

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der  
Kreislaufkrankheiten  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Christian Weber

**Wirkung der Lipoproteine LDL, moxLDL und HDL auf die  
Thrombozytenfunktion im Blut**

**Dissertation**

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Gesa Feische

aus  
Würzburg

2018

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Siess

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. biol. hum. Dorit Nägler  
Prof. Dr. med. Bernd Engelmann

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 27.02. 2018

# INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung .....	1
2 Stand der Forschung .....	2
2.1 Thrombozyten.....	2
2.1.1 Morphologie und Funktion .....	2
2.1.2 Mechanismen der Plättchenaktivierung.....	3
2.1.2.1 Adhäsion.....	3
2.1.2.2 Gestaltwandel und Sekretion.....	4
2.1.2.3 Aggregation .....	5
2.1.2.4 Sekundäre Hämostase .....	5
2.1.3 Plättchen und Atherothrombose .....	6
2.2 Lipoproteine .....	7
2.2.1 Struktur der Lipoproteine .....	7
2.2.2 Funktion und Wirkung von HDL und LDL .....	8
2.2.2.1 LDL .....	8
2.2.2.2 HDL.....	10
2.2.3 Modifikation von LDL .....	11
2.3 Lipoproteine und Thrombozyten .....	12
2.3.1 Natives LDL .....	13
2.3.2 Milde oxidiertes LDL .....	14
2.3.3 Oxidiertes LDL .....	17
2.3.4 Natives HDL.....	18
3 Fragestellung .....	21
4 Material und Methoden .....	22
4.1 Materialien .....	22

4.1.1	Geräte .....	22
4.1.2	Puffer .....	22
4.1.3	Chemikalien und Reagenzien .....	23
4.1.4	Antikörper .....	25
4.1.5	Verbrauchsmaterialien .....	25
4.2	Methode .....	26
4.2.1	Blutgewinnung .....	26
4.2.2	Herstellung von Thrombozyten Suspensionen .....	26
4.2.2.1	Herstellung von PRP und PPP .....	26
4.2.2.2	Herstellung einer Suspension gewaschener Thrombozyten .....	27
4.2.2.3	Zählung Thrombozyten .....	27
4.2.3	Gewinnung und Modifikation von LDL .....	28
4.2.3.1	Gewinnung von LDL und HDL .....	28
4.2.3.2	Entfernung der Salze, Bestimmung der Proteinmenge und des Cholesterins sowie Konzentration der Lipoproteine .....	30
4.2.3.3	Herstellung von moxLDL .....	31
4.2.4	Gewinnung Plaque .....	32
4.2.5	Vorbereitung von LPA und LPA5 Rezeptor Antagonist PGM029615 .....	33
4.2.6	Experimente .....	34
4.2.6.1	Bestimmung der Thrombozyten-Aggregation im Blut .....	34
4.2.6.2	Versuche zum Gestaltwandel und zur Aggregation .....	35
4.2.6.3	Bestimmung der Thrombozyten Aktivierung nach Inkubation .....	35
4.2.7	Statistik .....	37
5	Ergebnisse .....	39
5.1	Sensibilisierung und Desensibilisierung der Thrombozyten-aggregation durch LPA	39

5.1.1 Vorinkubation mit LPA hemmt die LPA - induzierte Thrombozytenaggregation im Blut .....	39
5.1.2 Vorinkubation mit LPA sensibilisiert die Thrombozytenaggregation induziert durch Plaque, Kollagen oder ADP im Blut .....	40
5.2 Bedeutung der Inkubationszeit für die Wirkung von LPA .....	41
5.2.1 Dauer der Inkubationszeit hat keinen Einfluss auf die Sensibilisierung der Thrombozytenaggregation durch LPA.....	42
5.2.2 Die LPA Vorinkubation bewirkt eine Thrombozytenaktivierung .....	44
5.3 Einfluss von Lipoproteinen auf Thrombozyten im Blut.....	46
5.3.1 Einfluss der Inkubationszeit auf die Reaktionsfähigkeit der Thrombozyten im Blut (in Kontrollen) .....	46
5.3.2 MoxLDL hemmt die Kollagen- und ADP-induzierte Thrombozytenaggregation im Blut nach Langzeitinkubation.....	48
5.3.3 Wirkung von Langzeitinkubation mit natLDL, moxLDL und HDL auf Thrombozyten im PRP .....	50
5.3.3.1 MoxLDL hemmt die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation und den Gestaltwandel im PRP nach Langzeitinkubation.....	50
5.3.3.2 MoxLDL hemmt die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation im PRP nach Langzeitinkubation .....	52
5.3.4 MoxLDL hemmt die durch Kollagen induzierte Thrombozyten-Aggregation im Blut nach Kurz- und Langzeitinkubation .....	54
5.3.5 Langzeitinkubation mit Lipoproteinen verändert die Anzahl der Thrombozyten im Blut nicht.....	56
5.3.6 Die Hemmung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation durch moxLDL ist dosisabhängig .....	57
5.3.7 Langzeitinkubation mit CuSO <sub>4</sub> beeinflusst nicht die Thrombozytenaggregation im Blut .....	58
5.3.8 Keine Voraktivierung von Thrombozyten durch moxLDL während der Inkubationszeit .....	60
5.4 LPA - wirksamer Bestandteil in moxLDL? .....	62

5.4.1 Ein pharmakologischer LPA5- Rezeptorantagonist hemmt komplett den durch LPA und moxLDL induzierten Gestaltwandel in Suspensionen isolierter Thrombozyten .....	62
5.4.2 MoxLDL hemmt die Wirkung von LPA auf Thrombozyten im PRP .....	64
6 Diskussion .....	66
6.1 Methode .....	66
6.2 Wirkung von nativem LDL auf Thrombozyten im Blut.....	67
6.3 Wirkung von Lysophosphatidsäure auf Thrombozyten im Blut.....	68
6.4 Wirkung von milde oxidiertem LDL auf Thrombozyten im Blut .....	69
6.5 Wirkung von HDL auf Thrombozyten im Blut.....	74
7 Zusammenfassung .....	76
8 Literatur.....	79
9 Anhang .....	93
9.1 Foto.....	93
9.2 Tabellen .....	93
9.3 Abbildungsverzeichnis .....	93
9.4 Abkürzungen.....	95
9.5 Einheiten.....	100
9.6 Danksagung.....	102
9.7 Lebenslauf .....	103
Eidesstattliche Versicherung .....	104

