse entnommen. Über einen venösen Verweilkatheter wurden bis zu 30µg/kg Körpergewicht Dobutamin infundiert. Nach Ende der Untersuchung wurde den Patienten erneut 9 ml Blut aus dem venösen Verweilkatheter entnommen (Thrombininhibitor 4,5 ml – Dynabyte medical; S-Monovette EDTA 4,5 ml - Sarstedt). Das mit dem Thrombininhibitor versetzte Blut wurde nach Entnahme der sofortigen impedanzaggregometrischen Messung zugeführt (vgl. 2.5.2), das EDTA-Blut wurde der klinischen Chemie zur Bestimmung der Thrombozytenzahl übergeben. Eingeschlossen wurden im angegebenen Zeitraum 21 Patienten, die keine plättchenhemmende Medikation einnahmen.

### **2.3.1 Zielsetzung des Experiments**

- Vergleich der impedanzaggregometrisch beurteilten Aktivität der Thrombozyten vor und nach Dobutamingabe sowie
- Untersuchung des Einflusses der Dobutamininfusion auf die Thrombozytenzahl

## **2.4 Materialien**

### **2.4.1 Gerätschaften**

Blutentnahmesystem	Safety-Multifly 20 G - Sarstedt
Brutschrank	Binder
Durchflusszytometer	FACScan - Becton Dickinson
Fluoreszenzlesegerät	GENios – Tecan
Impedanzaggregometer	Multiplate
Sterilbank	Steril GARD III Advance – Baker Company
Vertikalshaker	Promax 1020 – Heidolph

### **2.4.2 Chemikalien/Reagenzien**

Adenosindiphosphat	Dynabyte medical
Adrenalin	Sigma-Aldrich
Aqua dest.	eigene Herstellung
Corticotropin releasing factor (CRF)	AnaSpec Inc. San Jose CA
Dexamethason	Sigma-Aldrich
ELISA Conjugate Concentrate	Teil von p-selectin ELISA Kit
ELISA Conjugate Diluent	Teil von p-selectin ELISA Kit
ELISA Sample Diluent p-selectin	Teil von p-selectin ELISA Kit
ELISA Standard p-selectin	Teil von p-selectin ELISA Kit

ELISA Stop	Teil von p-selectin ELISA Kit
ELISA Stop	Teil von Endothelin 1 ELISA Kit
ELISA Substrat	Teil von p-selectin ELISA Kit
ELISA Substrat	Teil von Endothelin 1 ELISA Kit
ELISA Waschlösung	Teil von p-selectin ELISA Kit
ELISA Waschlösung	Teil von Endothelin 1 ELISA Kit
Endothelin-1	Sigma-Aldrich
Endothelin-1 ELISA Kit	R & D Systems, Katalognummer SBBE5
Formalin 0,8%	Roti-Histofix von Roth
Noradrenalin	Sigma-Aldrich
PBS	Biochrom
PBS (für Durchflusszytometer)	Hauseigene Zubereitung
P-selectin ELISA Kit	R & D Systems, Katalognummer SBBE6

### 2.4.3 Antikörper

CD61	FITC anti-human CD61 – Biolegend (336404)
CD62	PE anti-human CD62P – Biolegend (304906)
ISO	PE labeled anti-mouse – BDPharmingen (552768) FITC mouse IgG1 – Biolegend (400108)

#### **2.4.4 Behältnisse und Reaktionszellen**

ELISA 96 Well Microplatten	R & D
Messzellen	Dynabyte medical
Röhrchen Durchflusszytometrie	5 ml polystyrene round bottomed tubes – BD Falcon

#### **2.4.5 Statistik- und Steuersoftware**

CellQuest 3.3

Endnote X4

Microsoft Excel 2003, 2007

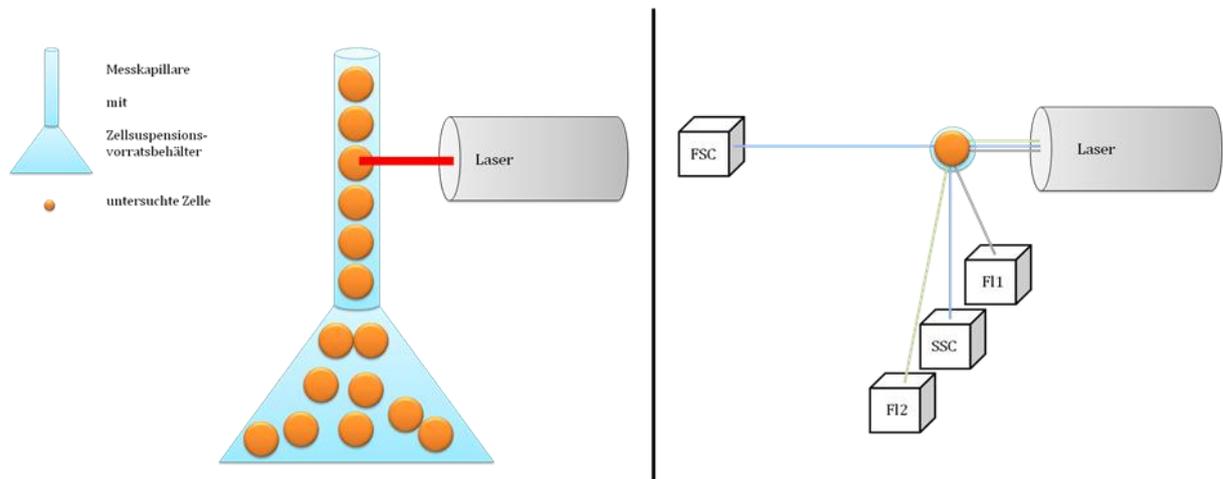
SPSS 17.0, PASW 18.0

Windows NT

## **2.5 Experimentelle Methodik**

### **2.5.1 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist ein etabliertes Verfahren, das aufgrund von Lichtbrechung, Streuung und Fluoreszenz Rückschluss auf Größe, Granularität und Oberflächenantigene von Zellen ermöglicht. Dazu wird nach einem festgelegten Protokoll eine geeignete Zellsuspension erzeugt, eventuell erforderliche Färbungen mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern vorgenommen sowie eine Messung in einem entsprechenden Durchflusszytometer durchgeführt. Aus der erstellten Zellsuspension werden die Zellen von dem Messgerät angesaugt, in PBS verdünnt und einzeln durch die Messkapillare geführt (vgl. Abbildung 8 links). Beim Durchfließen der Messkapillare werden die Zellen von einem Laser senkrecht beschossen. Von mehreren Detektoren werden verschiedene Lichtqualitäten erfasst (vgl. Abbildung 8, rechts) sowie über einen Signalwandler an einen entsprechenden Steuercomputer geleitet (nicht abgebildet). Die Absorption des Lichtes durch die Zelle stellt ein unscharfes Maß für die Zellgröße dar (Vorwärtsstreulicht, FSC), die Brechung des Lichtstrahls gibt Anhalt über deren Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC). Außerdem kann mit dem Verfahren die Expression von Oberflächenantigenen beurteilt werden. Licht, das auf die Fluoreszenz-antikörpermarkierten Oberflächenantigene trifft, führt zur Anregung und anschließenden Emission von Licht in spezifischen Wellenlängenbereichen, das im Falle unseres Gerätes von bis zu drei verschiedenen Detektoren aufgenommen werden kann (Fluoreszenzkanal 1,2,3; Fl 1-Fl 3).



**Abbildung 8: stark vereinfachte Darstellung der Durchflusszytometrie**

Für die Aktivitätsmessung im Rahmen der in vitro Studie wurde der prozentuale Anteil der Thrombozyten gemessen, der P-Selectin auf seiner Oberfläche aufwies.

Gefärbt wurde daher mit einem Phycoerythrin markierten Antikörper gegen P-Selectin der Firma Biolegend (im Weiteren: CD62 PE). Da uns jedoch die Abgrenzung der Thrombozyten vom Hintergrundrauschen in der FSC-SSC Darstellung allein zu ungenau erschien, entwickelten wir ein Verfahren, bei dem die Zählung im Durchflusszytometer als „Event“ nicht wie üblich von einem bestimmten Schwellenwert des FSC, sondern vielmehr von einem bestimmten Fluoreszenzniveau abhängig war. Dazu musste mit einem zweiten Antikörper gegen ein Oberflächenantigen gefärbt werden, das auf jedem Thrombozyten vorhanden ist. Wir wählten dazu CD61, was den dauerhaft auf der Oberfläche vorhandenen Bestandteil des GPIIb/IIIa Rezeptors darstellt. Genutzt wurde ein Fluoresceinisothiocyanat markierter Antikörper der Firma Biolegend (im Weiteren: CD61 FITC). Der Schwellenwert des Gerätes zu Registrierung eines Events wurde nun auf dem entsprechenden Fluoreszenzkanal so gewählt, dass die Zellpopulation gut ab bildbar war. Das Ergebnis der Messung lieferte somit ausschließlich CD61-positive und damit als Thrombozyten identifizierte Zellen.

### **Protokoll der durchflusszytometrischen Messung im Rahmen der in vitro Studie:**

Nach Blutentnahme von fünf ml Blut in Citratröhrchen wurde das Material zusammen mit einer identischen Menge PBS in ein 15 ml Röhrchen gegeben. Ziel der Verdünnung war es eine unerwünschte artifizielle Aktivierung der Thrombozyten zu reduzieren. Es folgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 4 °C und 1000 Umdrehungen pro Minuten ohne Bremse. Das nun entstandene Plättchen-reiche Plasma (PRP) wurde mit einer Pipette entnommen und in ein anderes Röhrchen gebracht. Nach vorsichtigem Umschwenken um eine möglichst homogene Zellverteilung zu erreichen, wurden je 500 µl in ein Cap gegeben. Es gab pro Proband je ein Cap für den Referenzwert, eines für Noradrenalin, Adrenalin, Dexamethason, CRF, Endothelin sowie ADP als Positivkontrolle. Jedes der Caps wurde entsprechend der angestrebten Endkonzentration mit entsprechenden Substanzen befüllt und direkt im Anschluss geschlossen. Es schloss sich eine 30 minütige Inkubationsphase auf einem Rotator im Brutschrank bei 37°C an. Nach der Inkubationsphase wurden aus jedem Cap 50µl in entsprechende Durchflusszytometrieröhrchen pipettiert. In jedes der Röhrchen wurden daneben auch je 5µl des CD61 FITC sowie des CD62 PE Antikörper gegeben. Außerdem wurde in einem weiteren Röhrchen ein Ansatz für die Kontrolle auf unspezifische Bindungen vorbereitet (ISO Kontrolle), in den neben 50µl aus dem Referenzansatz, 5µl CD61 FITC und 1 µl IgG1 PE ISO von BDPharmingen pipettiert wurden.

Nach einer anschließenden Inkubation von 30 Minuten bei 4°C in Dunkelheit wurden die Zellen in den Röhrchen mit je 500µl 0,8% Formalinlösung fixiert.

Abschließend wurden die Proben im FACScan der Firma BD analysiert. Es wurden im beschriebenen FITC getriggerten Setup insgesamt 50.000 Events pro Messung erfasst und im Anschluss mit CellQuest 3.3 ausgewertet.

## 2.5.2 Impedanzaggregometrie (Multiplate)

Bei der Impedanzaggregometrie der Firma Dynabyte medical – München handelt es sich um ein neuartiges Verfahren zur Bewertung der Thrombozytenaktivität. Das Grundprinzip der Messtechnik beruht auf der Zunahme des elektrischen Widerstandes im Medium ausgelöst durch Anlagerung von aktivierten Thrombozyten an die Messelektroden (Abbildung 9 rechts; Abbildung 10 rechts).

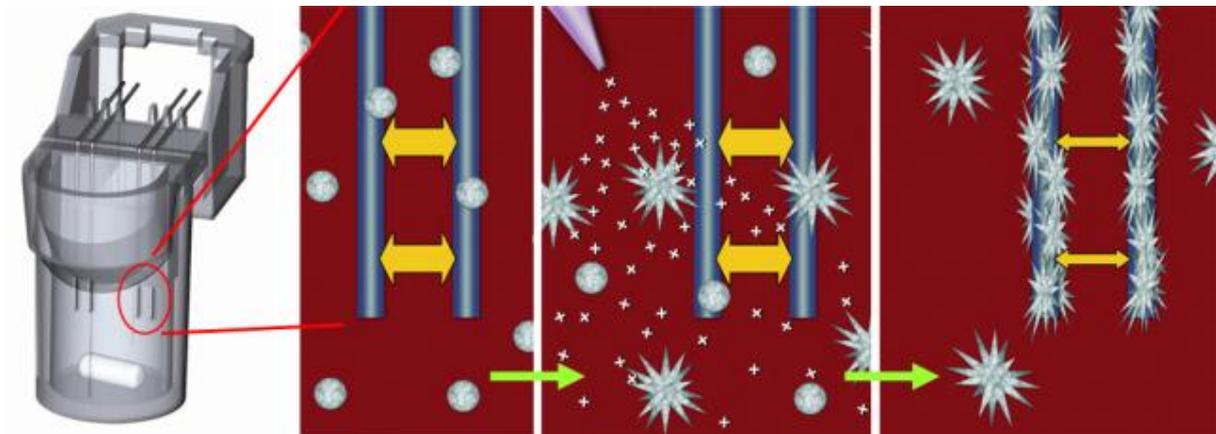


Abbildung 9: Darstellung einer Messzelle mit zwei Paaren Messelektroden (links) sowie schematische Darstellung der Widerstandszunahme durch angelagerte aktivierte Thrombozyten (rechts)

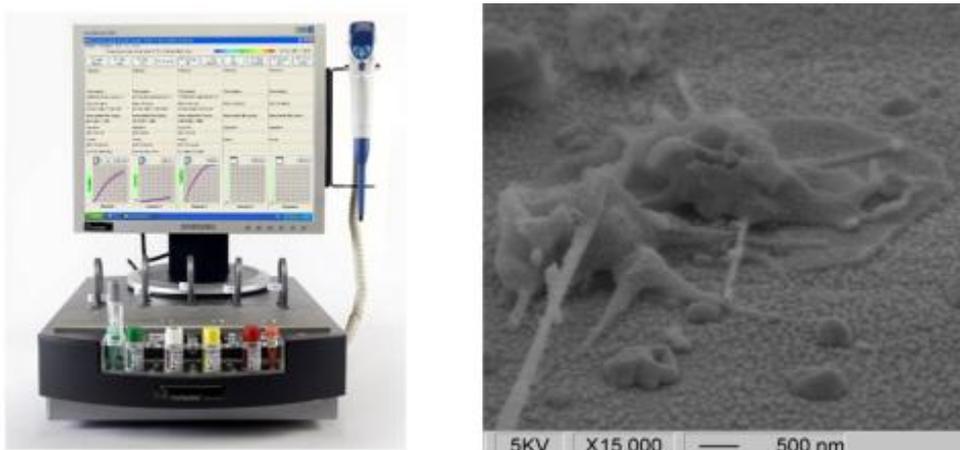
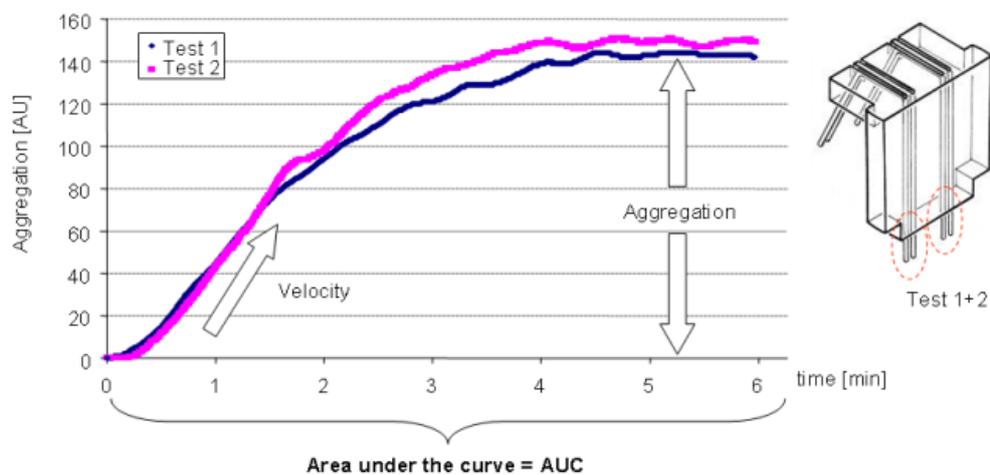


Abbildung 10: Multiplate Analysegerät (links) sowie elektronenmikroskopische Aufnahme einer Messelektrode mit aufgelagerten Thrombozyten (rechts)

Eine Messezelle besteht dabei aus einer Küvette, in die das Blut gegeben wird, sowie zwei Elektrodenpaaren zwischen denen die Zunahme des elektrischen Widerstandes gemessen wird (vgl. Abbildung 9 links). Somit erhält man in einer Messung zwei Werte, von denen der Mittelwert als Ergebnis ausgegeben wird. Während der Messdauer von standardmäßig sechs Minuten wird die Zunahme des elektrischen Widerstandes gegen die Zeit aufgetragen. Als Ergebnis der Messung erhält man sowohl die arbiträre Größe „Aggregation“ sowie das zugehörige Integral „AUC“ unter der Zeit-„Aggregation“-Kurve (Abbildung 11).



**Abbildung 11: exemplarische Darstellung einer impedanzaggregometrischen Messung**

Gemessen wird die Spontanaggregation (ohne Aktivierung), oder die durch verschiedene Aktivatoren getriggerte Aggregation. Als Aktivatoren werden Substrate von Rezeptoren benutzt, die intrazelluläre, aggregationsauslösende Signalwege induzieren. Verwendet wurde ADP („ADPtest“), Arachidonsäure („ASPItest“) und Thrombin receptor agonist peptide („TRAPtest“). Der ADP Pathway stellt den klinisch bedeutendsten Aktivierungsweg dar, der pharmakologisch durch Wirkstoffe wie Clopidogrel gehemmt werden kann, der Arachidonsäure Pathway ist klinisch Ziel einer Plättchenhemmung mittels Cyclooxygenasehemmern.

Der TRAPtest, der über den Thrombinrezeptor aktiviert, kann als maximaler Stimulator der thrombozytären Funktion verstanden werden.

Für die Messung wurde den Probanden in Hirudinröhrchen (Thrombininhibitor 4,5 ml – Dynabyte medical) Blut entnommen. Anschließend wurden die Proben für mindestens 30 Minuten erschütterungsfrei gelagert, um transportbedingte Erschütterungen als Störfaktor auszuschließen. Die Messung der Proben erfolgte gemäß den Empfehlungen von Dynabyte medical innerhalb von drei Stunden nach Probenentnahme.