## 1 Einleitung

Herzinfarkt und Schlaganfall sind Todesursache Nummer 1 in der westlichen Welt (WHO 2016) und meist Folge einer akuten Komplikation im Rahmen einer Atherosklerose: durch Erosion oder Ruptur atherosklerotischer Plaques kann es zum kompletten oder partiellen Gefäßverschluss durch arterielle Thrombusbildung (Atherothrombose) mit einer Durchblutungsstörung des nachfolgenden Gewebes kommen. Thrombozyten (Tz) sind Vermittler der primären Hämostase nach Gefäßverletzung und in dieser Funktion an der Ausbildung eines arteriellen Thrombus wesentlich beteiligt. Warum es immer wieder zu überschießenden thrombotischen Reaktionen mit Verschluss des kompletten arteriellen Lumens und womöglich letalen Folgen kommt, bleibt trotz intensiver Forschung weiterhin unklar.

Diskutiert wird, ob es Lipoproteine wie LDL und HDL sind, welche neben ihrer allgemein anerkannten Rolle bei der Entwicklung der Atherosklerose, durch Interaktion mit Tz möglicherweise auch an der Ausbildung einer Atherothrombose direkt beteiligt sind. Nach Ruptur atherosklerotischer Plaques gelangen lokal große Mengen an nativen und modifizierten Lipoproteinen in die Blutbahn, wo sie mit Tz interagieren können. Dabei wird nativem LDL (natLDL) und milde oxidiertem LDL (moxLDL) eine Tz-sensibilisierende und HDL eine eher Tz-hemmende Wirkung zugesprochen. Aber auch systemisch könnten native und modifizierte Lipoproteine die Atherothrombose beeinflussen. So könnten in der Blutbahn natLDL und oxidiertes LDL Tz voraktivieren und deren Reagibilität auf andere Stimuli beeinflussen.

Die vorliegende Arbeit ist die erste, die die Wirkung der Lipoproteine LDL, moxLDL und HDL auf die Tz-Aggregation im Blut differenziert untersucht.

## 2 Stand der Forschung

### 2.1 Thrombozyten

#### 2.1.1 Morphologie und Funktion

Physiologische Hauptfunktion von Tz ist ihre Beteiligung an der Hämostase nach Verletzung eines Gefäßes. Pathophysiologisch spielen sie eine zentrale Rolle bei der arteriellen Thrombusbildung ausgehend von einer Ruptur oder Erosion atherosklerotischer Plaques. Überdies findet in den letzten Jahren ihre Bedeutung für Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündungsprozessen immer mehr Beachtung.

Tz entstehen durch Abschnürung aus den Megakaryozyten des Knochenmarks (Malara A 2012). Pro Mikroliter Blut finden sich 150'000 bis 300'000 Tz mit einer Lebenszeit von ca. 7 Tagen. Der Abbau erfolgt über das retikulohistiozytäre System von Milz, Lunge und Leber. In der Milz ist ein Drittel der Tz gespeichert und steht für den ständigen Ersatz zur Verfügung. Tz besitzen keinen Zellkern, und außer mitochondrialer DNA keine Erbinformation. Die Fähigkeit zur Proteinsynthese ist aus diesem Grund begrenzt. Proteine und Gewebshormone, welche Tz für Ihre Funktion benötigen, sind in den für Tz charakteristischen Granula gespeichert, von denen es drei verschiedene Arten gibt:  $\alpha$ -Granula, elektronendichte Granula und Lysosomen. Während der Aktivierung der Tz kommt es zur Entleerung der Granula, der sogenannten Sekretion.

Dabei enthalten die elektronendichten Granula vor allem niedermolekulare Substanzen wie ADP, ATP, Serotonin und Ca<sup>2+</sup>. Die  $\alpha$ -Granula enthalten diverse Proteine, welche unterschiedliche biologische Funktionen steuern. Dazu gehören Adhäsionsmoleküle wie Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor (vWF), P-Selectin, der Fibrinogenrezeptor Glykoprotein IIb-IIIa sowie Wachstumsfaktoren wie der *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) und die Entzündungsmediatoren Interleukin-1 und CD40L. Lysosomen dienen dem Abbau von Proteinen und enthalten entsprechende Enzyme (Gawaz M 2001, Thon JM 2012).

## 2.1.2 Mechanismen der Plättchenaktivierung

### 2.1.2.1 Adhäsion

Die Adhäsion der Tz an freiliegende Matrixproteine eines Gefäßdefekts beschreibt den ersten Schritt der primären Hämostase.

Bis dahin ruhende Plättchen werden initial von subendothelialen extrazellulären Matrixstrukturen aus dem Blutstrom abgefangen (*tethering*), haften zunächst transient (*rolling*) und schließlich fest an der verletzten Gefäßwand. Dieses Abfangen und Anheften kann unter hohen Scherraten von mehr als  $1000\text{s}^{-1}$ , wie sie in der arteriellen Zirkulation vorhanden sind, geschehen. Die Bindung muss also eine hohe Affinität und Stabilität aufweisen sowie äußerst schnell erfolgen. Verantwortlich für die initiale transiente Adhäsion ist der vWF im Blut, welcher von Endothelzellen gebildet wird, und bei hohen Scherraten seine Konformation ändert. Er bindet dann fest an exponiertes Kollagen und anschließend mit hoher Affinität an das Glykoprotein Ib des vWF-Rezeptors der Tz. Die große Bedeutung des vWFs für die Blutstillung spiegelt sich wider bei Patienten, welche unter einem funktionellen Defekt des vWF, der von-Willebrand-Krankheit, oder des GPIb Rezeptors, dem Bernard-Soulier-Syndrom, leiden (Nurden AT 1999).