Gemessen wurde in der BeMaGIC Studie nach Standardprozedere. Für eine Messung ist in jede Messzelle neben 300 µl NaCl 300 µl des Probandenblutes gegeben worden. Nach einer Inkubationsphase von drei Minuten im geräteinternen Heizblock bei 37°C wurde die Messung gestartet. Hierzu wurde entweder keine weitere Substanz gegeben (Spontanaggregation) oder 20 µl Adenosindiphosphatlösung (ADPtest) mit einer Endkonzentration von 6,5µM.

Es wurde für sechs Minuten der thrombozytenvermittelte Anstieg des elektrischen Widerstandes zwischen den beiden Sensorpaaren aufgezeichnet.

Für die in vitro Studie wurde das Messprozedere modifiziert. Nach Befüllen der Messzellen mit 280 µl NaCl sowie 300 µl Hirudinblut wurde entweder 20 µl NaCl (Referenz) oder 20 µl einer Lösung, die die Substanzen Adrenalin, Noradrenalin, CRF, Dexamethason und Endothelin-1 jeweils in der entsprechenden Konzentration enthielt, zugegeben. Im Anschluss wurde der Ansatz im geräteinternen Heizblock für 30 Minuten bei 37°C inkubiert ehe die Messung begonnen wurde. Dazu wurde für Spontanaggregation sowie ADPtest wie oben verfahren. Neben diesen beiden Tests wurde noch mittels TRAPtest gemessen, bei dem 20 µl der TRAP-Lösung zugegeben wurden mit einer resultierenden Endkonzentration von 32µM. Der weitere Ablauf der Messung war von dem Standardverfahren nicht verschieden. Im Stressechokardiographie-Experiment wurde neben den bereits beschriebenen Messungen

Spontanaggregation, ADPtest, TRAPtest noch der ASPItest verwendet. Beim ASPItest wird nach der Inkubation Arachidonsäure zugegeben um die Stimmulierbarkeit über den Cyclooxygenase Pathway zu testen. Die Endkonzentration lag dabei bei 0,5 mM. Die Inkubationszeit betrug standardmäßige drei Minuten.

### **2.5.3 Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay**

#### **(Sandwich ELISA)**

Enzyme-linked immunosorbent Assay bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Dazu wird auf eine entsprechende ELISA Microplatte zunächst ein erster Antikörper (coating-antibody) gegeben, der die Eigenschaft hat sowohl an der Platte anzuhaften als auch die Zielsubstanz (im Weiteren: das Antigen) zu binden (precoating; Schritt 1 - Abbildung 12). Nach dem Auswaschen von ungebundenen Antikörpern wird von Proben sowie von Standards (mit verschiedenen bekannten Konzentrationen) auf die Microplatte pipettiert. In der anschließenden Inkubationsphase bindet das Antigen an die nach dem ersten Schritt an die Microplatte gebundenen Antikörper. (Schritt 2 - Abbildung 12). Nach einem erneuten Auswaschen um eine Verfälschung durch ungebundene Substanzen zu verhindern, wird ein zweiter Antikörper auf den Ansatz gegeben. Der zweite Antikörper (detection-antibody) hat ebenfalls die Fähigkeit an das Antigen zu binden. Um jedoch eine konkurrierende Bindung mit dem coating-antibody zu verhindern, bindet er an ein anderes Epitop des Antigens. Überdies ist an den detection-antibody eine Enzymfunktion gebunden. In einer erneuten Inkubationsphase bildet sich nun ein Komplex aus coating- und detection antibody aus, der über das Antigen ver- und an die Microplatte gebunden ist (Sandwich ELISA; Schritt 3 - Abbildung 12). Nach einem erneuten Waschschrift

wird die enzymatische Reaktion gestartet. Es wird ein Substrat hinzugefügt, das von dem an den detection-antibody gebundenen Enzym zum Farbumschlag gebracht wird (Schritt 4 - Abbildung 12). Der Prozess der enzymatischen Farbänderung läuft über eine standardisierte Zeitspanne ab und wird anschließend durch Messung der Absorption evaluiert. Aus den Absorptionswerten der Standards sowie deren Konzentrationen lässt sich, gegeneinander aufgetragen, eine Standardkurve etablieren sowie aus einer dazugehörigen polynomischen Interpolationsfunktion die Konzentration der gemessenen Proben errechnen.

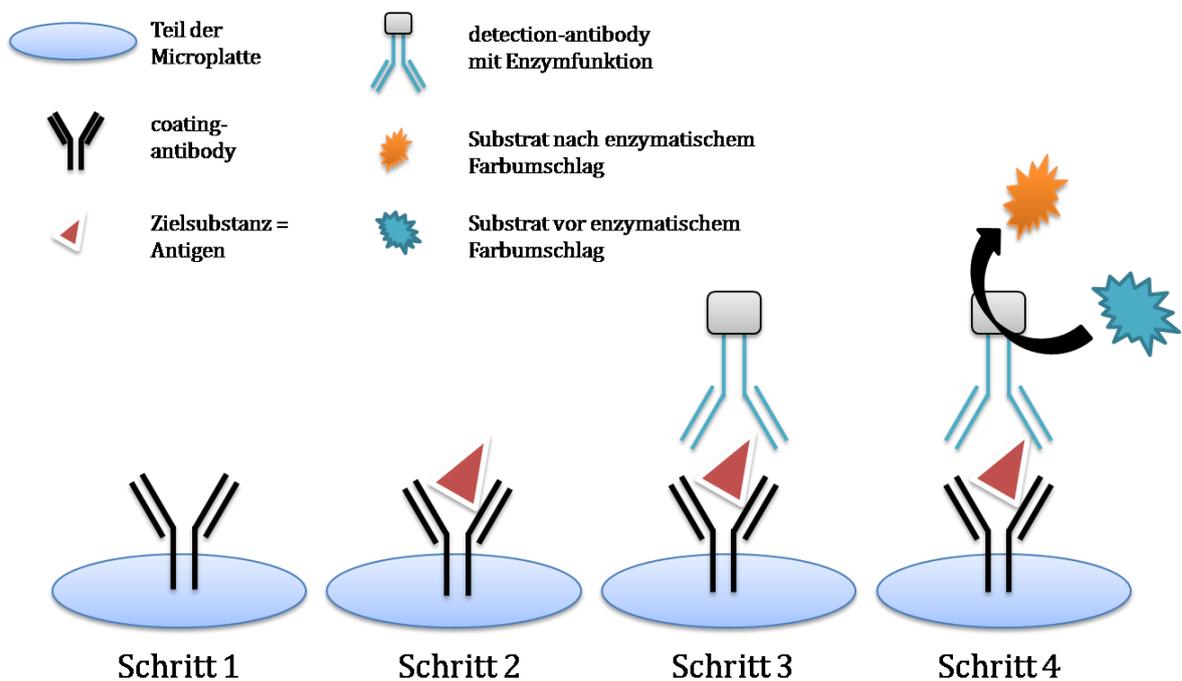


Abbildung 12: Schema Sandwich ELISA

### **sP-Selectin ELISA:**

Die Blutproben wurden nach Entnahme in Serumröhrchen (S-Monovette Serum Gel 9,0 ml – Sarstedt) umgehend abzentrifugiert (1000g, 15 min, Raumtemperatur) und das entstandene Serum bei -80°C gelagert.

Gemessen wurde mit einem Standardkit von R&D Systems (Katalognummer SBBE6). Das Kit enthält 96-Well-Platten, die bereits gecoatet sind, d.h. der oben skizzierte erste Schritt ist bereits durchgeführt. Die mitgelieferten Standards sind vor Beginn in 1 ml destilliertem Wasser angelöst worden. Die mitgelieferte Kontrolle wurde in 500µl destilliertem Wasser angelöst. Das mitgelieferte Conjugate Concentrate wurde im dafür vorgesehenen Conjugate Diluent gebrauchsfertig gemacht. Zum Abschluss der Vorbereitung wurden die bei -80°C gelagerten Serumproben im mitgelieferten Sample Diluent im Verhältnis 1:15 verdünnt. Gemessen wurden pro Platte jeweils in Doppelwerten: sechs mitgelieferte Standards, ein Leerwert ohne Zugabe einer sP-Selectin enthaltenden Probe, eine mitgelieferte Positivkontrolle sowie 40 Probandenseren. Zum Start des Prozedere wurde in jedes Well je 100 µl von verdünntem Standard, Kontrolle oder Serum gegeben. Die zwei Wells für den Leerwert verblieben ungefüllt. Direkt darauf folgten 100 µl der Conjugate Lösung (detection-antibody, vgl. Schritt 2, 3 Abbildung 12) in jedes Well. Es erfolgte eine einstündige Inkubationsphase bei Raumtemperatur auf dem Vertikalshaker. Anschließend wurde mit dem mitgelieferten Waschreagenz insgesamt dreimal manuell gewaschen. Es folgte nach der Zugabe des mitgelieferten Substrates eine 15 minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur (vgl. Schritt 4 Abbildung 12). Nach 15 minütiger Inkubationszeit wurde die enzymatische Reaktion mittels mitgelieferter Stopplösung (100µl) beendet und die Platte sofort mittels Fluoreszenzlesegerät gemessen. Gemessen wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm sowie einer  $\lambda$  Korrektur von 670 nm. Die Auswertung (Konzentrations/Absorptions-

Wertepaaren der sechs Standards) erfolgte mit Microsoft Excel 2003 durch Berechnung einer polynomischen Interpolationsfunktion.

### **Endothelin-1 ELISA:**

Die Blutproben wurden nach Entnahme in Serumröhrchen (S-Monovette Serum Gel 9,0 ml – Sarstedt) umgehend abzentrifugiert (1000g, 15 min, Raumtemperatur) und das entstandene Serum bei -80°C gelagert.

Auch Endothelin-1 wurde mittels eines Standardkits der Firma R&D Systems gemessen (Katalognummer SBBE5). Im Kit inbegriffen war eine bereits gecoatete Microplatte mit 96 Wells. Vor der Durchführung des Immunassays wurden auch hier die Standards sowie die Kontrolle mit 1 ml destiliertem Wasser angelöst. Das conjugate concentrate wurde im mitgeliefertem conjugate diluent angesetzt. Gemessen wurden pro Platte jeweils in Doppelwerten: eine Verdünnungsreihe aus insgesamt sieben Standards, ein Leerwert sowie 40 Probandenseren. Begonnen wurde mit jeweils 100 µl Standard bzw. Serum und 100 µl Conjugate (Schritt 2,3 Abbildung 12). Es folgte eine Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur auf dem Vertikalshaker gefolgt von einer sechsmaligen Waschung mit dem im Kit enthaltenen Waschreagenz. Anschließend folgte die Phase des enzymatischen Farbumschlages, eingeleitet durch die Zugabe von 100µl des mitgelieferten Substrates (Schritt 4 Abbildung 12). Beendet wurde diese Phase nach 30 Minuten durch Zugabe von 100µl der mitgelieferten Stopplösung. Innerhalb von 30 Minuten wurde die Lumineszenz gemessen. Aus den Konzentrations/Lumineszenz-Wertepaaren der sieben Standards wurde, analog zum Vorgehen beim sP-selectin ELISA, mit Microsoft Excel 2003 eine polynomische Interpolationsfunktion berechnet, anhand derer aus den Lumineszenzmesswerten der Seren die Konzentration berechnet werden konnte.

## **2.6 Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel 2003 und 2007 sowie PASW 18.0. Bei durchgehend nicht normalverteilten Daten wurde nichtparametrisch getestet, bei verbundenen Situationen mittels Wilcoxon Test, in unverbundenen Situationen mittels Mann-Whitney-U Test. Ein P-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant, kleiner 0,01 als statistisch hochsignifikant bezeichnet. Statistisch signifikante Ergebnisse sind in den Diagrammen mit ‚\*‘, hochsignifikante mit ‚\*\*‘ gekennzeichnet.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 BeMaGIC Studie**

Aus dem Probandenkollektiv der BeMaGIC Studie wurden 115 Probanden der Impedanzaggregometrie zugeführt, 96 der Messung des Serumspiegels von P-Selectin sowie 22 der Messung des Serumspiegels von Endothelin-1.

Das Zurückbleiben weit unter der möglichen Probandenzahl von 250 Probanden begründet sich im Falle der Impedanzaggregometrie durch die circadiane Problematik (vgl. 2.1.1), im Fall der Serumbestimmung von P-Selectin und Endothelin-1 neben der auch hier gegebenen circadianen Problematik auf finanziellen Gesichtspunkten.

### 3.1.1 Trinkmengen

Von den insgesamt 115 untersuchten Probanden gaben 103 ihr komplett ausgefülltes Trinkprotokoll zurück, sodass von diesen eine durchschnittliche tägliche Trinkmenge ermittelt werden konnte. Die 103 Probanden verteilten sich dabei im Verhältnis 50:53 auf die Interventions- sowie Placebogruppe. Der Median der Trinkmenge lag bei der Interventionsgruppe bei 1,20 Liter/die, in der Placebogruppe bei 1,28 Liter/die (vgl. Abbildung 13), was nach Mann-Whitney-U Test nicht signifikant unterschiedlich ist und von der praktischen Relevanz (Getränke in 500ml Flaschen ausgegeben) vernachlässigbar ist.

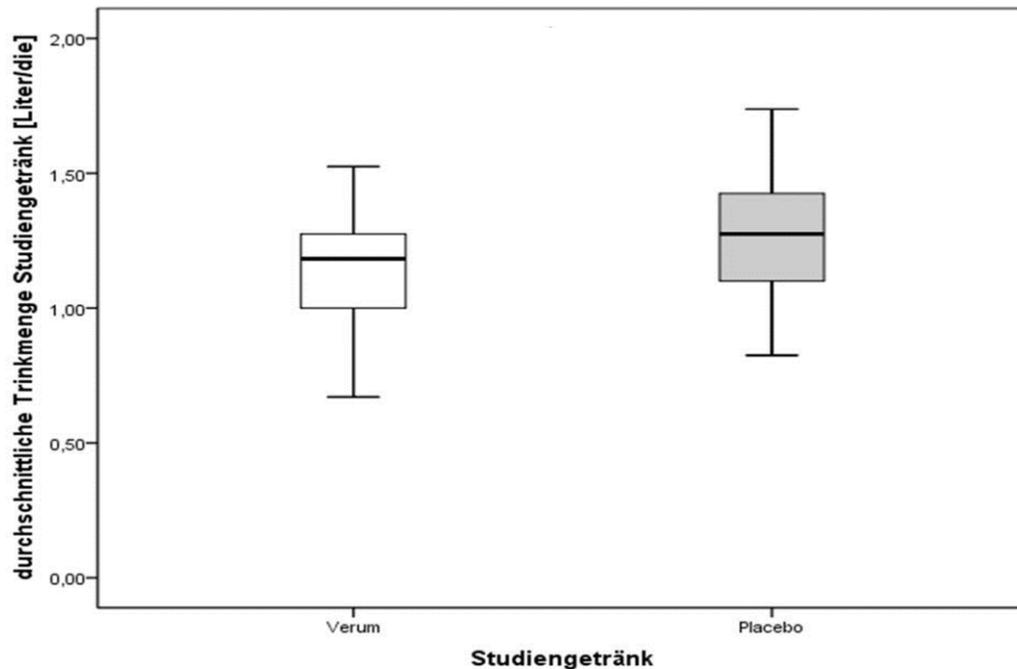


Abbildung 13: durchschnittlicher Konsum der Studiengetränke

### 3.1.2 Thrombozytenzahlen

Analysiert wurden die Thrombozytenzahlen der 115 Probanden, deren Thrombozytenaktivität mittels Impedanzaggregometrie gemessen wurde. Es ergab sich für Visit 1 ein Median von  $210 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ , für Visit 2 von  $217 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (Unterschied zu V1 hochsignifikant), für Visit 3 von  $231 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (Unterschied zu V2 hochsignifikant), für Visit 4 von  $228 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (Unterschied zu V3 signifikant) und für Visit 5 ein Median von  $224 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (bezogen auf V4 hochsignifikant). Es zeigt sich bei V2 (nach der Trainingsphase) eine hochsignifikante Zunahme der Thrombozytenzahl um 3,3 %. Bei V3 (post Marathon) zeigt sich sogar eine hochsignifikante Zunahme der Zellzahl von 6,5 % gegen V2. Der Rückgang von V3 zu V4 (Tag 1 post Marathon) ist mit einer prozentualen Veränderung von -1,3 % marginal aber dennoch signifikant. Der Rückgang von V4 zu V5 (Tag 3 post Marathon) ist mit -1,8 % ähnlich gering, aber dennoch hochsignifikant (vgl. Abbildung 14).

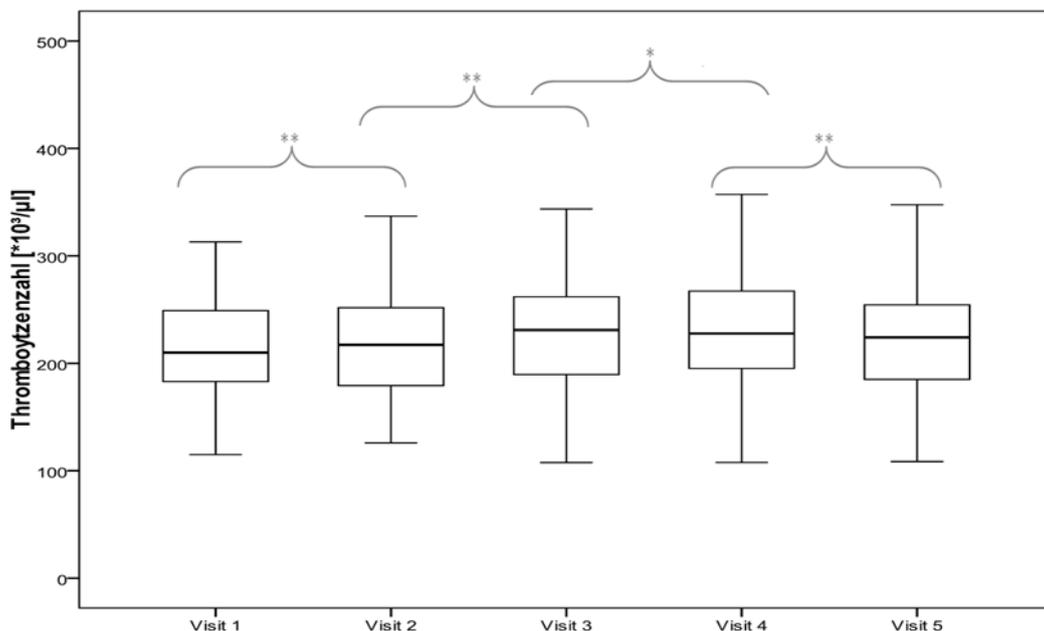


Abbildung 14: Thrombozytenzahlen [ $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ] nach Visits

### 3.1.3 Die Trinkgruppen

Ziel der Unterteilung des Kollektivs war es, eine Dosis-Wirkungsbeziehung zu untersuchen. Zu diesem Zwecke wurden die 50 Probanden der Interventionsgruppe nach ihrer durchschnittlichen Trinkmenge aufgetragen und die Quartilengrenzen berechnet. Es ergaben sich die Grenzen 1 Liter/die für die untere Quartile, einen Interquartilbereich von  $> 1$  Liter/die bis  $< 1,28$  Liter /die und dementsprechend eine obere Quartile mit einer Trinkmenge von 1,28 Liter/die im Durchschnitt oder größer (vgl. Abbildung 15). Um auszuschließen, dass die Größe Trinkmenge an sich einen Effekt hat (und damit nicht die unterschiedliche Menge an aufgenommenen Flavonoiden die unterschiedlichen Messwerte erklärt), wurde im Vergleich zu den entsprechenden Quartilen des Placebogetränkes getestet. Dies änderte die dargestellten Ergebnisse jedoch nicht und ist daher nicht abgebildet. In der folgenden Darstellung findet sich daher der Übersichtlichkeit halber eine einzige Gruppe „Placebo“, die nicht weiter nach unterschiedlicher Trinkmenge des Placebogetränkes unterteilt ist.

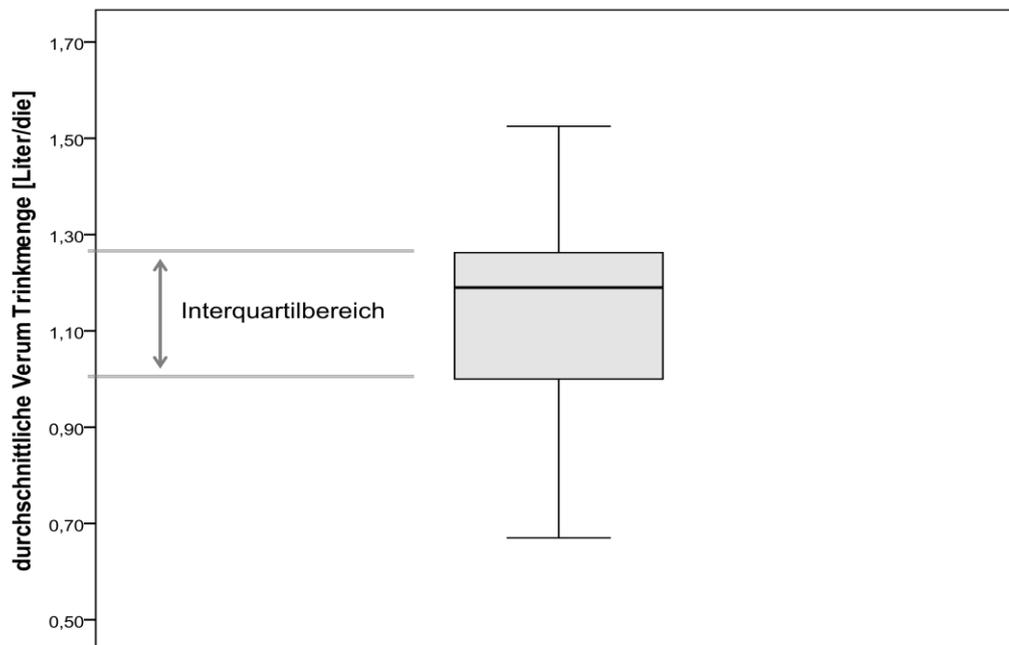


Abbildung 15: Darstellung Trinkmenge Verumgruppe

### 3.1.4 Impedanzaggregometrie

#### Spontanaggregation:

Gemessen wurde nach dem in 2.5.2 beschriebenen Verfahren, die Ergebnisse wurden in der Einheit „AUC“ ausgegeben. Der Median war für Visit 1: 8, für Visit 2: 11, für Visit 3: 24, für Visit 4: 8 und für Visit 5: 13. Es konnte gezeigt werden, dass es in der prae-Marathon Phase zu einer hochsignifikanten Zunahme der Thrombozytenaktivität kam (V1 zu V2). Eine ebenfalls hochsignifikante Zunahme bildet der Vergleich V3 (post Marathon) zur prae-Marathon Phase (V2 und V1) ab. Post Marathon kommt es zu einer hochsignifikanten Abnahme bei V4 und von dort aus zur erneut hochsignifikanten Zunahme. V5 verbleibt insgesamt hochsignifikant über Baseline (V1 zu V5; vgl. Abbildung 16).

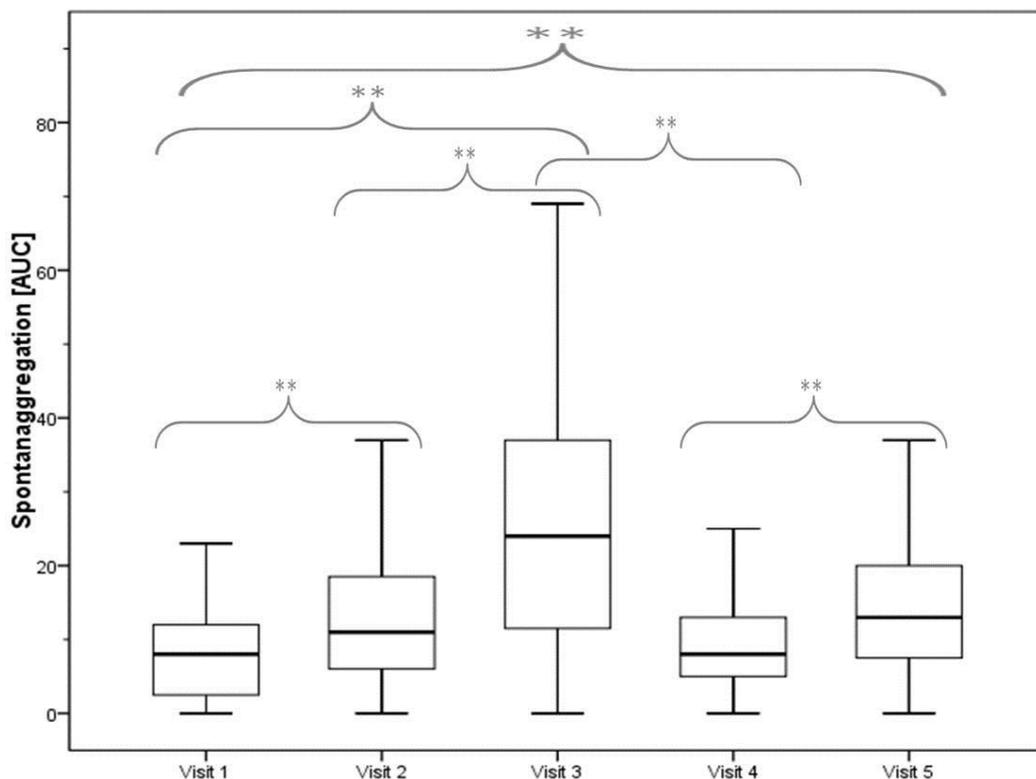


Abbildung 16: Spontanaggregation [AUC] nach Visits

Die Auswertung nach Gruppen ergab die folgenden Ergebnisse (immer Verum zu Placebo):  
 Visit 1: 6 zu 8; Visit 2: 10 zu 12; Visit 3: 18 zu 26; Visit 4: 7 zu 8,8; Visit 5: 12 zu 14. Die Interventionsgruppe liegt bei allen Visits von der Tendenz höher, am deutlichsten ist der Unterschied bei Visit 3 – also post Marathon (vgl. Abbildung 17). Im Mann-Whitney-U Test werden jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede erreicht.

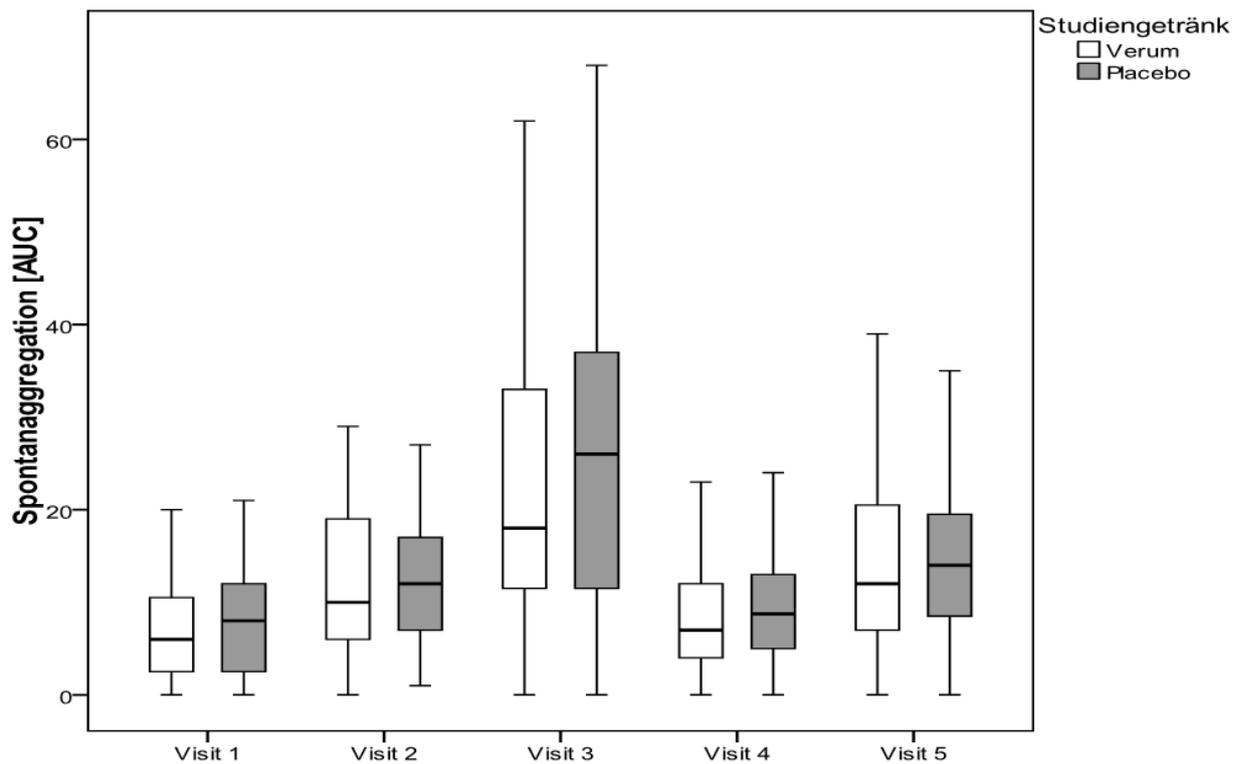


Abbildung 17: Spontanaggregation [AUC] nach Visits im Gruppenvergleich

Die Betrachtung der oberen Verumquartile zeigt dagegen ein anderes Bild. Der Verlauf der Mediane über die Visits ist: 8, 12, 11, 6, 16. Damit fällt im Vergleich zur Gesamtbetrachtung (vgl. Abbildung 16) auf, dass in der Gruppe der Verumprobanden mit der größten Aufnahme

an Studiengetränk der Anstieg der Thrombozytenaktivität post Marathon ausbleibt. Der Anstieg von V1 zu V2 verfehlt die Signifikanz ebenso wie die Veränderung von V2 zu V3. Der Rückgang von V3 zu V4 ist signifikant, der Anstieg von V4 zu V5 ist hochsignifikant. Auch die Veränderungen von V1 zu V3 bzw. V5 sind in dieser Subpopulation nicht signifikant (vgl. Abbildung 16, Abbildung 18)

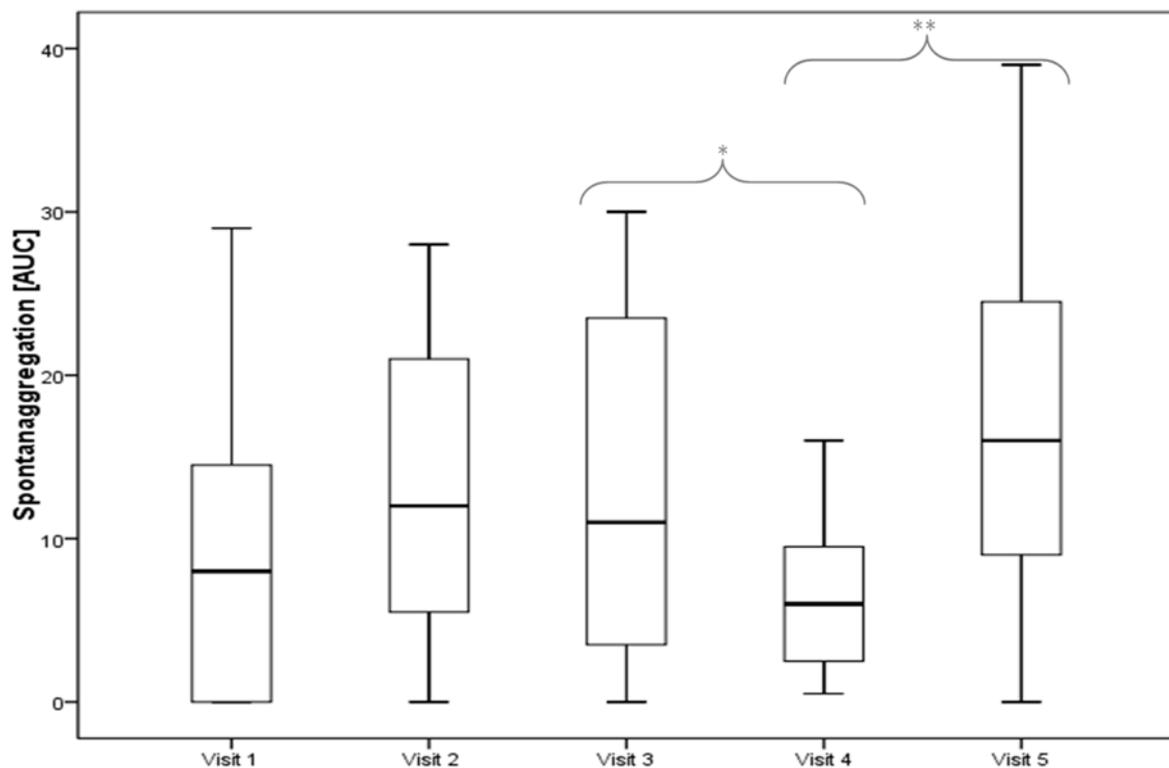


Abbildung 18: Spontanaggregation [AUC] der oberen Quartile der Verumgruppe nach Visits

Vergleicht man nun die Placebogruppe mit der oberen Quartile der Verumgruppe ist bei V3 die Placebogruppe (Median 26) signifikant höher als die oberer Quartile der Verumgruppe (Median 11/vgl. Abbildung 19).

Die Aktivität der Thrombozyten von Sportlern aus der Placebogruppe ist damit post Marathon signifikant höher als die der Sportler, die der oberen Quartile der Verumgruppe angehören.

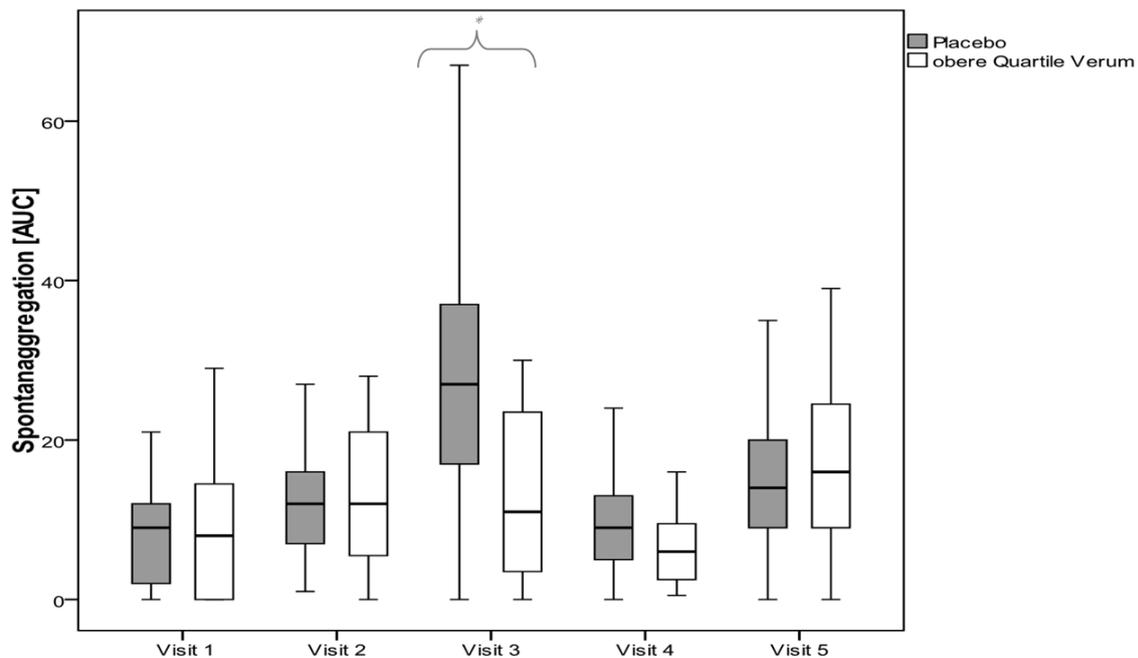


Abbildung 19: Spontanaggregation [AUC] nach Visits im Vergleich Placebo – obere Quartile Verum

#### ADPtest:

Hier wurde nach dem in 2.8.2 beschriebenen Verfahren gemessen und das Ergebnis in der Einheit „AUC“ ausgegeben. Die Mediane waren dabei: 63, 65, 90, 67 und 70. Es zeigt sich eine diskrete, nicht signifikante Zunahme von V1 zu V2, ein hochsignifikanter Anstieg von V2 auf V3, ein ähnlich starker, hochsignifikanter Rückgang von V3 zu V4 und ein geringer, aber hochsignifikanter erneuter Anstieg zu V5 hin. V5 und auch V3 liegen auch hier hochsignifikant über der Baseline (vgl. Abbildung 20). Somit ist die Steigerung der thrombozytären Aktivität durch das Durchlaufen des Studienprotokolls auch im ADPtest bestätigt und hochsignifikant.