Die transiente Tz-Adhäsion wird anschließend stabilisiert durch Bindung von weiteren thrombozytären Membranrezeptoren vor allem an Kollagen, aber auch an Fibronectin und Laminin.

Voraussetzung für das Fortschreiten der primären Hämostase ist die Aktivierung der Tz. Unter physiologischen Bedingungen wird die Aktivierung ausgelöst durch den oben erwähnten Kontakt der Plättchen mit Bestandteilen der subendothelialen Matrix nach Verletzung der Gefäßwand. Vor allem die Bindung von Kollagen an die Kollagenrezeptoren Glykoprotein VI und das Integrin  $\alpha 1\beta 2$  löst Aktivierung, Gestaltwandel und Sekretion der adhärierenden Plättchen aus.

Neben den exponierten Matrixproteinen entfalten im Plasma lösliche Agonisten wie ADP, Thrombin und Thromboxan A2 (TxA2), eine sowohl para- als auch autokrine Wirkung auf Tz und induzieren Formveränderung und Aktivierung. ADP wird von Erythrozyten und aus den dichten Granula aktiverter Tz freigesetzt. Auf der

Oberfläche aktiverter Tz kann sich der Prothrombinasekomplex formieren und Thrombin aus Prothrombin abspalten, welches neben der Aktivierung von Tz auch für die Bildung von Fibrin (sekundäre Hämostase) verantwortlich ist. TxA2, aus Arachidonsäure gebildet, wird ebenfalls von aktivierten Tz freigesetzt (Gawaz M 2001, Freissmuth M 2012).

### **2.1.2.2 Gestaltwandel und Sekretion**

Ruhende Tz besitzen eine diskoidale Form. Durch die Aktivierung kommt es zum Gestaltwandel. Zunächst nehmen die Tz eine runde Gestalt an, und produzieren schließlich Ausläufer, sogenannte Pseudopodien, welche beweglich sind und sich verlängern aber auch wieder zurückziehen können. Grundlage für den Gestaltwandel ist eine rasche Umorganisation des thrombozytären Zytoskeletts: In den Pseudopodien reichern sich Microtubuli an, die Bildung von Actomyosin sorgt für ihre Kontraktilität. Tz können sich auf diese Weise flach ausbreiten und ihre Oberfläche stark vergrößern, wodurch ein Gefäßdefekt effektiv abgedeckt werden kann (Aslan JE 2012).

Nach sehr starker Stimulation entleeren Tz parallel zum Gestaltwandel den Inhalt ihrer Granula. Dieser Schritt stellt die maximale Aktivierung der Tz dar. Zuerst werden dichte und  $\alpha$ -Granula ausgeschüttet. Es kommt zu einem positiven Feedback-Effekt und die Aktivierung der Plättchen selber wird verstärkt (Golebiewska EM 2015). Außerdem werden noch ruhende Plättchen in der Umgebung aktiviert. Sie heften sich an das bereits vorhandene Plättchenaggregat und sorgen für dessen weitere Stabilisierung. Schließlich werden die lysosomalen Enzyme sezerniert (Siess W 1989), welche eine Auflockerung der Gefäßwand bewirken und das Fortschreiten atherosklerotischer Prozesse begünstigen können (Gawaz M 1999). Nach der Ausschüttung der Granula ist die Reaktionsfähigkeit der Tz sehr begrenzt und die zweite irreversible Phase der Aggregation wird eingeleitet.

### 2.1.2.3 Aggregation

Die Tz-Aggregation ist die Adhäsion von zwei oder mehr Plättchen. Möglich wird Aggregation erst durch die oben beschriebene Aktivierung von Plättchen. Es werden zwei Phasen der Aggregation unterschieden, eine reversible und eine irreversible. Während der noch reversiblen, primären Phase sind die Plättchen untereinander durch lockere Fibrinogenbrücken verbunden (Phillips DR 1988). Wenn eine weitere Aktivierung ausbleibt, können sich diese Aggregate wieder auflösen (Pötzsch B 2010).

Voraussetzung für die Bildung von Fibrinogenbrücken ist die Aktivierung des GPIIb-IIIa Komplexes (Plow EF 1989), der vor allem als Fibrinogenrezeptor dient, und auch als Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  bezeichnet wird. Für die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors und dessen Bindung an Fibrinogen sind zweiwertige Kationen wie  $\text{Ca}_{2+}$  und  $\text{Mg}_{2+}$  notwendige Kofaktoren.

Fibrinogenrezeptoren sind auf ruhenden Plättchen vorhanden, sie befinden sich jedoch in einem Zustand, welcher verhindert, dass Fibrinogen gebunden werden kann. Im Zuge der Aktivierung kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch die Bindung von Fibrinogen möglich wird. Zusätzlich wird die Oberflächendichte dieses Rezeptors durch Rekrutierung aus den  $\alpha$ -Granula erhöht.

Fibrinogen ist ein Dimer aus jeweils 3 Ketten, der Alpha-, Beta- und Gamma-Kette, welche sich alle im Zentrum des Moleküls, der E-Domäne, treffen. Bestimmte Aminosäuresequenzen, der RGD-Bereich auf der Alpha-Kette und der Dodecapeptid-Bereich auf der Gamma-Kette, binden an spezifische Regionen des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Die Hemmung dieser Aminosäuresequenzen kann die Aggregation komplett unterbinden (Phillips DR 1988, Plow EF 1989). Das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  ist außerdem in der Lage, vWF sowie Fibronectin zu binden (Ruggeri ZM 2002).

### 2.1.2.4 Sekundäre Hämostase

Als sekundäre Hämostase wird die nach Aktivierung der Tz erfolgende plasmatische Blutgerinnung bezeichnet. Sie dauert etwa 6 bis 10min und führt zu einer

dauerhaften Blutstillung. Nach einer Gefäßverletzung kommt es zur Exposition von *tissue factor* (TF), welcher auf den meisten Zellen exprimiert wird, die normalerweise nicht direkt mit Blut in Kontakt kommen, wie Fibroblasten und glatte Muskelzellen. Basierend auf im Blut gelösten Gerinnungsfaktoren wird daraufhin eine Kaskade proteolytischer Prozesse gestartet, die sogenannte Koagulationskaskade, welche zur Bildung von Thrombin führt. Thrombin spaltet aus löslichem Fibrinogen Fibrinmonomere ab, die sich auf dem vorhandenen Aggregat aus Tz ablagern und spontan polymerisieren. Die kovalente Quervernetzung der Fibrinfäden durch Faktor XIIIa stabilisiert das Molekül mechanisch, der primäre hämostatische Ppropf aus Tz wird gefestigt.