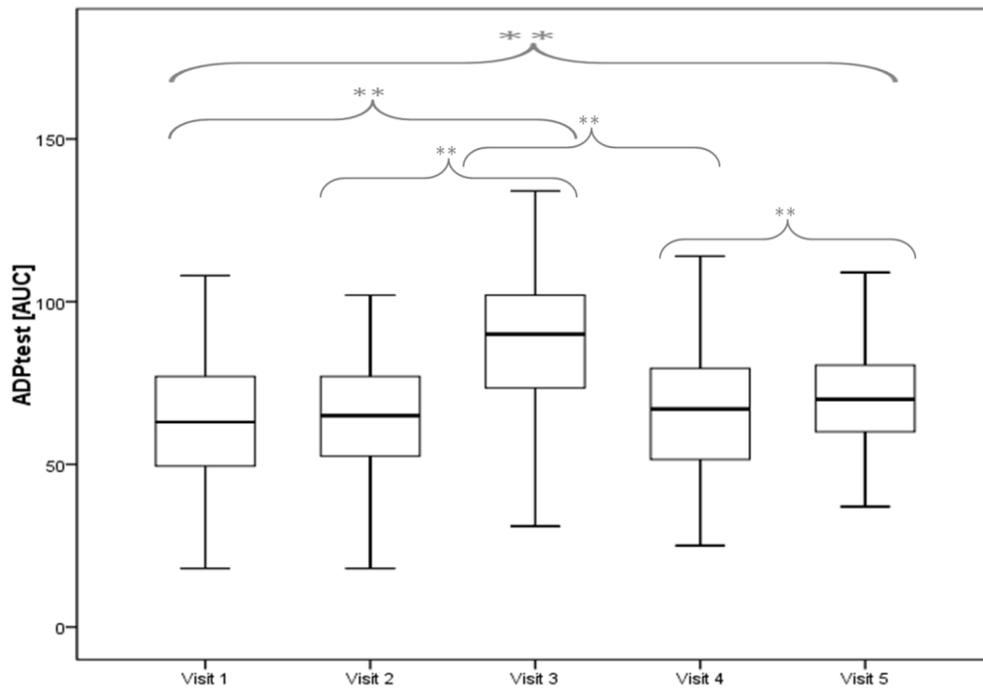


Abbildung 20: ADPtest [AUC] nach Visits

Die Auswertung nach Gruppen ergab die folgenden Ergebnisse (immer Verum zu Placebo):  
 Visit 1: 62 zu 63,5; Visit 2: 62 zu 68,5; Visit 3: 86 zu 92,5; Visit 4: 65 zu 70,5; Visit 5: 69 zu 71,5. Ähnlich wie in der Spontanaggregation zeigt sich auch hier eine Tendenz geringerer Werte in der Interventionsgruppe (vgl. Abbildung 21), verfehlt jedoch zu jedem Zeitpunkt die statistische Signifikanz. Auch bei der gesonderten Betrachtung der verschiedenen Subgruppen der Verumgruppe zeigte sich ein ähnliches Bild ohne signifikante Unterschiede zur Placebogruppe.

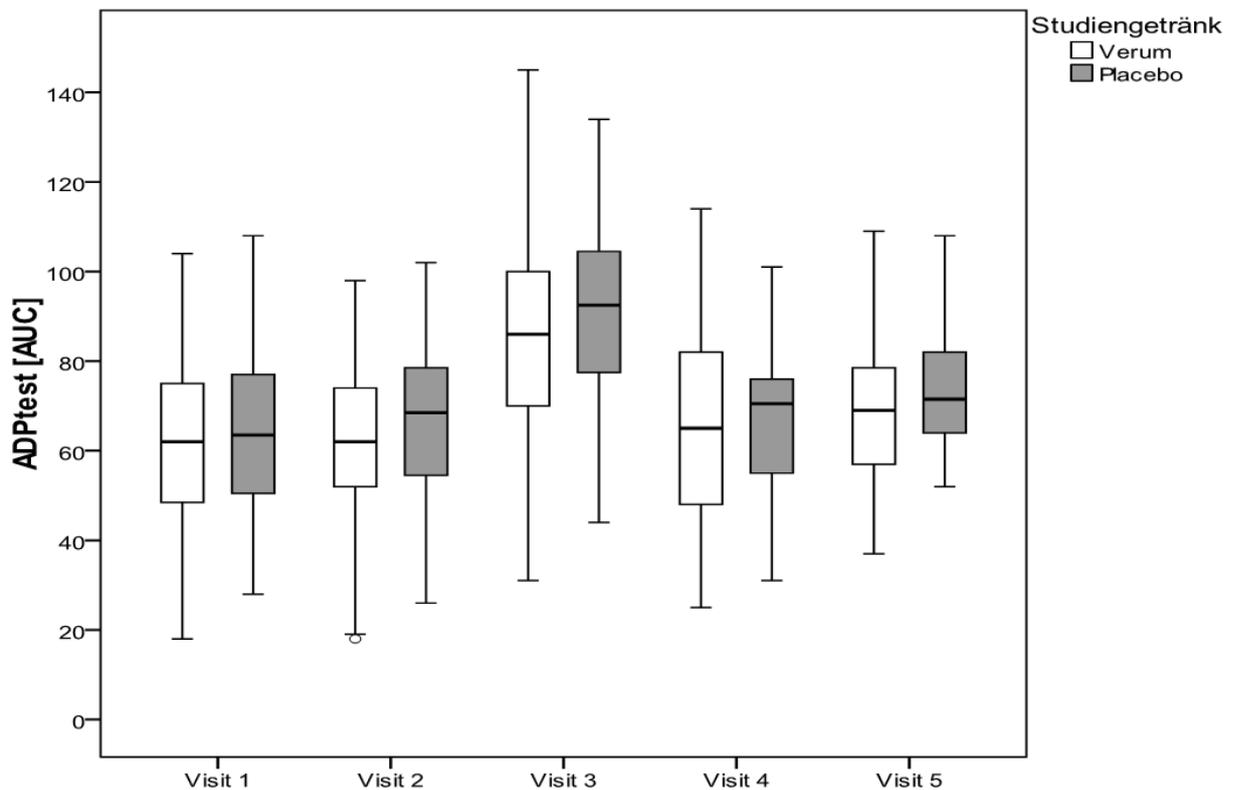


Abbildung 21: ADPtest [AUC] nach Visits im Gruppenvergleich

### 3.1.5 sP-Selectin

Die Proben wurden wie unter 2.5.3 beschrieben gewonnen und gemessen, angegeben in ng/ml. Es ergaben sich für die fünf Messzeitpunkte folgende Mediane: Visit 1: 62,17; Visit 2: 57,96; Visit 3: 94,86; Visit 4: 81,74; Visit 5: 61,46. Es zeigt sich ein nicht signifikanter Rückgang während der Trainingsphase (V1 zu V2), post Marathon kommt es akut zum hochsignifikanten Anstieg (V3 erhöht). Auch einen Tag post Marathon sind die Werte gegenüber der Baseline erhöht, wenn auch im Vergleich zu V3 leicht und nicht signifikant erniedrigt. Am dritten Tag post Marathon findet sich ein Wert, der den Ausgangswert fast exakt entspricht (hochsignifikanter Unterschied zu V4 / vgl. Abbildung 22).

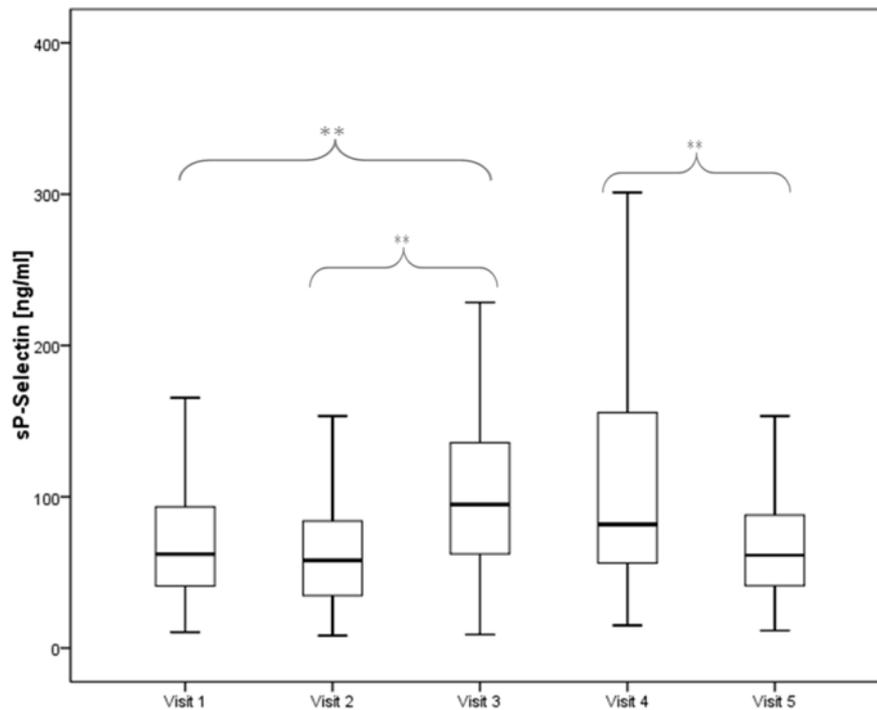


Abbildung 22: Serumspiegel P-Selectin nach Visits

Betrachtet man die beiden Studiengruppen im Vergleich, zeigt sich die Tendenz von niedrigeren Werten in der Verumgruppe vom Start weg, die jedoch klar zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant werden (Daten nicht abgebildet).

### 3.1.6 Serum Endothelin-1

Nach einer Probengewinnung und Messung, wie unter 2.5.3 beschrieben, ergaben sich folgende Mediane in ng/ml: 2,42; 2,3; 2,6; 2,36 und 2,29. Somit zeigt sich ein nichtsignifikanter Rückgang nach der dreiwöchigen Trainingsphase, eine hochsignifikante Zunahme post Marathon, eine signifikante Abnahme zu V4 und eine nicht signifikante weitere Abnahme zu V5 (vgl. Abbildung 23).

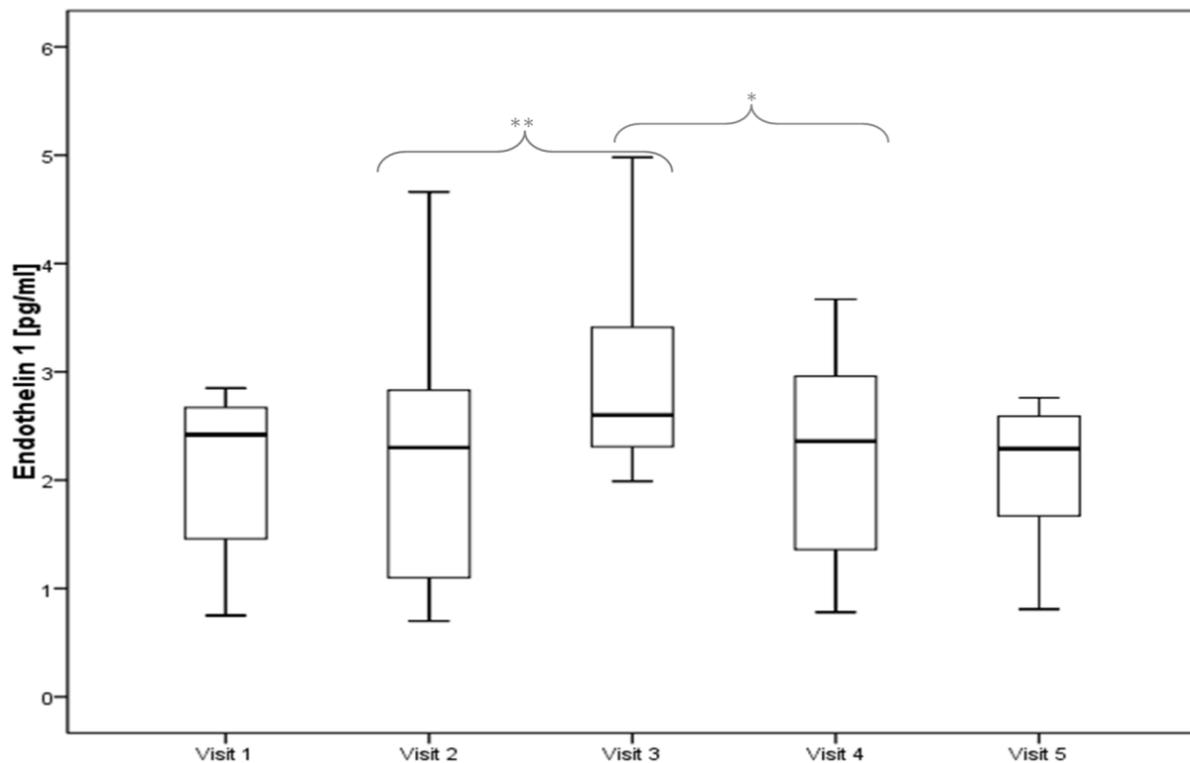


Abbildung 23: Endothelin-1 [pg/ml] nach Visits

Beim Gruppenvergleich zeigt sich (immer Verum zu Placebo): Visit 1: 1,71 zu 2,52; Visit 2: 1,09 zu 2,46; Visit 3: 2,51 zu 2,6; Visit 4: 1,48 zu 2,73 und Visit 5: 1,73 zu 2,45. Es bilden sich bei allen fünf Messzeitpunkten niedrigere Werte in der Verumgruppe ab, wobei der Unterschied lediglich bei V2 statistische Signifikanz erlangt (vgl. Abbildung 24). Eine weitere Untersuchung mittels Subgruppen (nach Trinkmenge) wurde aufgrund der geringen Fallzahl von insgesamt 22 nicht durchgeführt.

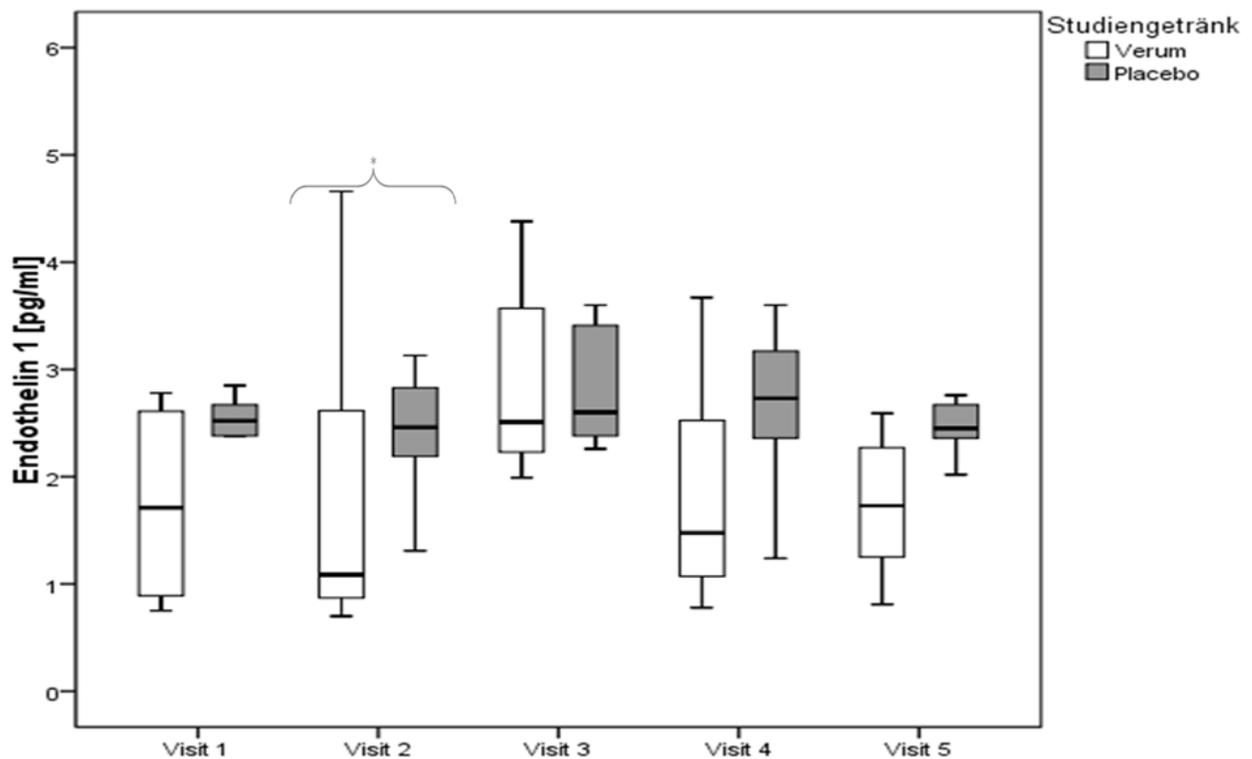


Abbildung 24: Endothelin-1 [pg/ml] nach Visits – im Gruppenvergleich

## 3.2 *in Vitro* Studie

### 3.2.1 P-Selectin

Wie oben beschrieben, wurde aus den gewonnenen Daten der prozentuale Anteil der Thrombozyten errechnet die P-Selectin auf ihrer Oberfläche aufwiesen.

Es zeigt sich folgendes Bild: Für die unstimulierte Referenzprobe ergab sich ein Median von 0,14%. Die Katecholamine Adrenalin (Median: 0,57) und Noradrenalin (Median: 0,48) zeigten eine deutliche, hochsignifikante Zunahme der oberflächenständigen P-Selectin Moleküle. Unter dem Kortikosteroid Dexamethason zeigte sich allenfalls eine geringe, nicht

signifikante Zunahme (Median: 0,18). Ähnliches wurde für Endothelin-1 gemessen (Median 0,17/vgl. Abbildung 25). CRF hingegen wies mit einem Median von 0,20 einen signifikanten Anstieg auf.

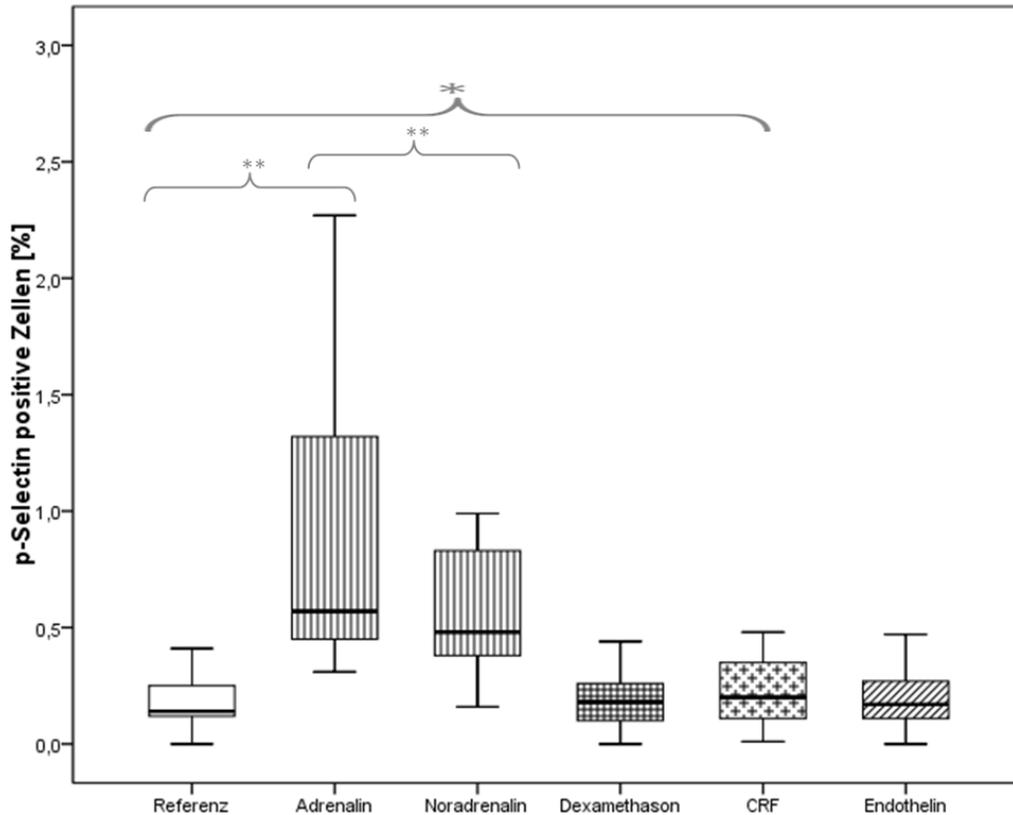


Abbildung 25: prozentualer Anteil p-Selectin positiver Thrombozyten in Abhängigkeit vom Versuchsreagenz

### 3.2.2 Impedanzaggregometrie

Die Messung erfolgte nach dem unter 2.4.2 beschriebenen, modifizierten Messverfahren. Als Ergebnisse wurde im Falle der Spontanaggregation die Größe „Aggregation“ verwendet. Diese Abweichung von der sonstigen Einheit „AUC“ gründet auf der Dimension der Werte. Bei den hier vorliegenden sehr kleinen Werten ergab ein Integral unter der Aggregationskurve wenig Aussage und vor allem wenig Trennschärfe zwischen den einzelnen Testansätzen (vgl.

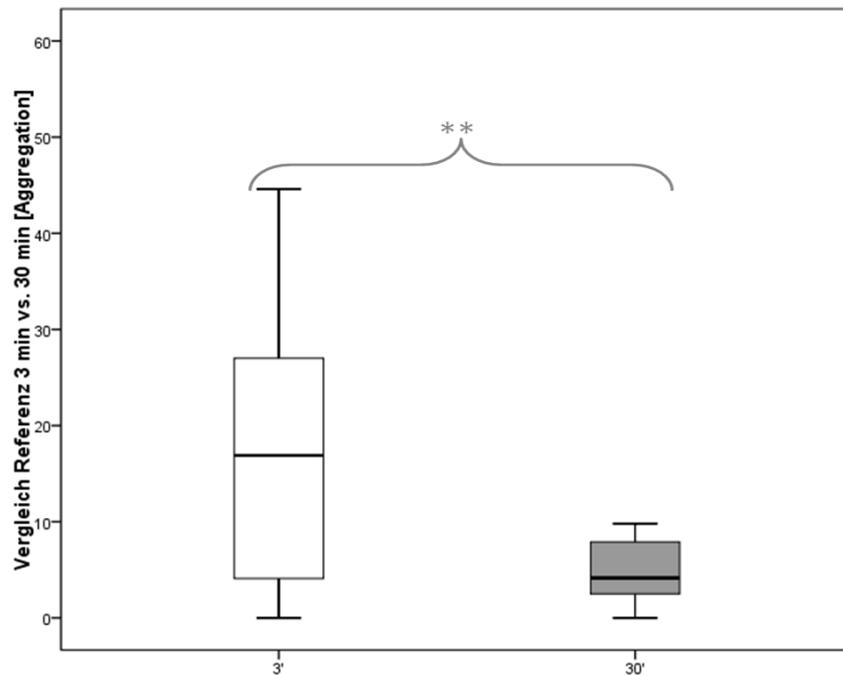
dazu auch Abbildung 11). Bei den anderen Messungen (ADPtest und TRAPtest) wurde als Einheit „AUC“ gewählt. Berücksichtigt werden muss auch, dass die Werte durch die Änderung der Inkubationszeit von drei auf dreißig Minuten nicht mit den impedanzaggregometrischen Messungen aus der BeMaGIC Studie und dem Stressechokardiographie-Experiment vergleichbar sind.

Im Einzelnen zeigten sich folgende Ergebnisse:

### ***Spontanaggregation:***

Zunächst aufgrund der genannten Problematik der unterschiedlichen Inkubationszeit eine Gegenüberstellung der Referenz aus der In vitro Studie und einem zufällig ausgewählten, 40 Probanden umfassenden Kollektiv aus den Baseline Untersuchungen der BeMaGIC Studie. Die Rahmenbedingungen der Blutentnahmen sowie das Kollektiv waren zu diesem Zeitpunkt äquivalent, da die Intervention in der BeMaGIC Studie erst nach Baseline begonnen wurde und die Einschlusskriterien was Alter, Vorhandensein von Vorerkrankungen sowie Medikation deckungsgleich waren.

Es präsentiert sich folgendes Ergebnis: Die Referenz mit 3 Minuten Inkubation erreicht einen Median von 16,9, wohingegen der Median bei der 30 Minuten Inkubation bei 4,15 liegt. Der Unterschied ist hochsignifikant (vgl. Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Darstellung des Einflusses einer Inkubationszeitveränderung auf die Spontanaggregation [Aggregation]

Vergleich der einzelnen Ansätze der in Vitro Studie:

Bei der Referenzprobe lag der Median der Aggregation bei 4,15. Unter Adrenalin (Median: 5,3) und vor allem Noradrenalin (Median: 6,2) zeigte sich eine Zunahme der Aggregation, die für Noradrenalin statistisch signifikant war. Nahezu unveränderte Werte lieferte die Reihe mit CRF (Median: 4,1). Zu einer Abnahme der thrombozytären Spontanaktivität führten die Ansätze mit Dexamethason (Median: 3,6) und Endothelin-1 (Median: 3,4, signifikante Abnahme/vgl. Abbildung 27).

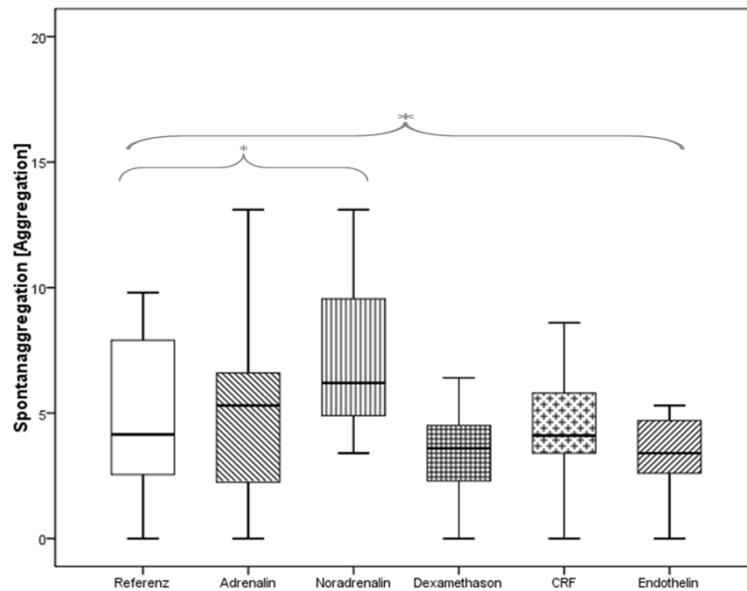


Abbildung 27: Spontanaggregation [Aggregation] in Abhängigkeit vom Versuchsansatz

**ADPtest:**

Auch hier zunächst die Gegenüberstellung mit der BeMaGIC Baseline, um den Einfluss der verlängerten Inkubation einzuschätzen: Die 3 minütige Inkubation führte im Median zu einem Wert von 63, die 30 minütige mit 7,5 erneut zu hoch signifikant niedrigeren Werten (vgl. Abbildung 28).

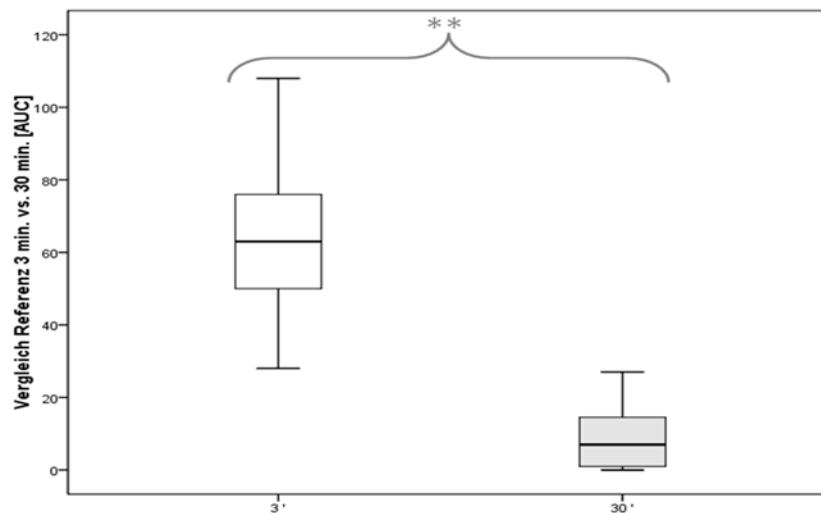


Abbildung 28: Darstellung des Einflusses einer Inkubationszeitänderung auf die ADP-Aktivierbarkeit [AUC]

Im Vergleich der Stressfaktoren zeigt sich:

Adrenalin führt zu einem leichten Rückgang der ADP getriggerten Aktivität (Median: 6). Noradrenalin (11), Dexamethason (11,5), CRF (12,5) und Endothelin (13) zeigten jeweils Anstiege der ADP Provozierbarkeit (vgl. Abbildung 29). Statistische Signifikanz erreichten dabei im Wilcoxon Test die Anstiege unter CRF und Endothelin-1. Gemessen am Median handelt es sich um einen Effekt von +79 bzw. + 86 %.

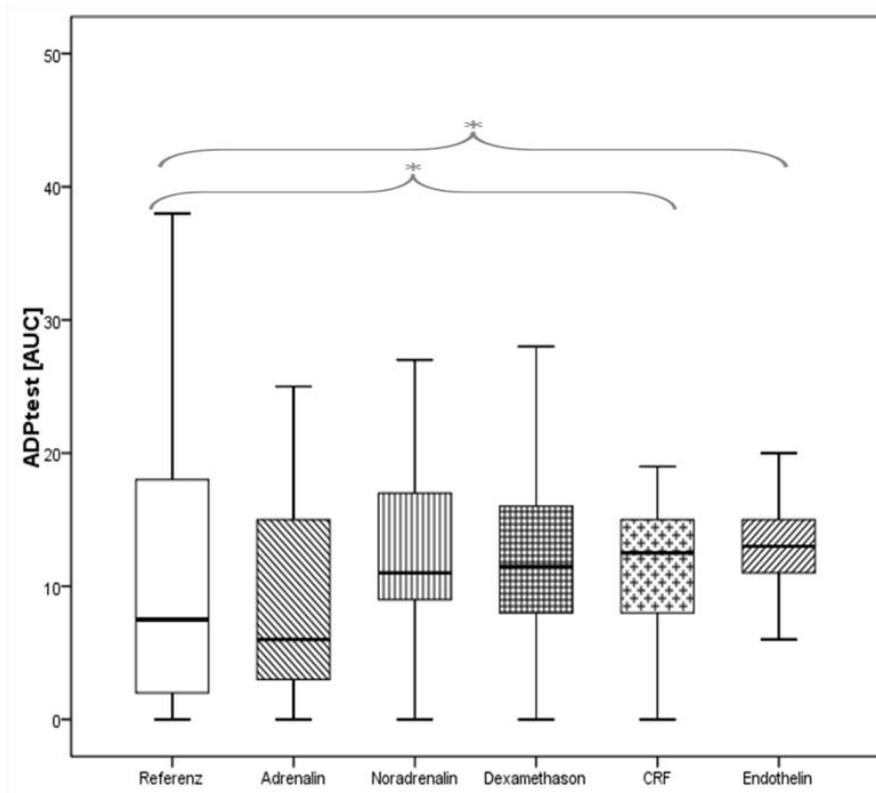


Abbildung 29: ADP getriggerte Aktivität im Vergleich [AUC]

### ***TRAPtest:***

Bei der Auswertung der durch Thrombin receptor agonist Peptide provozierten Aktivität muss in Ermangelung von Daten mit eine 3 minütigen Inkubation auf eine entsprechende

Gegenüberstellung verzichtet werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass durch die verlängerte Inkubation auch hier eine Senkung der Referenzwerte entsteht.

Die Messungen führten zu folgenden Ergebnissen (Median): Referenz (61). Adrenalin (34) und Noradrenalin (39) führten zu einem hochsignifikant verminderten Ansprechen auf TRAP. Für Dexamethason (65) und CRF (64) zeigte sich eine nicht signifikante Veränderung. Ein vermehrtes, aber nicht signifikant verändertes Ansprechen zeigte sich im Endothelin-Ansatz (76/vgl. Abbildung 30).

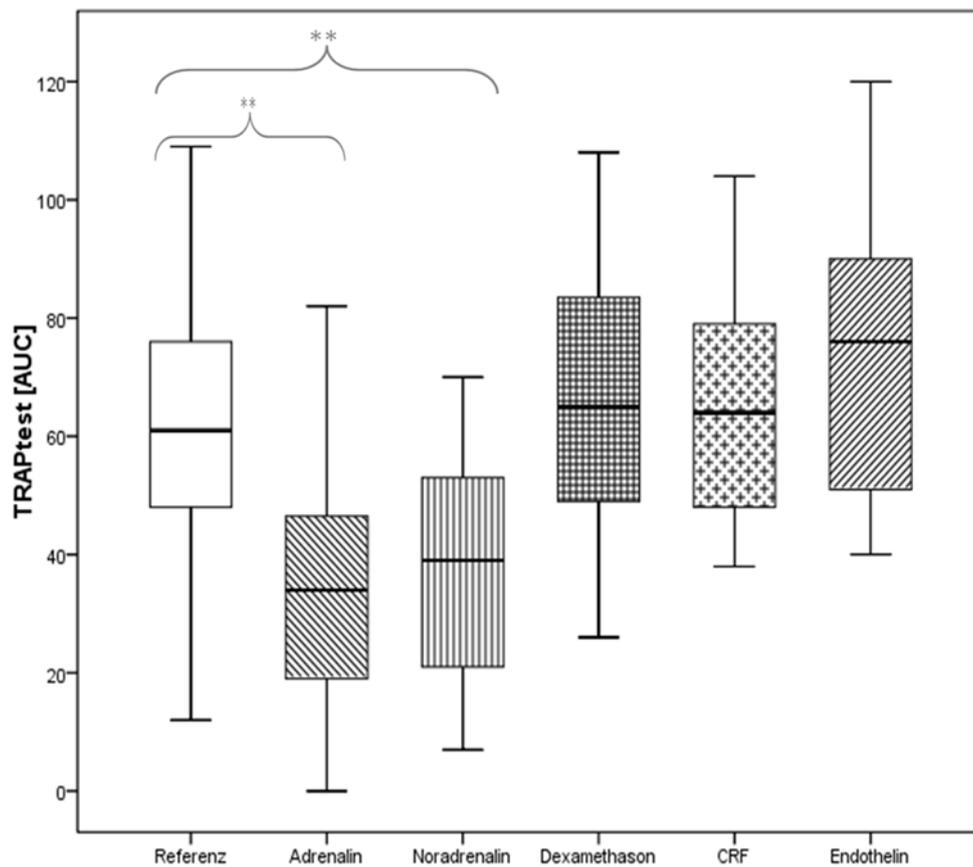


Abbildung 30: Reaktion auf TRAP im Vergleich der Stressfaktoren

### 3.3 Stressechokardiographie-Experiment

#### 3.3.1 Thrombozytenzahl

Bei 10 der 21 Probanden wurde neben der impedanzaggregometrischen Messung vorher und nachher die Thrombozytenzahl bestimmt. Ziel war es dabei berücksichtigen zu können, dass eine eventuelle Abnahme der Aktivität auch Zeichen eines Zellverbrauchs sein kann.

Die Thrombozytenzahl vor der Untersuchung war im Median 184.000/ $\mu\text{l}$ . Nach der Stressechokardiographie zeigte sich eine signifikante Abnahme der Zellzahl auf 160.500/ $\mu\text{l}$  (vgl. Abbildung 31).

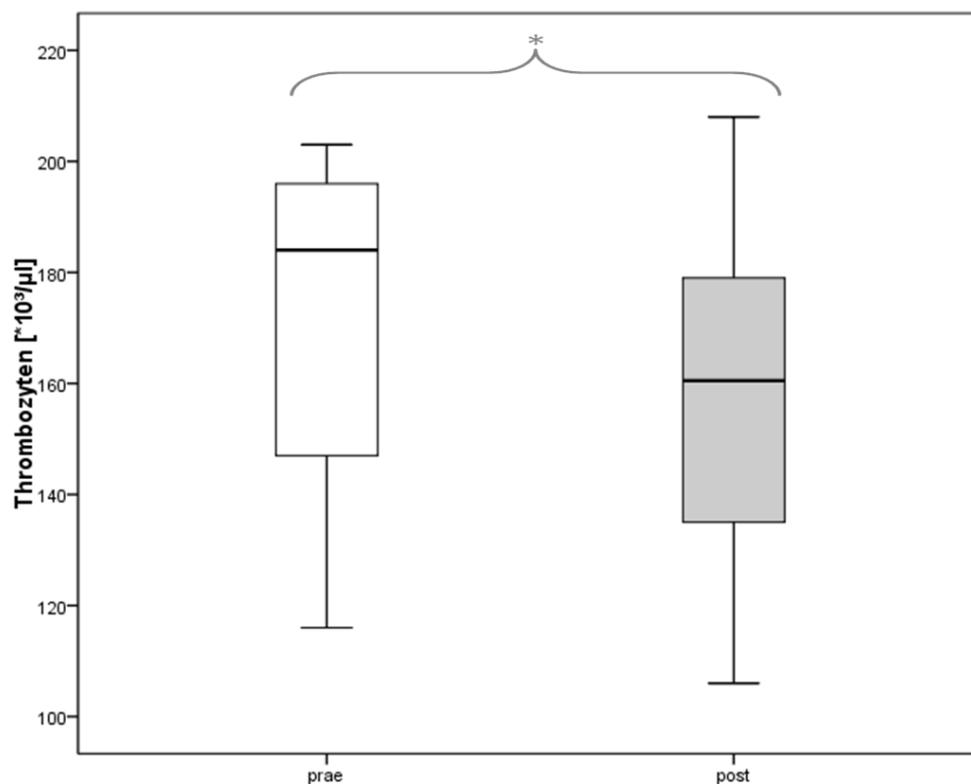


Abbildung 31: Thrombozytenzahl vor und nach Stressechokardiographie

### 3.3.2 Impedanzaggregometrie

Es wurden 21 Patienten untersucht.