Ebenfalls durch den Einfluss von Thrombin kommt es zur Kontraktion des Aktin-Myosin-Skeletts der Tz, und damit zu einem Zug am Fibrinnetz. Blutserum wird ausgepresst, die Wundränder zusammengezogen und der Thrombus dadurch dauerhaft stabilisiert.

Primäre und sekundäre Hämostase sind funktionell eng miteinander verknüpfte Systeme und beschleunigen bzw. verstärken sich gegenseitig (Gawaz M 2001, Freissmuth M 2012).

### 2.1.3 Plättchen und Atherothrombose

Tz sind nicht nur von entscheidender Bedeutung für die Blutstillung nach Gefäßverletzung, sondern spielen eine zentrale Rolle bei der intraluminalen Thrombose nach Ruptur oder Erosion atherosklerotischer Plaques, der Atherothrombose. Mit der Bildung eines intra-arteriellen Thrombus tritt eine akute Komplikationen der Atherosklerose auf, die in Herzinfarkt und Schlaganfall resultieren kann. Laut WHO (WHO Fact Sheet 2016) stellt diese Komplikation die häufigste Todesursache in der westlichen Welt dar. Die Gabe von Plättchenhemmern und Antikoagulantien ist daher gängige Therapie zur Thromboseprävention bei kardiovaskulären Erkrankungen (Vandvik PO 2012).

Die Ruptur einer atheromatösen Plaque wird als Hauptursache für die Thrombusbildung in Koronar- und Zerebralarterien betrachtet (Ruggeri ZM 2002). Durch die

Ruptur kommt Material aus dem Inneren des Plaques, welches sich von Bestandteilen der gesunden Intima unterscheidet, in Kontakt mit zirkulierenden Blutplättchen und sorgt für eine überschießende Plättchenreaktion (Ruggeri ZM 2002, Corti R 2002). Dabei sind es vor allem Kollagene vom Typ I und III, welche über Bindung an Glykoprotein VI die Blutplättchen aktivieren (van Zanten GH 1994, Penz S 2005, Reininger AJ 2010). In den Plaques ist auch TF enthalten (Fernandez-Ortiz A 1994, Marmor JD 1996), welcher ähnlich wie bei einer „normalen“ Gefäßverletzung über die Aktivierung von Koagulationsfaktoren im Blut die Bildung von Thrombin stimuliert, was schließlich zur Fibrinbildung führt (Toschi V 1997, Badimon JJ 1999, Reininger AJ 2010).

## 2.2 Lipoproteine

### 2.2.1 Struktur der Lipoproteine

Lipoproteine sind hochmolekulare, wasserlösliche Komplexe aus Lipiden und Proteinen und stellen die Transportform von Lipiden im Blut dar. Ihre Einteilung erfolgt nach ihrer Dichte in Chylomikronen, VLDL, IDL, LDL und HDL (*Very, Intermediate, Low und High Density Lipoprotein*). Cholesterinester und Triglyceride bilden den Kern, während freies Cholesterin und Phospholipide eine bipolare, den Kern umhüllende Membran in Form eines Monolayer bilden. In diesem Monolayer sind pro LDL-Molekül genau eine, pro HDL-Molekül auch mehrere Peptidketten eingebettet, welche als Apolipoproteine bezeichnet werden. Die größte pathophysiologische Relevanz haben LDL und HDL, welche in dieser Arbeit untersucht wurden.

LDL entsteht aus VLDL und besteht zu 75% aus Lipiden und 25% aus dem Apolipoprotein B100 (Apo-B100). HDL sind die kleinsten Lipoproteinpartikel mit der größten Dichte. Sie sind mit verschiedenen Apolipoproteinen assoziiert, welche hauptsächlich in der Leber synthetisiert werden und als strukturelles Gerüst oder Ligand für Membranrezeptoren fungieren. So findet sich stets Apolipoprotein A (Apo-A), das neben seiner strukturgebenden Funktion die Aufnahme von freiem Cholesterin vermittelt (Frank PG 2000) und das kleinere Apo-E, welches eine große Affinität zum LDL Rezeptor hat (Getz GS 2009). Seltener und hauptsächlich in

nüchternem Zustand mit HDL assoziiert sind die verschiedenen Apo-Cs, welche wichtig für die Funktion der Lipoproteinlipase sind (Mahley RW 1984). In geringer Menge vorhanden und daher bisher kaum im Fokus der Atheroskleroseforschung ist Apo-D, welches untypischer Weise von Gewebezellen produziert wird und sich auch strukturell von den übrigen Lipoproteinen unterscheidet (Perdomo G 2009).

### **2.2.2 Funktion und Wirkung von HDL und LDL**

#### **2.2.2.1 LDL**

LDL dient dem Transport von Cholesterin in die peripheren Zellen. Über das Apo-B100 bindet LDL an den membranständigen LDL-Rezeptor, welcher auf nahezu allen Körperzellen vorhanden ist. Das so gewonnene Cholesterin steht den Zellen zum Aufbau ihrer Plasmamembran oder für die Bildung von Hormonen sowie Gallensalzen zur Verfügung. Ist der Bedarf der Zelle an Cholesterin gedeckt, wird die Expression des LDL-Rezeptors gehemmt und es wird kein LDL mehr in die Zelle aufgenommen.