#### *Spontanaggregation:*

Die spontane Aktivität sank von einem Median von 13 auf 10 ab. Der Abfall verfehlt im Wilcoxon Test die statistische Signifikanz klar (vgl. Abbildung 32).

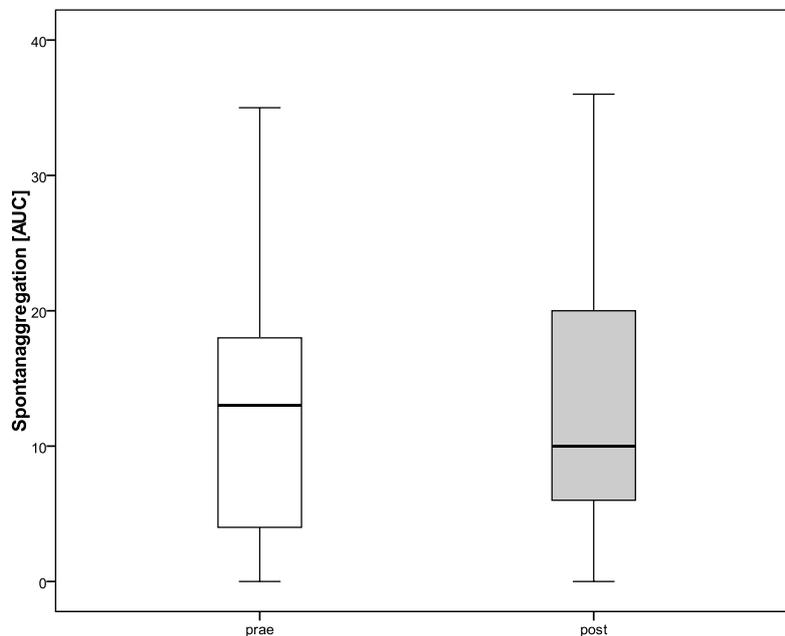


Abbildung 32: Spontanaggregation prae-post [AUC]

#### *ADPtest:*

Ebenfalls Abnahme der Aktivität. Prae: 67. Post: 54. Die Abnahme im ADPtest ist jedoch statistisch hochsignifikant (vgl. Abbildung 33).

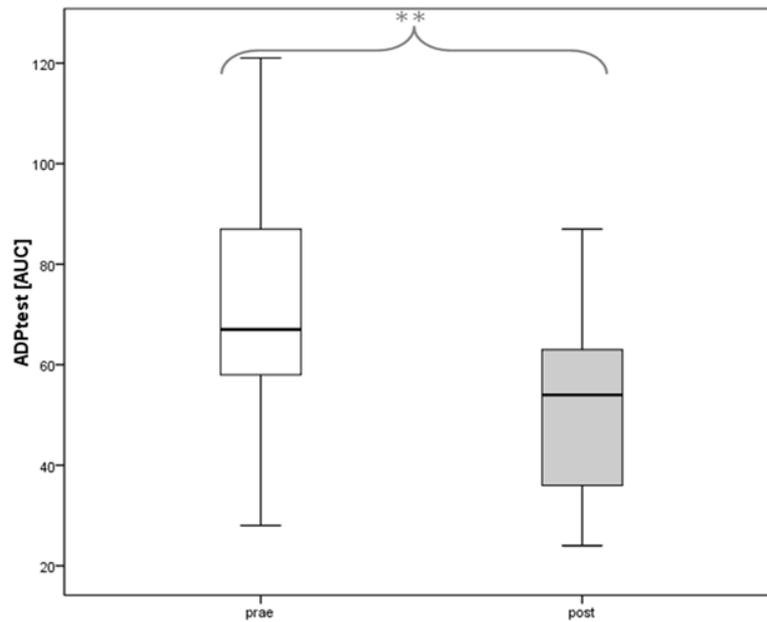


Abbildung 33: ADPtest prae-post [AUC]

**ASPItest:**

Es zeigt sich auch bei Aktivierung über den Cyclooxygenase Signalweg ein hochsignifikantes Abnehmen der auslösbaren Reaktion: Prae: 86. Post: 74,5 (vgl. Abbildung 34).

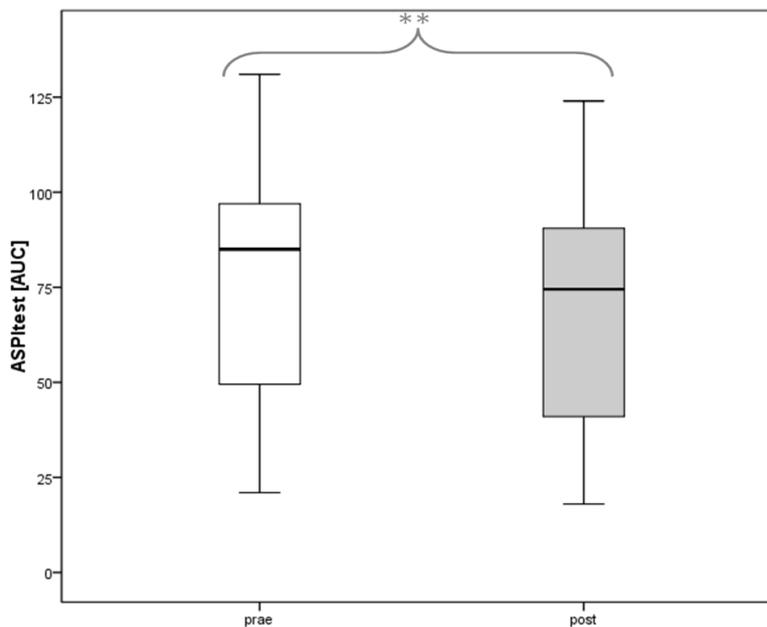


Abbildung 34: ASPItest prae-post [AUC]

**TRAPtest:**

Die verminderte Aktivierbarkeit über den ADP und Arachidonsäure Signalweg zeigt sich auch für den Thrombin Signalweg.

Die Aktivität nach Stimulation mit TRAP sinkt ausgehend von 111 hochsignifikant auf 91 (vgl. Abbildung 35).

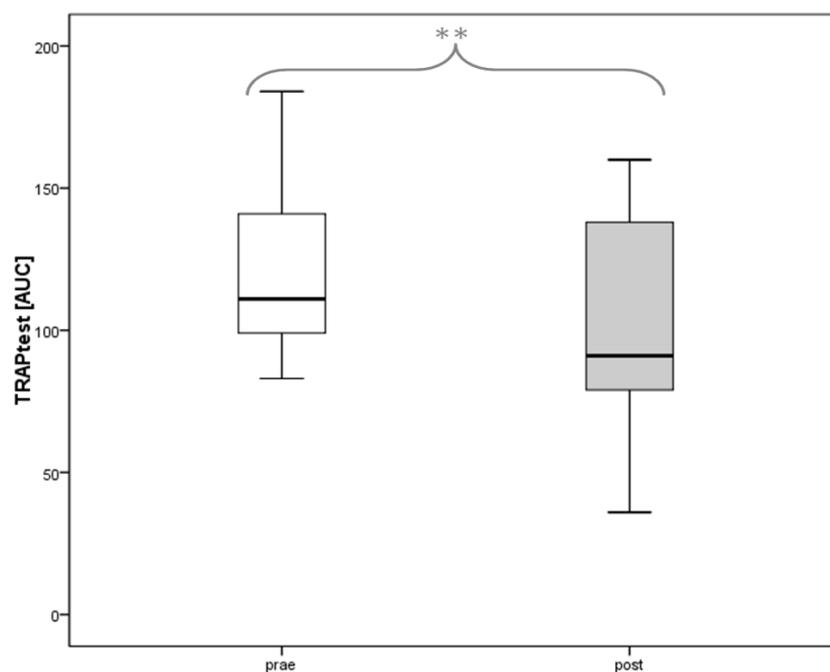


Abbildung 35: TRAPtest prae-post [AUC]

## 4. Diskussion

### *4.1 Auswirkung von Stress auf Thrombozyten*

#### **Impedanzaggregometrische Ergebnisse der BeMaGIC Studie:**

Betrachtet man die spontane Aggregation, die als sensitivste Methode zur Veränderung des Aktivitätszustandes gesehen werden kann, zeigt sich folgendes Bild:

Die Phase zwischen V1 und V2, in der die Sportler sich in den letzten Wochen des Trainings vor dem Marathon befanden und bereits eine Aufsättigung mit den Studiengetränken stattfand, bewirkt eine hochsignifikante Zunahme der thrombozytären Aktivität. Dieser Effekt ist auf den ersten Blick unerwartet, da die Athleten laut Einschlusskriterien von einem hohen Trainingsstand starteten und ihr gezieltes Training auf den Marathon weit vor der Dreiwochenfrist aufnahmen. Dieser Anstieg kann daher als Ausdruck einer gesteigerten Trainingsintensität im Sinne eines Übertrainings gesehen werden.

Der starke Aktivitätsanstieg post Marathon (+ 200% im Vergleich zu V1) bildet einen erheblichen, thrombozytenaktivierenden Effekt des körperlichen Stresses im Rahmen des Rennens ab. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Marathonlauf kam es zu einer vollständigen Rückbildung der Aktivitätszunahme, sodass V4 wieder auf dem Niveau von V1 liegt. Als eine mögliche Erklärung könnte entweder eine aktive Gegenregulation (z.B. von Seiten des Endothels aus) oder eine „Erschöpfung“ der Aktivität der Thrombozyten gelten. Eine dritte mögliche Erklärung wäre eine Abnahme der Thrombozytenzahlen und die damit verbundene Verfälschung der Messergebnisse, was aber ausgeschlossen werden konnte (vgl. Abbildung 14). Auffällig ist auch, dass die Aktivität zwischen 24 und 72 Stunden post Marathon erneut zunimmt, sodass am Ende der Studie eine hochsignifikante Zunahme der

Aktivität gegenüber des Ausgangsniveaus bestehen bleibt. Eine mögliche Ursache könnte der Einfluss eines post Marathon entstehenden proinflammatorischen Milieus<sup>72,73</sup> im Körper sein, das aktivitätssteigernd auf Thrombozyten wirken kann<sup>74</sup>.

Diese Ergebnisse werden, bis auf den Anstieg zwischen V1 und V2, auch von den Resultaten des ADPtests bestätigt. Betrachtet man die gute Korrelation der Messwerte im Multiplate ADPtest und die klinische Neigung zu arteriellen Thrombosen, z.B. im Rahmen kardiologischer interventioneller Verfahren, wird die klinische Bedeutung der Thrombozytenaktivierung im Rahmen des Marathonlaufes, wie hier beschrieben, deutlich.

#### **P-Selectin BeMaGIC Studie:**

P-Selectin, auch CD62P, GMP140 oder PADGEM<sup>75,76</sup>, ist ein Adhäsionsmolekül. Es findet sich in den  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten und den Weibel Palade Bodies der Endothelzellen<sup>75,77,78</sup>. Durch aktivierende Stimuli (z.B. inflammatorische, aggregationsauslösende sowie ischämische Reize) werden die membranständigen Moleküle an die Oberfläche gebracht<sup>20,79</sup>. Im weiteren Verlauf wird P-Selectin von der membrandurchspannenden Domäne durch Proteolyse abgelöst<sup>80</sup> und als soluble P-Selectin nachweisbar. Im Falle der Endothelzellen wird es hingegen endozytiert<sup>75</sup>. Der Prozess des Ablösens (shedding) betrifft dabei vor allem Moleküle auf Thrombozyten, sodass der Serumspiegel an sP-Selectin größtenteils thrombozytären Ursprungs ist<sup>75,81,82</sup> und somit als entsprechender Marker für Thrombozytenaktivität über eine größere Zeitspanne gesehen werden kann. Außerdem wird der Serumspiegel von sP-Selectin klinisch als Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse (auf Grundlage einer bestehenden koronaren Herzerkrankung) gesehen<sup>75,83</sup>. Zudem werden erhöhte Spiegel bei Patienten mit hypertensiven<sup>84</sup>, hyperlipidämischen<sup>84</sup> sowie atherosklerotischen Erkrankungen beschrieben<sup>83,85</sup>.

In der BeMaGIC Studie zeigt sich über V1 zu V2 keine wesentliche Veränderung des sP-Selectins. Eine hochsignifikant Zunahme besteht hingegen zu V3, die auch am Tag 1 post Marathon (V4) bestehen bleibt. Es lässt sich also im Vergleich zur Impedanzaggregometrie erkennen, dass die Rückbildung langsamer erfolgt. Dies erstaunt jedoch nicht. Die Messung bei V3 in der Impedanzaggregometrie muss als Momentaufnahme der Aktivität betrachtet werden. Auch wenn 24 h später (V4) die Momentaufnahme ein sehr inaktives Bild zeigt, muss davon ausgegangen werden, dass in den Stunden nach der Blutentnahme bei V3 eine nach wie vor erhöhte Aktivität mit entsprechendem Shedding von P-Selectin stattgefunden hat. Somit erklärt sich, dass der sP-Selectin Wert von V4 zwar geringer als V3 (nicht signifikant) ist, jedoch immer noch auf hohem Niveau verbleibt. Der Rückgang der sP-Selectin Spiegel erfolgt erst später, es erreicht bei V5 wieder das Ausgangsniveau. Der in der Impedanzaggregometrie gemessene Anstieg zwischen V1 und V2 sowie zwischen V4 und V5 schlägt sich somit nicht im sP-Selectin nieder.

Betrachtet man die Aussagekraft von Impedanzaggregometrie und sP-Selectin so ist klar, dass im Fall der Impedanzaggregometrie eine Momentaufnahme der thrombozytären Aktivität, im Fall des sP-Selectin Spiegels eine Abbildung der Aktivität über einen erheblich längeren Zeitraum widerspiegelt. Es muss also davon ausgegangen werden, dass der Effekt des Verumgetränks nicht stark genug war, um diesen längerfristigen Marker zu beeinflussen.

### **Endothelin-1 BeMaGIC Studie:**

Endothelin-1 ist ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptid<sup>70</sup>, das im Endothel produziert wird und große vasokonstriktive Wirkung besitzt<sup>69</sup>. Es ist bekannt, dass Erkrankungen wie Myokardinfarkt, koronare Herzerkrankung als Ausdruck einer endothelialen Dysfunktion oder disseminierte intravasale Gerinnung<sup>65,69</sup> ebenso zu erhöhten Endothelin-1 Spiegeln führen wie eine direkte Schädigung des Endothels z.B. durch chirurgische oder

interventionelle Manipulationen<sup>69</sup>. Aktuelle Untersuchungen haben gezeigt, dass die Endothelinspiegel bei Myokardinfarkten in Abhängigkeit vom Trigger differieren. So waren die Spiegel bei Patienten mit stressinduziertem Myokardinfarkt ca. zweimal so hoch wie in einer Referenzgruppe (Myokardinfarkten ohne ursächliches Stressereignis)<sup>65</sup>.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das „Stressmodell Marathon“ einen hochsignifikanten Anstieg des Endothelin-1 Spiegels induzierte (zwischen V2 und V3), bereits 24 Stunden nach dem Marathonlauf war der Spiegel nicht mehr signifikant erhöht.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass körperliche Extremlast einen hochsignifikanten Anstieg des Endothelin-1 Spiegels im Vergleich zum Ausgangswert um ca. 13% induzierte.

### **In vitro Studie:**

Intention der Studie war es zu untersuchen, ob etablierte Stressfaktoren, die bei emotionalem und physischem Stress involviert sind, Thrombozytenaktivität beeinflussen können, um so mögliche erklärende Erkenntnisse für die Resultate der BeMaGIC Studie zu gewinnen. Als Kontrolle der externen Validität unserer Studie untersuchten wir auch die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin, für die bereits ein aktivierender Effekt beschrieben ist<sup>67,86-88</sup>.

Die durchflusszytometrische Messung zeigte für die Katecholamine und CRF einen signifikanten aktivierenden Effekt auf Thrombozyten, für Dexamethason und Endothelin-1 jedoch nicht.

Im Rahmen der Impedanzaggregometrie konnte eine signifikante Zunahme der Spontanaggregation für Noradrenalin sowie einer signifikanten Abnahme für Endothelin-1 dokumentiert werden. Hierbei ist aber zu berücksichtigen, dass die verlängerte

Inkubationszeit von dreißig Minuten, anstatt wie vom Entwickler empfohlenen drei Minuten, einen Einfluss auf die Messergebnisse hatte. Wir wissen jedoch aus Voruntersuchungen, dass die Zunahme unter Noradrenalin auch besteht, wenn die Inkubationszeit standardmäßige drei Minuten beträgt. Zudem ist aus der Literatur bekannt, dass der Einfluss von Noradrenalin aktivitätssteigernd ist. Somit kann der unter unseren Untersuchungsbedingungen (dreißig Minuten Inkubationszeit) gemessene erhöhte Wert der Spontanaggregation als Steigerung der Aktivität gedeutet werden.

Analog hierzu ist die Verringerung der spontanen Aktivität durch Endothelin-1 als Thrombozytenhemmung zu interpretieren.

Im Rahmen des ADPtest wurde eine nicht signifikante Abnahme der Thrombozytenaktivität durch Adrenalin gemessen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte ein Erschöpfen der Reaktionsfähigkeit der Thrombozyten auf ADP bei einer verlängerten Inkubationszeit (30 Minuten) sein. Die Thrombozyten waren während der halbstündigen Inkubationsphase schon so aktivitätsgesteigert, dass nach Zugabe von ADP nur noch eine verringerte Antwort auslösbar war.

Durch CRF und Endothelin-1 kam es unter dem verwendeten Messprotokoll (30 Minuten Inkubationszeit) zu einer Abnahme der Thrombozytenaktivität, wobei im Gegensatz zu der Messung unter Adrenalin ein erhöhter Impedanzwert dokumentiert wurde. Die Thrombozyten waren (im Gegensatz zu der Messung unter Adrenalin) vor Testbeginn (30 Minuten der Inkubation) in ihrer Aktivität gemindert, sodass eine stärkere Antwort auf den Aktivator nach 30 Minuten überhaupt möglich war. Allerdings muss angemerkt werden, dass sich die impedanzaggregometrischen Ergebnisse für CRF nicht mit denen der Durchflusszytometrie decken (Zunahme von P-Selectin positiven Thrombozyten).