Anders verhält es sich mit oxidativ modifiziertem LDL. Es wird von Endothelzellen und Makrophagen sowie glatten Muskelzellen völlig ungehemmt aufgenommen. Mit Lipiden vollgestopft werden die Makrophagen als Schaumzellen bezeichnet. Sie finden sich schon im frühen Stadium der atherosklerotischen Läsion, den sogenannten Fettstreifen (Ross R 1999). Anschließend kommt es zu einer Entzündungsreaktion, in deren Verlauf fibröse Plaques mit einem Kern aus nekrotischem Material und Lipiden entstehen. Schreiten die Entzündungsprozessen voran, werden die Plaques schließlich instabil (Amento EP 1991, Galis ZS 1994, Libby P 2002) und können rupturieren, wodurch die Gefahr besteht, dass über die oben beschriebenen Mechanismen eine Thrombose ausgelöst wird.

Für die Aufnahme des oxidativ modifizierten LDL ist nicht der klassische LDL-Rezeptor verantwortlich, sondern Scavenger Rezeptoren, welche keinerlei Regulationsmechanismen zeigen (Brown MS 1990). Einer der bekanntesten ist CD36. Es handelt sich um einen Scavenger Rezeptor der Klasse B, der auf Makrophagen, aber ebenso auf einer Vielzahl anderer menschlicher Zellen, wie Endothelzel-

len und Tz vorkommt (Febraio M 2001, Park YM 2014). Ein weiterer ist Lox-1 (*lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*), welcher ursprünglich als Hauptrezeptor für oxidiertes LDL auf Endothelzellen identifiziert wurde (Sawamura T 1997). Er findet sich auch auf Makrophagen und glatten Muskelzellen (Moriwaki H 1998, Draude G 1999). Außerdem wird er von Tz exprimiert und zwar abhängig von deren Aktivierung (Chen M 2001). Ein Scavenger Rezeptor der Klasse A, SR-A, wurde ursprünglich auf Makrophagen identifiziert (Suzuki H 1997), findet sich aber auch auf Tz, wo er eine Rolle bei der Aktivierung durch oxidiertes LDL zu spielen scheint (Korporaal SJ 2007).

Im Zusammenhang mit ihrer Bedeutung für die Wirkung von oxidiertem LDL auf Tz wird auf CD36, Lox-1 und SR-A in Kapitel 2.3.3 näher eingegangen.

Außer in atherosklerotischen Läsionen kommen modifizierte Lipoproteine offenbar auch in der Blutzirkulation vor. Das Vorhandensein von Antikörpern gegen oxidiertes LDL im Blut lässt diesen Zusammenhang vermuten (Yla-Herttula S 1994, Virella G 2004, Crisby M 2009). Im Rahmen von Untersuchungen an Patienten mit koronarer Herzkrankheit wurde Malondialdehyd (MDA) - modifiziertes LDL aus Plasma und Serum isoliert (Holvoet P 1998, Tanaga K 2002, Lopes-Virella MF 2012). In der Zirkulation von Patienten mit Krankheiten wie Diabetes mellitus oder Hypercholesterinämie, welche mit einem erhöhten Risiko für Herzkreislaufkrankheiten einhergehen, aber auch in der Zirkulation gesunder Individuen findet sich elektronegatives LDL (eLDL) (Sánchez-Quesada JL 2004). Mit eLDL wird eine kleine LDL Fraktion bezeichnet, welche durch verschiedene Mechanismen modifiziert wurde und deren Gemeinsamkeit eine erhöhte negative Ladung ist (Estruch M 2013). eLDL scheint eine proinflammatorische Wirkung ähnlich der von oxidiertem LDL zu haben (Chan HC 2013).

Jüngere Studien zeigen Mechanismen, wie LDL in der Zirkulation oxidiert werden könnte. Stimulierte Tz können über Aktivierung der NADPH-Oxidase-2 natives LDL oxidiieren und einen positiven Feedback Mechanismus in Bezug auf die weitere Aktivierung von TZ in Gang bringen (Carnevale R 2014). Eine andere Studie zeigt, dass Peroxidasen, welche an LDL binden, in der Zirkulation vorkommen und eine Oxidation von LDL bewirken können (Yang Y 2016).

### 2.2.2.2 HDL

Im Vergleich mit LDL wird dem HDL eine gefäßprotektive Wirkung zugeschrieben. In großen epidemiologischen Studien konnten niedriges Herzinfarktrisiko und hoher HDL Spiegel assoziiert werden (Castelli WP 1988, Barter P 2007, Lewington S 2007). Ob es einen ursächlichen Zusammenhang gibt, bleibt jedoch unklar.

Die anti-atherogenen Eigenschaften von HDL werden vor allem mit seiner Funktion beim Rücktransport von Cholesterin aus der Peripherie zur Leber begründet, dem sogenannten reversen Cholesterintransport (Lewis GF 2005). HDL absorbiert über das Apo-A1 überschüssiges Cholesterin von peripheren Zellen, wie Makrophagen und Endothelzellen. Das absorbierte Cholesterin wird durch die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) verestert und bildet den hydrophoben Kern der HDL Partikel. Kofaktor für die LCAT ist wieder das Apo-A1. So bekommen die ursprünglich diskoiden HDL eine runde Form und werden zu sphärischen, reifen HDL. Die reifen HDL bestehen zu ca. 50% aus Proteinen und 50% aus Lipiden (Dahlen GH 1986, Frank PG 2000). Sie geben Ihre Cholesterinester über den Scavenger Rezeptor B1, Hauptrezeptor für HDL auf diversen menschlichen Zellen (Acton S 1996, Krieger M 1999), in der Leber ab, bzw. werden als Holopartikel über einen noch unbekannten Weg internalisiert oder übertragen Cholesterinester im Austausch gegen Triglyceride an Apo-B-haltige Lipoproteine, also VLDL und LDL (Renz H 2003).

Neben dem reversen Cholesterin Transport werden HDL noch weitere positive Eigenschaften im Bezug auf Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen zugesprochen. So fungiert es als Oxidationsschutz für natives LDL, indem es Hydroperoxide von LDL aufnimmt (Parthasarathy S 1990, Barter PJ 2004). Außerdem ist HDL assoziiert mit Paraoxonase 1 (PON-1) (Sorenson RC 1999), einem Enzym, das eine Vielzahl antioxidativer und entgiftender Eigenschaften besitzt und in vitro Lipidperoxidation verhindert (Litvinov D 2012, Karlsson H 2015). Zudem fördert HDL die Vasorelaxation (Nofer JR 2004) und stimuliert offenbar die Produktion anti-inflammatorischer Proteine in Endothelzellen (Pan B 2016).

Auf der anderen Seite gibt es auch Berichte, dass Apo-A1 durch oxidative Schädigung seine protektiven Eigenschaften verliert und selbst proinflammatorisch wirkt

(Navab M 2004). Außerdem finden sich in atherosklerotischen Plaques neben Apo-B typischerweise mit HDL assoziierte Apolipoproteine wie Apo-A und Apo-E (Guyton JR 1996).

### 2.2.3 Modifikation von LDL

Sowohl die Fettsäuren als auch der Proteinanteil der Low Density Lipoproteine können oxidativ modifiziert werden.

Substrat der Fettsäure-Oxidation (Lipidperoxidation) sind ein- oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Zur Initiierung einer nicht-enzymatischen Autooxidation werden Radikale benötigt, z.B. Sauerstoffradikale, welche von aktivierten Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen über den NADPH-Oxidase Signalweg oder Myeloperoxidase (MPO)-vermittelt generiert werden. So entsteht zunächst ein Lipidradikal, und unter Aufnahme von molekularem Sauerstoff kommt es zur Ausbildung eines Lipid-Peroxyradikals. Peroxyradikale können aber auch enzymatisch, Lipoxygenase vermittelt, entstehen. Es werden zunächst Lipidhydroperoxide gebildet, welche durch Schwermetallkationen zu Radikalen reduziert werden. In vitro sind dies z.B. Kupferionen ( $Cu^{2+}$ ), in vivo vor allem zweiwertiges Eisen ( $Fe^{2+}$ ). Es kommt zur Kettenreaktion: Lipidperoxy-Radikale reagieren nun wiederum mit einer neuen ungesättigten Fettsäure, wobei wieder ein Lipidradikal und ein Lipidhydroperoxid entstehen. Die Hydroperoxide werden schließlich zu Aldehyden abgebaut (Siess W 2006). Das Ausmaß der Lipoprotein-Oxidation kann über die Bestimmung der Menge dieser Aldehyde beurteilt werden.

Während der Oxidation der Lipide entstehen unter anderem biologisch aktive Substanzen wie eine bestimmte Klasse oxiderter Phosphatidylcholine (Podrez EA 2002) oder Lysophosphatidsäure (LPA) (Siess W 1999), deren Wirkung in Bezug auf Tz in den Kapiteln 2.3.2. und 2.3.3 beschrieben wird.

Bei weiter fortschreitender Oxidation wird zusätzlich zu den Lipiden auch der Proteinmantel, das Apo-B100 oxidiert und dabei fragmentiert. Aldehyde binden an freie Aminosäure-Seitenketten des Proteins, und neutralisieren deren positive Ladung. Dieser Verlust an positiver Ladung scheint die Ursache für die Erkennung

des Lipoproteins durch den Scavenger Rezeptor zu sein (Steinbrecher UP 1987). Zu erkennen ist dieser Oxidationsschritt an der Erhöhung der elektrophoretischen Mobilität des Proteins (Naseem KM 1997).

In vitro kann bei der Oxidation der Lipoproteinen eine sogenannte „Lag Time“ beobachtet werden, eine zeitliche Verzögerung, bevor die Kettenreaktion richtig in Gang kommt. Diese ist dadurch bedingt, dass zunächst alle vorhandenen Antioxidantien verbraucht werden müssen (Esterbauer H 1992, Karten B 1997). Es gibt zahlreiche natürliche Antioxidantien wie z.B.  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol (Vitamin E) sowie Carotene in LDL (Esterbauer H 1990, Esterbauer H 1992, Hevonoja T 2000, Sanchez-Quesada JL 2004, Benitez S 2004, Siess W 2006). Pro LDL Partikel finden sich durchschnittlich 6 Moleküle  $\alpha$ -Tocopherol (Esterbauer H 1995).

## 2.3 Lipoproteine und Thrombozyten

Es wird diskutiert, dass Lipoproteine, neben ihrem allgemein anerkannten Einfluss auf die Entstehung der Atherosklerose, prothrombotisch wirken, indem sie Tz voraktivieren und dadurch die Tz-Reagibilität auf andere Stimuli erhöhen. Die Tz-Voraktivierung könnte die überschießende Thrombusbildung erklären, welche immer wieder nach Plaque-Rupturen beobachtet wird: der Thrombus kann so ausgedehnt sein, dass er das arterielle Lumen zu verschließen vermag. Der Typ der Lipoproteine, LDL oder HDL, sowie der Grad der Lipoprotein-Oxidation scheinen dabei eine wesentliche Rolle zu spielen (Naseem KM 1997, Steinberg 1997). Ob native und oxidativ modifizierte LDL oder HDL Einfluss auf die Reaktion von Tz haben, wurde in vielen Studien untersucht und ist Thema der folgenden Abschnitte.

Natives LDL (natLDL) und natives HDL (natHDL) sind als Transportvehikel für Cholesterin und Triglyceride physiologischer Bestandteil des Blutplasmas, und kommen hier mit Tz in Berührung. Dass sich auch oxidiertes LDL (oxLDL) in der Zirkulation findet, wo es mit Tz interagieren könnte, scheint mittlerweile ebenfalls gesichert (siehe Kapitel 2.2.2.1).

### 2.3.1 Natives LDL

Auf die Frage, ob natLDL eine Wirkung auf Tz hat, gibt es unterschiedliche Beobachtungen.