Für den TRAPtest zeigte sich unter Katecholaminstimulation ein hochsignifikanter Rückgang der Impedanzwerte im Vergleich zur Referenz, diese Beobachtungen sind somit konkordant zu den Resultaten des ADPtests.

Im TRAPtest zeigte sich unter Endothelin-1-Stimulation eine tendenzielle Thrombozytenhemmung, die jedoch die statistische Signifikanz verpasste.

In Zusammenschau der erhobenen Ergebnisse muss nochmals darauf hingewiesen werden, dass, im Gegensatz zum vom Hersteller als standardisiert vorgegebenen Verfahren mit dreiminütiger Inkubationszeit, unsere Ergebnisse (evaluiert mit 30 minütiger Inkubationszeit) nur unter den bereits aufgeführten Vorbehalten interpretiert werden können.

Somit lässt sich als gesichertes Ergebnis der In Vitro Studie lediglich der aktivierende Effekt der Katecholamine auf Thrombozyten bezeichnen. Zudem kann postuliert werden, dass Dexamethason und Endothelin-1 keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil von P-Selectin positiven Thrombozyten haben.

### **Stressechokardiographie-Experiment:**

Ziel war es, den Einfluss von Stress (in vivo Katecholamingabe) auf Thrombozyten zu untersuchen. Wir konnten zeigen, dass es hierbei zu einer signifikanten Abnahme der Thrombozytenzahl (ca. 13 %) kam, als Ausdruck eines möglichen aktivierungsbedingten Zellverlustes. Die hochsignifikanten Rückgänge der Messwerte in den aktivierten Messungen (ADPtest, ASPItest und TRAPtest) sind somit aufgrund der reduzierten Thrombozytenzahl und nicht als primäre Verringerung der Aktivität zu interpretieren. Eine weitere Erklärung könnte die Erschöpfung der thrombozytären Aktivierbarkeit durch die Dobutamingabe darstellen.

Die Spontanaggregation zeigte in der Studie keine signifikante Veränderung.

## **4.2 Einordnung in den Stand der Wissenschaft**

Der Einfluss sportlicher Aktivität auf das plasmatische und das zelluläre Gerinnungssystem ist schon seit mehreren Jahrzehnten im Focus wissenschaftlicher Untersuchungen, die Ergebnisse sind jedoch diskordant<sup>89</sup>, was wohl vor allem auf die großen Unterschiede der verwendeten Protokolle (Trainingszustand der Probanden, Art der sportlichen Belastung von wenigen Minuten bis hin zum Marathonlauf, experimentelle Methodik) zurückzuführen ist<sup>90</sup>.

Gesichert zu sein scheint auf plasmatischer Seite eine Verkürzung der aktivierten partiellen Thromboplastin Zeit bei gleichzeitiger Steigerung der fibrinolytischen Aktivität. Die beiden „gegenläufigen Systeme“ scheinen somit unter sportlicher Aktivität im Gleichgewicht zu sein<sup>90</sup>.

Kritisch ist die Situation am atherosklerotisch vorgeschädigtem Endothel, da dort die entsprechende Steigerung der antikoagulativen Aktivität nicht geleistet werden kann, wie Känel et al. im mentalen Stressmodell zeigen konnte<sup>91</sup>.

Für Thrombozyten gilt eine Stress-induzierte Zunahme der Zellzahl durch Freisetzung aus Kompartimenten wie der Milz und dem Knochenmark als gesichert<sup>90,92</sup>, dieser Effekt konnte in der hier vorgelegten Arbeit auch beobachtet werden, jedoch in viel geringerem Maße als in der Literatur beschrieben (18-80%<sup>92</sup> vs. 6,5%). Anzumerken ist aber, dass in den entsprechenden Publikationen nicht zu entnehmen ist, ob Verschiebungen des Plasmavolumens bei der Bestimmung der Thrombozytenzahl (wie in unserer Studie) berücksichtigt wurden.

Verschiedene Untersuchungen beschreiben darüber hinaus eine Aktivitätszunahme von Thrombozyten (z.B. getriggerte Aggregation, P-Selectin oder Thromboxan)<sup>92-95</sup>. Diese aktivierenden Effekte werden dabei von den Autoren vor allem durch erhöhte Katecholaminwerte erklärt<sup>92,96</sup>. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse (in vitro

Studie und Stressechokardiographie-Experiment) zum Einfluss von Katecholaminen auf die Thrombozytenfunktion stimmen somit mit denen der Literatur überein.

Als diskordantes Ergebnis sei z.B. die Studie von Rock et al. genannt, die 1997 in einem Marathonmodell einen hemmenden Effekt auf Thrombozyten<sup>97</sup> beschreibt. Daneben zeigten weitere Untersuchungen einen hemmenden Effekt von Sport (verschiedener Intensität) auf Thrombozyten<sup>92,98,99</sup>. Als mögliche Erklärung wird eine überschießende thrombozytenhemmende Prostaglandinfreisetzung angeführt<sup>92</sup>.

Insgesamt muss man die Untersuchungen zum Effekt von körperlicher Belastung auf Thrombozyten wie folgt zusammenfassen: gesicherte Zunahme der Zellzahl, unklarer Effekt auf die Aktivität (steigernd, hemmend, kein Effekt)<sup>100</sup>.

Als Begründung für diese widersprüchlichen Ergebnisse fallen vor allem folgende Punkte ins Auge:

- Die Studienprotokolle sind zu unterschiedlich um vergleichbar zu sein (Trainingszustand, Art der Belastung)
- Die Studien sind bis auf wenige Ausnahmen von geringer bis sehr geringer Fallzahl (10-20 Probanden)
- Die experimentelle Methodik, vor allem in älteren Studien (optische Aggregometrie), ist, was die Sensitivität und vor allem die Reproduzierbarkeit der Aktivitätsmessung anbelangt, nicht mit dem modernen Multiplate Verfahren vergleichbar<sup>101</sup>

Da die Studie von Rock et al.<sup>97</sup>, analog zu der hier vorgestellten Arbeit, im Modell Marathonlauf an trainierten Athleten die Thrombozytenaktivierung untersuchte, möchte ich im Folgenden auf die diskordanten Ergebnisse (Abnahme der Aktivität) eingehen.

Im Gegensatz zu Rock et al. (geringe Fallzahl von 12 Männern und 2 Frauen), wurde in unserer Studie eine große Fallzahl (115 Probanden) untersucht. Zudem ist erwähnenswert, dass zwar eine geringe auslösbare Aggregation dokumentiert wird, gleichzeitig aber

Serummarker der thrombozytären Aktivierung ( $\beta$ -Thromboglobulin, ein Marker für die Ausschüttung von  $\alpha$ -Granula<sup>97</sup>) als stark erhöht post Marathon beschrieben werden. Zu erwarten wäre hingegen bei gering gesteigerter Aggregation lediglich eine geringe Erhöhung der Serummarker, bzw. ein Ausbleiben des Anstiegs von Serummarkern falls keine Thrombozytenaktivierung stattgefunden hat.

In unseren Untersuchungen an 115 Probanden zeigte sich ein eindeutiger aktivitätssteigernder Effekt des Marathonlaufs auf die Thrombozytenfunktion sowohl in der Impedanzaggregometrie als auch ergänzend in der Messung von sP-Selectin. Einen weiteren interessanten Bericht aus dem klinischen Umfeld, der unsere Beobachtung der Thrombozytenaktivierung stützt, lieferte Zwart et al. 2010<sup>102</sup>. In einem klinischen Case Report werden drei Fälle von späten sowie sehr späten Stentthrombosen bei Wiederaufnahme von körperlicher Belastung im Rahmen von Fahrradfahren bzw. Fahrradergometertraining beschrieben.

### ***4.3 Der Einfluss der Flavonoide – Deutung der Erkenntnisse aus der BeMaGIC Studie***

Es ist davon auszugehen, dass die Effekte der Flavonoide auf die Thrombozytenaktivität im Rahmen des Marathons geringer ausgefallen sind als vor der Studie angenommen. Nur etwa 10 bis 15 % der Probanden haben die vorgesehene Trinkmenge (1,5 l/die) tatsächlich getrunken (vgl. 2.1.2 Zeitlicher Ablauf der BeMaGIC Studie sowie 3.1.1 Trinkmengen), möglicherweise wird dadurch ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen verpasst.

Interessanterweise zeigt sich jedoch für die obere Quartile der „Konsumenten“ ein komplett unterschiedliches Verlaufsbild der Spontanaggregation (vgl. Abbildung 16, Abbildung 18). Stimmten die Verläufe zwischen V1, V2 (prae Marathon) und V4, V5 (post Marathon) noch überein, fehlt der aktivierende Effekt durch den Marathonlauf in der oberen Quartile vollständig. Ein Vergleich der Trinkmengen-Quartilen in der Placebogruppe konnte ausschließen, dass diese Effekte durch unterschiedliche Volumenaufnahme zustande kommen. Sonst bestanden keine Unterschiede zwischen Placebogruppe und der oberen Verumquartile. Als Erklärung verbleibt somit nur die Flavonoidaufnahme, die, wie hier gezeigt, zu einer Blockierung der Stress-induzierten Thrombozytenaktivierung führte.

Li et al. sowie auch Wallen et al. versuchten in ihren Untersuchungen zur Aktivierung von Thrombozyten durch Sport entsprechende Effekte mit Acetylsalicylsäure zu hemmen. Es zeigte sich zwar, dass die Thrombozyten in Ruhe weniger aktiv waren, eine Aktivierung durch den körperlichen Stress konnte jedoch dadurch (im Gegensatz zu den Flavonoiden in unserer Studie) nicht verhindert werden<sup>95,103</sup>.

## **4.4 Limitationen**

### **4.4.1 BeMaGIC Studie**

Die organisatorische sowie technische Abwicklung der Versuche garantiert die Validität der Ergebnisse. Es muss jedoch einschränkend erwähnt werden, dass die Vorgabe hinsichtlich der Trinkmenge der Studiensubstanz nicht optimal umgesetzt wurde. Die gewünschte Trinkmenge von 1,5 l/die wurde nicht einmal von den 25% der Sportler erreicht, die am meisten Studiengetränk zu sich nahmen (obere Quartile/vgl. Abbildung 15). Es muss also festgehalten werden, dass nicht der Effekt der geplanten Dosis an Flavonoiden getestet wurde, sondern ein geringerer (im Median 1,20l/die).

### **4.4.2 in Vitro Studie**

Kritisch erwähnt werden muss hier der unerwartet starke Effekt durch die methodisch notwendigerweise verlängerten Inkubationszeit auf 30 Minuten (vgl. Abbildung 26, Abbildung 28). Diese Verlängerung bewirkte über ein kontinuierliches Anlagern der aktiven Thrombozyten an die Messelektroden eine Unsicherheit hinsichtlich der tatsächlichen getriggerten Aktivität.

### **4.4.3 Stressechokardiographie-Experiment**

Die gesamte Durchführung verlief wie geplant, es ergeben sich keine Zweifel an konzeptioneller oder methodischer Korrektheit der Untersuchungen.

## **4.5 Ausblick**

Die große Bedeutung der Atherosklerose und der wesentliche Beitrag der Thrombozyten im Zusammenspiel mit entzündlichen Zellen bei der Atherogenese lassen jede mögliche präventive Beeinflussung dieser Interaktionen als sinnhaft erkennen.

Es ist davon auszugehen, dass der aktivitätssteigernden Effekt von Stress, in unserem Modell dargestellt durch körperliche Extremlast bzw. Katecholamine, über die eingangs ausführlich dargestellten Vernetzungen in der Atherogenese im Langzeiteffekt Atherosklerose mitsamt ihrer Folgeerkrankungen fördert. Möhlenkamp et al.<sup>104</sup> konnten 2008 in einer Untersuchung an Marathonläufern zeigen, dass diese Athleten von Koronarverkalkungen betroffen waren in einem Maße, das mit konventionellen kardiovaskulären Risikofaktoren nicht zu erklären war und somit unsere These der Begünstigung der Atherogenese durch körperlichen Stress unterstützt. Anhand der oberen Quartile der Verumtrinkgruppe konnten wir einen protektiven Effekt durch Flavonoide zeigen. Berechtigterweise kann man diesen, in einer Subgruppe gesehenen Effekt, noch nicht als allgemeingültig verstehen, die dargestellten Ergebnisse sollten jedoch Anlass für weitere Untersuchungen sein. Zum einen muss untersucht werden, ob durch eine längere Anwendung bzw. Erhöhung der Dosis die Effekte steigerbar sind. Zum anderen wird zu prüfen sein, inwieweit sich die Ergebnisse auf andere Qualitäten des Stresses (z.B. emotionaler Stress) übertragen lassen. Im Hinblick auf die klinische Relevanz wird der wesentliche Aspekt die pharmakologische Erforschung auf Sicherheit und Wirksamkeit bei Patienten mit atherosklerotischen Erkrankungen sein.

## 5. Zusammenfassung

Die Atherosklerose nimmt aktuell eine führende Rolle hinsichtlich Morbidität und Mortalität ein. Da die Prävalenz weiter steigt, ist es erforderlich, zusätzliche kardiovaskuläre Risikofaktoren zu erforschen um die individuelle Risikoabschätzung zu optimieren und eine Intensivierung medikamentöser und nicht-medikamentöser präventiver Maßnahmen zu ermöglichen. Untersuchungen der letzten Jahre zeigten ursächlich ein hochkomplexes Zusammenspiel von Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen in der Initiation sowie Progression der Atherosklerose.

Stress, in seiner Vielfältigkeit der Formen immer über feststehende Stressachsen ablaufend, konnte als Atherosklerose begünstigend nachgewiesen werden. Als ein möglicher pathophysiologischer Mechanismus sollte daher in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Stress auf Thrombozyten untersucht werden.

In der Literatur konnten in in vitro Modellen Flavonoide vielversprechende Thrombozytenhemmende Effekte zeigen, ihr protektives Potential hinsichtlich der stressinduzierten Aggregationssteigerung wurde daher in dieser Arbeit in einem in vivo Modell untersucht.

Wir konnten zeigen, dass Stress (in vivo anhand des Marathonmodells) sowie die direkte Gabe von Katecholaminen (in vivo im Rahmen der Stressechokardiographie bzw. in vitro durch die Applikation von verschiedenen Stresshormonen) eine deutliche Aktivierung von Thrombozyten bewirkt. Im Falle des Marathonlaufes wurde die spontane Aktivität im Vergleich zum Ausgangsniveau gar auf das dreifache gesteigert.

Im Gegensatz zu Versuchen mittels Acetylsalicylsäure bewirkten die Flavonoide unseres Studiengetränkes einen vollständig hemmenden Effekt auf die Thrombozytenaktivierung.

Somit konnte erstmalig in einem in vivo Modell ein eindeutig protektiver Effekt der Flavonoide im Hinblick auf thrombozytäre Aktivierung dargestellt werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich eine thrombozytäre Hyperaktivität auf die Entstehung sowie die Progression atherosklerotischer Läsionen negativ auswirkt. Es wird im Folgenden zu prüfen sein, ob sich die beobachteten Effekte durch Steigerung der Flavoniddosis verstärken lassen. Zudem ist zu erforschen, ob Flavonoide auch bei Patienten mit bereits bestehender Atherosklerose in der Lage sind, ihr Thrombozyten-inhibierendes Potential zu entfalten.

## Literaturverzeichnis

1. Wilbert-Lampen U. Experimentelle und epidemiologische Untersuchungen zu Stressvermittelten kardiovaskulären Erkrankungen: Von der Endothel- und Monozytendysfunktion zu akuten kardialen Ereignissen. 2009.
2. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. Nov 1999;138(5 Pt 2):S419-420.
3. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. Apr 21 2005;352(16):1685-1695.
4. van Oostrom AJ, van Wijk J, Cabezas MC. Lipaemia, inflammation and atherosclerosis: novel opportunities in the understanding and treatment of atherosclerosis. *Drugs*. 2004;64 Suppl 2:19-41.
5. Alipour A, Elte JW, van Zaanen HC, Rietveld AP, Cabezas MC. Postprandial inflammation and endothelial dysfunction. *Biochem Soc Trans*. Jun 2007;35(Pt 3):466-469.
6. Norata GD, Grigore L, Raselli S, et al. Post-prandial endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic subjects: molecular mechanisms and gene expression studies. *Atherosclerosis*. Aug 2007;193(2):321-327.
7. Desideri G, Ferri C. Endothelial activation. Sliding door to atherosclerosis. *Curr Pharm Des*. 2005;11(17):2163-2175.
8. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. Jul 17 2001;104(3):365-372.
9. Massberg S, Brand K, Gruner S, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*. Oct 7 2002;196(7):887-896.
10. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 1 1995;92(16):7450-7454.
11. Frenette PS, Mayadas TN, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell*. Feb 23 1996;84(4):563-574.
12. Massberg S, Enders G, Leiderer R, et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood*. Jul 15 1998;92(2):507-515.
13. Massberg S, Enders G, Matos FC, et al. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood*. Dec 1 1999;94(11):3829-3838.
14. van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol*. Feb 2009;85(2):195-204.
15. Lippi G, Montagnana M, Salvagno GL, et al. Risk stratification of patients with acute myocardial infarction by quantification of circulating monocyte-platelet aggregates. *Int J Cardiol*. Jan 31 2007;115(1):101-102.
16. McCabe DJ, Harrison P, Mackie IJ, et al. Platelet degranulation and monocyte-platelet complex formation are increased in the acute and convalescent phases after ischaemic stroke or transient ischaemic attack. *Br J Haematol*. Jun 2004;125(6):777-787.

17. Fuster V, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation*. Oct 1994;90(4):2126-2146.
18. Keevil JG, Osman HE, Reed JD, Folts JD. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *J Nutr*. Jan 2000;130(1):53-56.
19. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost*. 2005;31(4):381-392.
20. Ikeda H, Takajo Y, Ichiki K, et al. Increased soluble form of P-selectin in patients with unstable angina. *Circulation*. Oct 1 1995;92(7):1693-1696.
21. Damas JK, Waehre T, Yndestad A, et al. Interleukin-7-mediated inflammation in unstable angina: possible role of chemokines and platelets. *Circulation*. Jun 3 2003;107(21):2670-2676.
22. Serebruany VL, Malinin A, Ong S, Atar D. Patients with metabolic syndrome exhibit higher platelet activity than those with conventional risk factors for vascular disease. *J Thromb Thrombolysis*. Apr 2008;25(2):207-213.
23. Davi G, Romano M, Mezzetti A, et al. Increased levels of soluble P-selectin in hypercholesterolemic patients. *Circulation*. Mar 17 1998;97(10):953-957.
24. Selye H. *The Stress of Life*: McGraw-Hill, New York; 1956.
25. Gutstein WH, Anversa P, Guideri G. Spasm of small coronary arteries and ischemic myocardial injury induced by hypothalamic stimulation in the rat. *Am J Pathol*. Nov 1987;129(2):287-294.
26. Delbende C, Delarue C, Lefebvre H, et al. Glucocorticoids, transmitters and stress. *Br J Psychiatry Suppl*. Feb 1992(15):24-35.
27. Grassi D, Desideri G, Croce G, Tiberti S, Aggio A, Ferri C. Flavonoids, vascular function and cardiovascular protection. *Curr Pharm Des*. 2009;15(10):1072-1084.
28. Janssen K, Mensink RP, Cox FJ, et al. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *Am J Clin Nutr*. Feb 1998;67(2):255-262.
29. Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. Dec 2000;52(4):673-751.
30. King A, Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J Am Diet Assoc*. Feb 1999;99(2):213-218.
31. Vita JA. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am J Clin Nutr*. Jan 2005;81(1 Suppl):292S-297S.
32. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. Oct 23 1993;342(8878):1007-1011.
33. Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*. Feb 24 1996;312(7029):478-481.
34. Keli SO, Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch Intern Med*. Mar 25 1996;156(6):637-642.
35. Yochum L, Kushi LH, Meyer K, Folsom AR. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am J Epidemiol*. May 15 1999;149(10):943-949.
36. Sesso HD, Gaziano JM, Buring JE, Hennekens CH. Coffee and tea intake and the risk of myocardial infarction. *Am J Epidemiol*. Jan 15 1999;149(2):162-167.

37. Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr.* May 2002;75(5):880-886.
38. Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med.* Feb 27 1995;155(4):381-386.
39. Demrow HS, Slane PR, Folts JD. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation.* Feb 15 1995;91(4):1182-1188.
40. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* Jun 20 1992;339(8808):1523-1526.
41. Freedman JE, Parker C, 3rd, Li L, et al. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation.* Jun 12 2001;103(23):2792-2798.
42. Hodgson JM, Puddey IB, Mori TA, Burke V, Baker RI, Beilin LJ. Effects of regular ingestion of black tea on haemostasis and cell adhesion molecules in humans. *Eur J Clin Nutr.* Oct 2001;55(10):881-886.
43. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* Dec 1995;33(12):1061-1080.
44. Neiva TJ, Morais L, Polack M, Simoes CM, D'Amico EA. Effects of catechins on human blood platelet aggregation and lipid peroxidation. *Phytother Res.* Nov 1999;13(7):597-600.
45. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta.* Mar 31 1995;235(2):207-219.
46. Pignatelli P, Pulcinelli FM, Celestini A, et al. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *Am J Clin Nutr.* Nov 2000;72(5):1150-1155.
47. Osman HE, Maalej N, Shanmuganayagam D, Folts JD. Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys. *J Nutr.* Dec 1998;128(12):2307-2312.
48. Chang WC, Hsu FL. Inhibition of platelet activation and endothelial cell injury by flavan-3-ol and saikosaponin compounds. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* Sep 1991;44(1):51-56.
49. Rimm EB, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med.* Sep 1 1996;125(5):384-389.
50. Conquer JA, Maiani G, Azzini E, Raguzzini A, Holub BJ. Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *J Nutr.* Mar 1998;128(3):593-597.
51. Duffy SJ, Vita JA, Holbrook M, Swerdloff PL, Keaney JF, Jr. Effect of acute and chronic tea consumption on platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Jun 2001;21(6):1084-1089.
52. Rein D, Paglieroni TG, Wun T, et al. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr.* Jul 2000;72(1):30-35.
53. Srivastava KC. Effect of onion and ginger consumption on platelet thromboxane production in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* Mar 1989;35(3):183-185.

54. Pearson DA, Paglieroni TG, Rein D, et al. The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on ex vivo platelet function. *Thromb Res.* May 15 2002;106(4-5):191-197.
55. Murphy KJ, Chronopoulos AK, Singh I, et al. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *Am J Clin Nutr.* Jun 2003;77(6):1466-1473.
56. Beretz A, Anton R, Stoclet JC. Flavonoid compounds are potent inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase. *Experientia.* Aug 15 1978;34(8):1054-1055.
57. Ruckstuhl M, Beretz A, Anton R, Landry Y. Flavonoids are selective cyclic GMP phosphodiesterase inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 1979;28(4):535-538.
58. Nardini M, Natella F, Scaccini C. Role of dietary polyphenols in platelet aggregation. A review of the supplementation studies. *Platelets.* May 2007;18(3):224-243.
59. Landolfi R, Mower RL, Steiner M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol.* May 1 1984;33(9):1525-1530.
60. Son DJ, Cho MR, Jin YR, et al. Antiplatelet effect of green tea catechins: a possible mechanism through arachidonic acid pathway. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* Jul 2004;71(1):25-31.
61. Pignatelli P, Di Santo S, Buchetti B, Sanguigni V, Brunelli A, Violi F. Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment. *FASEB J.* Jun 2006;20(8):1082-1089.
62. Nickel T, Deutschmann A, Hanssen H, Summo C, Wilbert-Lampen U. Modification of endothelial biology by acute and chronic stress hormones. *Microvasc Res.* Dec 2009;78(3):364-369.
63. Wilbert-Lampen U, Straube F, Trapp A, Deutschmann A, Plasse A, Steinbeck G. Effects of corticotropin-releasing hormone (CRH) on monocyte function, mediated by CRH-receptor subtype R1 and R2: a potential link between mood disorders and endothelial dysfunction? *J Cardiovasc Pharmacol.* Jan 2006;47(1):110-116.
64. Wilbert-Lampen U, Trapp A, Modrzik M, Fiedler B, Straube F, Plasse A. Effects of corticotropin-releasing hormone (CRH) on endothelin-1 and NO release, mediated by CRH receptor subtype R2: a potential link between stress and endothelial dysfunction? *J Psychosom Res.* Oct 2006;61(4):453-460.
65. Wilbert-Lampen U, Nickel T, Leistner D, et al. Modified serum profiles of inflammatory and vasoconstrictive factors in patients with emotional stress-induced acute coronary syndrome during World Cup Soccer 2006. *J Am Coll Cardiol.* Feb 16 2010;55(7):637-642.
66. Harbeck B, Kropp P, Monig H. Effects of short-term nocturnal cortisol replacement on cognitive function and quality of life in patients with primary or secondary adrenal insufficiency: a pilot study. *Appl Psychophysiol Biofeedback.* Jun 2009;34(2):113-119.
67. Tschuor C, Asmis LM, Lenzlinger PM, et al. In vitro norepinephrine significantly activates isolated platelets from healthy volunteers and critically ill patients following severe traumatic brain injury. *Crit Care.* 2008;12(3):R80.
68. Jagroop IA, Daskalopoulou SS, Mikhailidis DP. Endothelin-1 and human platelets. *Curr Vasc Pharmacol.* Oct 2005;3(4):393-399.
69. Knofler R, Urano T, Malyszko J, Takada Y, Takada A. In vitro effect of endothelin-1 on collagen, and ADP-induced aggregation in human whole blood and platelet rich plasma. *Thromb Res.* Jan 1 1995;77(1):69-78.
70. Touyz RM, Lariviere R, Schiffrin EL. Endothelin influences pHi of human platelets through protein kinase C mediated pathways. *Thromb Res.* Apr 1 1995;78(1):55-65.

71. Touyz RM, Schiffrin EL. Role of protein kinase C in the anti-aggregatory effects of endothelin-1 on human platelets. *Clin Sci (Lond)*. Mar 1995;88(3):277-283.
72. Saravia SG, Knebel F, Schroeckh S, et al. Cardiac troponin T release and inflammation demonstrated in marathon runners. *Clin Lab*. 2010;56(1-2):51-58.
73. Pedersen BK. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise and cytokines. *Immunol Cell Biol*. Oct 2000;78(5):532-535.
74. Lippi G, Favalaro EJ, Montagnana M, Franchini M. Review: C-reactive protein and venous thromboembolism: causal or casual association? *Clin Chem Lab Med*. Aug 13 2010.
75. Blann AD, Lip GY. Hypothesis: is soluble P-selectin a new marker of platelet activation? *Atherosclerosis*. Feb 10 1997;128(2):135-138.
76. Metzelaar MJ, Korteweg J, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK. Comparison of platelet membrane markers for the detection of platelet activation in vitro and during platelet storage and cardiopulmonary bypass surgery. *J Lab Clin Med*. Apr 1993;121(4):579-587.
77. Shimomura H, Ogawa H, Arai H, et al. Serial changes in plasma levels of soluble P-selectin in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. Feb 15 1998;81(4):397-400.
78. Blann AD, Noteboom WM, Rosendaal FR. Increased soluble P-selectin levels following deep venous thrombosis: cause or effect? *Br J Haematol*. Jan 2000;108(1):191-193.
79. Curvers J, de Wildt-Eggen J, Heeremans J, Scharenberg J, de Korte D, van der Meer PF. Flow cytometric measurement of CD62P (P-selectin) expression on platelets: a multicenter optimization and standardization effort. *Transfusion*. Jul 2008;48(7):1439-1446.
80. Frijns CJ, Kappelle LJ, van Gijn J, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ, Fijnheer R. Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke*. Nov 1997;28(11):2214-2218.
81. Blann AD, Lip GY, Beevers DG, McCollum CN. Soluble P-selectin in atherosclerosis: a comparison with endothelial cell and platelet markers. *Thromb Haemost*. Jun 1997;77(6):1077-1080.
82. Fijnheer R, Frijns CJ, Korteweg J, et al. The origin of P-selectin as a circulating plasma protein. *Thromb Haemost*. Jun 1997;77(6):1081-1085.
83. Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. *Circulation*. Jan 30 2001;103(4):491-495.
84. Lip GY, Blann AD, Zarifis J, Beevers M, Lip PL, Beevers DG. Soluble adhesion molecule P-selectin and endothelial dysfunction in essential hypertension: implications for atherogenesis? A preliminary report. *J Hypertens*. Dec 1995;13(12 Pt 2):1674-1678.
85. Xu DY, Zhao SP, Peng WP. Elevated plasma levels of soluble P-selectin in patients with acute myocardial infarction and unstable angina. An inverse link to lipoprotein(a). *Int J Cardiol*. May 15 1998;64(3):253-258.
86. Larsson PT, Wallen NH, Hjemdahl P. Norepinephrine-induced human platelet activation in vivo is only partly counteracted by aspirin. *Circulation*. May 1994;89(5):1951-1957.
87. Xiang YZ. Adrenoreceptors, platelet reactivity and clopidogrel resistance. *Thromb Haemost*. Nov 2008;100(5):729-730.
88. Larsson PT, Hjemdahl P, Olsson G, Egberg N, Hornstra G. Altered platelet function during mental stress and adrenaline infusion in humans: evidence for an increased

- aggregability in vivo as measured by filragnetometry. *Clin Sci (Lond)*. Apr 1989;76(4):369-376.
89. El-Sayed MS, El-Sayed Ali Z, Ahmadizad S. Exercise and training effects on blood haemostasis in health and disease: an update. *Sports Med*. 2004;34(3):181-200.
  90. el-Sayed MS. Effects of exercise on blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation. *Sports Med*. Nov 1996;22(5):282-298.
  91. von Kanel R, Mills PJ, Fainman C, Dimsdale JE. Effects of psychological stress and psychiatric disorders on blood coagulation and fibrinolysis: a biobehavioral pathway to coronary artery disease? *Psychosom Med*. Jul-Aug 2001;63(4):531-544.
  92. El-Sayed MS, Sale C, Jones PG, Chester M. Blood hemostasis in exercise and training (Review). *Med Sci Sports Exerc*. May 2000;32(5):918-925.
  93. Kestin AS, Ellis PA, Barnard MR, Errichetti A, Rosner BA, Michelson AD. Effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity. *Circulation*. Oct 1993;88(4 Pt 1):1502-1511.
  94. Li N, He S, Blomback M, Hjemdahl P. Platelet activity, coagulation, and fibrinolysis during exercise in healthy males: effects of thrombin inhibition by argatroban and enoxaparin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Feb 2007;27(2):407-413.
  95. Li N, Wallen NH, Hjemdahl P. Evidence for prothrombotic effects of exercise and limited protection by aspirin. *Circulation*. Sep 28 1999;100(13):1374-1379.
  96. Hjemdahl P, Larsson PT, Wallen NH. Effects of stress and beta-blockade on platelet function. *Circulation*. Dec 1991;84(6 Suppl):VI44-61.
  97. Rock G, Tittley P, Pipe A. Coagulation factor changes following endurance exercise. *Clin J Sport Med*. Apr 1997;7(2):94-99.
  98. Dag B, Gleerup G, Bak AM, Hindberg I, Mehlsen J, Winther K. Effect of supine exercise on platelet aggregation and fibrinolytic activity. *Clin Physiol*. Mar 1994;14(2):181-186.
  99. Wang JS, Jen CJ, Chen HI. Effects of chronic exercise and deconditioning on platelet function in women. *J Appl Physiol*. Dec 1997;83(6):2080-2085.
  100. Smith JE. Effects of strenuous exercise on haemostasis (Review). *Br J Sports Med*. 2003;37(5):433-435.
  101. Sibbing D, Braun S, Jawansky S, et al. Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb Haemost*. Jan 2008;99(1):121-126.
  102. Zwart B, Van Kerkvoorde TC, van Werkum JW, Breet NJ, Ten Berg JM, Van 't Hof AW. Vigorous exercise as a triggering mechanism for late stent thrombosis: A description of three cases. *Platelets*. Feb 2010;21(1):72-76.
  103. Wallen NH, Held C, Rehnqvist N, Hjemdahl P. Effects of mental and physical stress on platelet function in patients with stable angina pectoris and healthy controls. *Eur Heart J*. May 1997;18(5):807-815.
  104. Mohlenkamp S, Lehmann N, Breuckmann F, et al. Running: the risk of coronary events : Prevalence and prognostic relevance of coronary atherosclerosis in marathon runners. *Eur Heart J*. Aug 2008;29(15):1903-1910.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: molekulare Thrombozyten-Endothel-Interaktionen.	3
Abbildung 2: Aktivierung des Endothels nach Thrombozytenbindung.	4
Abbildung 3: Thrombozyten-Monozyten-Interaktion.	4
Abbildung 4: Monozytenaktivierung nach Bindung an Thrombozyten.	5
Abbildung 5: Flavonoidstruktur.	8
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Thrombozytenaktivierung	11
Abbildung 7: zeitlicher Ablauf der BeMaGIC Studie	15
Abbildung 8: stark vereinfachte Darstellung der Durchflusszytometrie	27
Abbildung 9: Darstellung einer Messzelle mit zwei Paaren Messelektroden (links) sowie schematische Darstellung der Widerstandszunahme durch angelagerte aktivierte Thrombozyten (rechts)	29
Abbildung 10: Multiplate Analysegerät (links) sowie elektronenmikroskopische Aufnahme einer Messelektrode mit aufgelagerten Thrombozyten (rechts)	29
Abbildung 10: exemplarische Darstellung einer impedanzaggregometrischen Messung	30
Abbildung 12: Schema Sandwich ELISA	33
Abbildung 13: durchschnittlicher Konsum der Studiengetränke	37
Abbildung 14: Thrombozytenzahlen [ $*10^3/\mu\text{l}$ ] nach Visits	38
Abbildung 15: Darstellung Trinkmenge Verumgruppe	39
Abbildung 16: Spontanaggregation [AUC] nach Visits	40
Abbildung 17: Spontanaggregation [AUC] nach Visits im Gruppenvergleich	41
Abbildung 18: Spontanaggregation [AUC] der oberen Quartile der Verumgruppe nach Visits	42
Abbildung 19: Spontanaggregation [AUC] nach Visits im Vergleich Placebo – obere Quartile Verum	43
Abbildung 20: ADPtest [AUC] nach Visits	44
Abbildung 21: ADPtest [AUC] nach Visits im Gruppenvergleich	45
Abbildung 22: Serumspiegel P-Selectin nach Visits	46
Abbildung 23: Endothelin-1 [pg/ml] nach Visits	47
Abbildung 24: Endothelin-1 [pg/ml] nach Visits – im Gruppenvergleich	48
Abbildung 25: prozentualer Anteil p-Selectin positiver Thrombozyten in Abhängigkeit vom Versuchsreagenz	49
Abbildung 26: Darstellung des Einflusses einer Inkubationszeitveränderung auf die Spontanaggregation [Aggregation]	51
Abbildung 27: Spontanaggregation [Aggregation] in Abhängigkeit vom Versuchsansatz	52
Abbildung 28: Darstellung des Einflusses einer Inkubationszeitänderung auf die ADP-Aktivierbarkeit [AUC]	52
Abbildung 29: ADP getriggerte Aktivität im Vergleich [AUC]	53
Abbildung 30: Reaktion auf TRAP im Vergleich der Stressfaktoren	54
Abbildung 31: Thrombozytenzahl vor und nach Stressechokardiographie	55
Abbildung 32: Spontanaggregation prae-post [AUC]	56
Abbildung 33: ADPtest prae-post [AUC]	57
Abbildung 34: ASPtest prae-post [AUC]	57
Abbildung 35: TRAPtest prae-post [AUC]	58

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Flavonoidprofil des Studiengetränkes.....	18
--	----

## ***Danksagung***

Mein Dank gilt an erster Stelle Frau Priv. Doz. Dr. Ute Wilbert-Lampen für die Überlassung des Themas, die großen Freiheiten bei der Umsetzung des Projektes, die Zurverfügungstellung der Forschungseinrichtung, sowie ihrer wohlwollenden Unterstützung als Doktormutter.

Mein besonderer Dank gilt vor allem meinem Doktorarbeitsbetreuer Herrn Dr. Thomas Nickel. Ich lernte ihn bei einem Studentenkurs zu Anfang meines klinischen Ausbildungsabschnittes kennen und fand in ihm einen beständigen Mentor und Förderer auch über die gemeinsame wissenschaftliche Arbeit hinaus. Über die gesamte Zeit meiner Doktorarbeit unterstützte er mich mit größtem persönlichem Engagement und Enthusiasmus, sodass er von mir als unabdingbar nicht nur für den erfolgreichen Abschluss meiner Promotion betrachtet wird.

Danken möchte ich auch der Heinrich und Lotte Mühlfenzlstiftung, die durch die großzügige finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Promotionsstipendiums viele Aspekte des Projektes erst möglich gemacht hat.

Am Ende aber um nichts weniger möchte ich dem Laborteam danken. Unseren technischen Assistenten Zeljka Sisic und Marius Lambert aber auch vor allem meinem unerschütterlichen Mitdoktoranden Georg Waidhauser. Das in diesem außergewöhnlichen Team vorgefundene Arbeitsklima, machte es möglich auch in schwierigen Phasen innerhalb dieser Jahre nicht den Mut und die Motivation zu verlieren.