Bei Kontakt von nativem LDL mit gewaschenen Tz konnte im Aggregometer kein Gestaltwandel festgestellt werden (Weidtmann A 1996, Zangl KJ 2003). Allerdings wurde in Gegenwart unterschwelliger Konzentrationen anderer Agonisten wie ADP nach Zugabe physiologischer Konzentrationen von nativem LDL zu einer Suspension gewaschener Tz eine Aggregation beobachtet, was auf eine Sensibilisierung der Blutplättchen durch natives LDL schließen lässt (Weidtmann A 1995). Dagegen konnten Tornvall et al keine Wirkung von natLDL auf die ADP und Kollagen induzierte Aggregation isolierter Tz im Aggregometer feststellen (Tornvall P 1999). Naseem et al beobachteten nach 1-minütiger Vorinkubation von gewaschenen Tz mit nativem LDL sogar eine dosis-abhängige Hemmung der durch Thrombin und ADP induzierten Aggregation (Naseem KM 1997).

Korporaal et al konnten Rezeptor und Signalweg, welche für eine Sensibilisierung isolierter Tz durch Inkubation mit natLDL verantwortlich sind, identifizieren. Als Rezeptor wurde ApoER2' ermittelt, eine Spleiß-Variante des ApoER2. Letzterer ist Mitglied der LDL-Rezeptor Familie, zu seinen Liganden zählt unter anderem das Apo-E, welches in Chylomikronen, IDL und HDL vorkommt, während das Apo-B100 in LDL Ligand von ApoER2' ist. Die Aktivierung erfolgt über Kontakt mit der sogenannten B-Site, einer spezifischen Domäne auf dem Apo-B100 (Korporaal SJ 2004). Über den Rezeptor ApoER2' wird die fokale Adhäsionskinase (FAK) aktiviert (Hackeng CM 1999, Relou IAM 2003-2). Dieses Enzym ist Ausgangspunkt für die Phosphorylierung zahlreicher weiterer Signalmoleküle, welche im Stande sind, *mitogen-activated protein* (MAP) - Kinasen zu aktivieren (Schaller M 2001). Nach Aktivierung der MAP-Kinase p38MAPK kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung der Phospholipase A2 (PLA2), zur Freisetzung von Arachidonsäure und Bildung von Thromboxan A2. Die Folge ist eine erhöhte Tz-Reaktionsbereitschaft nach Stimulation durch Thrombin, Kollagen und ADP, und daraus resultierend eine erhöhte Aggregation und Sekretion (Korporaal SJ 2004). Allerdings ist die voraktivierende Wirkung von natLDL nur vorübergehend. Nach

10-20min erreicht das p38MAPK Enzym wieder denselben Zustand wie in ruhenden Plättchen. Ursache ist offenbar die Bindung von natLDL, ebenfalls über dessen B-Site in Apo-B100, an den Rezeptor PECAM-1 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*). In der Folge kommt es über Aktivierung der Ser/Thr Phosphatasen PP1/PP2A zu einer Dephosphorylierung der p38MAPK (Relou IAM 2003-1). Die Verfasser dieser Studie vermuten hier einen Mechanismus zum Schutz vor Plättchenaktivierung durch zirkulierendes natLDL.

Im Plättchenreichen Plasma (PRP) konnte hingegen kein stimulierender Effekt beobachtet werden: weder die Zugabe von natLDL zu Citrat-PRP noch die Vorinkubation von PRP mit natLDL und Stimulation durch ADP oder Kollagen hatte eine Änderung der Lichttransmission im Aggregometer zur Folge (Bröijersén A 1993, Naseem 1997, Tornvall P 1999). In einer der Studien wurde allerdings nach 30-minütiger Vorinkubation mit natLDL eine dosisabhängige Hemmung der durch Thrombin und ADP induzierten Aggregation beobachtet (Naseem KM 1997).

Physiologische Bedingungen nachahmend, inkubierten Bröijersén et al Heparin-antikoaguliertes Blut für 20min mit drei unterschiedlichen Konzentrationen von LDL (0,5-1mg/ml). Nach Stimulation durch ADP wurde per „In-Vitro-Filtragometrie“ eine signifikante und dosisabhängige Erhöhung der Aggregabilität beobachtet (Bröijersén A 1993). Ähnliche Ergebnisse erzielten Tornvall et al. Nach 10minütiger Vorinkubation von Citrat-antikoaguliertem Blut mit 1,25mg/ml natLDL beobachteten sie im Impedanz-Aggregometer eine signifikante Steigerung der ADP induzierten Tz Aggregation (Tornvall P 1999).

### 2.3.2 Milde oxidiertes LDL

Milde oxidiertes LDL (moxLDL) zeigt keine Modifikationen des Proteins und nur eine geringe Oxidation der ungesättigten Fettsäuren des Phospholipidmantels. In vitro wird diese Art der LDL Modifikation in den meisten Studien, wie auch in der vorliegenden Arbeit, durch 24stündige Inkubation von natLDL mit zweiwertigen Kupferionen als Katalysatoren nach der Methode von Esterbauer et al hergestellt (Esterbauer H 1990). Andere Arbeitsgruppen lassen LDL durch längere Lagerung

an der Luft spontan oxidieren und nennen das dem moxLDL sehr ähnliche Produkt minimally modified LDL (mmLDL) (Berliner JA 1990, Naseem KM 1997).

MoxLDL ist im Vergleich zu natLDL in seiner Wirkung auf Tz die reaktivere Form des LDL, was in verschiedenen Studien eindeutig gezeigt werden konnte (Weidtmann A 1995, Naseem KM 1997, Siess W 2000, Baumann-Siemons J 2000, Zangl KJ 2003). Dabei ist die aktive Substanz in moxLDL offenbar Lysophosphatidsäure (LPA) (Siess W 1999). LPA entsteht während der Oxidation von LDL, wie genau, ist noch unklar. Milde Oxidation von nativem LDL erhöhte den durchschnittlichen Gehalt von biologisch aktiver LPA um das 8fache. Dabei ist hervorzuheben, dass LPA auch im lipidreichen Kern atherosklerotischer Plaques angereichert ist (Siess W 1999). Es handelt sich hier genau um die Region, welche besonders anfällig für eine Ruptur ist und ihren Inhalt entsprechend in die Blutzirkulation entleert.

Außer während der milden Oxidation von LDL wird LPA von aktivierten Tz und diversen anderen Zellen gebildet (Moolenaar WH 1995). LPA findet sich in Konzentrationen von 100-500nM im Plasma (Bjerve KS 1974, Baker DL 2002, Sano Y 2002) und in etwa 10fach höherer Konzentration im Serum (Saulnier-Blache JS 2000, Baker DL 2001, Sano Y 2002), eine Beobachtung, die nahelegt, dass LPA im Zusammenhang mit der Koagulation und Aktivierung von Tz gebildet wird.

LPA ist ein einfaches Glycerophospholipid, bestehend aus Glycerin als Grundgerüst, einer Phosphatgruppe und einer in Länge und Sättigungsgrad variierenden Fettsäure. Der Typ der Fettsäure sowie dessen Bindung an Position C1 (Ether- oder Ester-Bindung) determinieren die strukturelle und funktionelle Variabilität der verschiedenen LPA-Spezies. LPA bindet an spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren, von denen bisher 5 Subtypen, die Rezeptoren LPAR1 bis LPAR5, beschrieben wurden (Choi JW 2010). Dabei gibt es deutliche Hinweise darauf, dass es vor allem der LPAR5 ist, über den LPA Tz aktiviert (Williams JR 2009, Khandooga AL 2011)

Bei ihren Versuchen mit LPA beobachteten Haserück et al, dass die Zugabe von geringen LPA Konzentrationen ( $>1\mu\text{M}$ ) zu Hirudin-antikoaguliertem Blut Tz-Gestaltwandel und Aggregation auslösen können. LPA stimulierte außerdem P-

Selectin vermittelt die Tz-Monozyten-Aggregatbildung im Blut. Bei der LPA induzierten Aktivierung von Tz im Blut spielen ADP Rezeptoren offenbar eine wesentliche Rolle. Die aggregationsfördernde Wirkung von LPA konnte durch Antagonisten der beiden ADP Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 komplett gehemmt werden (Haserück 2007).

In den Untersuchungen zur Wirkung von moxLDL und LPA auf Tz spielt es eine wesentliche Rolle, ob isolierte Tz oder PRP verwendet wurde.

In einer Studie von Naseem et al zeigten isolierte Tz eine zwar kleine primäre aber signifikante Aggregation nach Kontakt mit milde oxidiertem LDL und Zugabe von Fibrinogen allein. Diese Wirkung war ab einer Konzentration von 0,5mg/ml zu beobachten. Nach Vorinkubation von gewaschenen Tz mit moxLDL von nur 1min und Stimulation durch unterschwellige Konzentrationen ADP konnte eine irreversible Antwort beobachtet werden (Naseem KM 1997).

Weidtmann et al beobachteten abhängig von der Art der Präparation gewaschener TZ schon ab 0,4mg/ml moxLDL einen Gestaltwandel, und eine maximale irreversible Tz-Aggregation sowie Sekretion aus den dichten Granula (Weidtmann A 1995). Zwei weitere Studien bestätigten diese Ergebnisse (Baumann-Siemons J 2000, Zangl KJ 2003). Weidtmann et al zeigten außerdem, dass die durch moxLDL induzierte Aggregation der Tz, nicht aber der Gestaltwandel, über die Aktivierung der Phospholipase A2, Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden der Tz-Membran und Bildung von Thromboxan A2 vermittelt wird.,

In Citrat-antikoaguliertem PRP fand keine spontane Reaktion durch Zugabe von moxLDL statt, nach Inkubation mit moxLDL und Stimulation durch ADP fand sich jedoch eine gesteigerte Antwort ähnlich der in gewaschenen Tz (Naseem KM 1997). Im Gegensatz dazu konnten Tornvall et al auch nach Stimulation mit ADP keine signifikant gesteigerte Reaktion im Citrat-antikoagulierten PRP nach Inkubation mit moxLDL feststellen.

Im Blut (ebenfalls Citrat-antikoaguliert) beobachtete die selbe Arbeitsgruppe allerdings eine signifikante Steigerung der Tz Aggregation (Tornvall P 1999).

### 2.3.3 Oxidiertes LDL

In der Mehrzahl der Studien konnte ein aktivierender Effekt von oxidiertem LDL (oxLDL) auf isolierte Tz und Tz im PRP beobachtet werden. Nur zwei Studien fanden ein anderes Ergebnis: Tornvall et al konnten keinen Effekt nach Inkubation mit oxLDL auf die ADP oder Kollagen induzierte Aggregation isolierter Tz oder Tz im Citrat-antikoagulierten PRP im Aggregometer messen (Tornvall P 1999), und in der Studie von Naseem et al zeigte oxLDL nach Inkubation eine hemmende Wirkung auf die ADP induzierte Aggregation isolierter Tz und Tz in Citrat-antikoaguliertem PRP, gemessen im Aggregometer. Erklärt wurde diese Beobachtung in der letztgenannten Studie mit reaktiven Aldehyden, wie 4-Hydroxynonenal, welche bei der Lipidperoxidation entstehen und eine hemmende Wirkung auf Tz haben (Naseem KM 1997).

Bei der Tz-aktivierenden Wirkung von oxLDL scheint das in Abschnitt 2.2.2.1 erwähnte Membranprotein CD36 eine herausragende Rolle zu spielen.

Podrez et al konnten mit Hilfe radioaktiver Markierung der verwendeten Lipoproteine zeigen, dass oxLDL über CD36 an isolierte humane Tz bindet. Außerdem zeigten sie per Durchflusszytometrie, dass diese Interaktion zu P-Selectin-Expression und Konformationsänderung des Fibrinogen-Rezeptors führt (Podrez EA 2007). Als aktive Substanz identifizierten sie verschiedene oxidierte Phosphatidylcholine (oxPC<sub>CD36</sub>), welche z.B. während der MPO-vermittelten Oxidation von LDL entstehen, aber auch in vitro, bei der Oxidation von LDL mit Kupferionen (Podrez EA 2002).

In isolierten Tz kam es durch Inkubation mit oxLDL zum Gestaltwandel. Wraith et al konnten den Signalweg identifizieren, der nach Bindung von oxLDL an CD36 zur Bildung des für den Gestaltwandel erforderlichen Actomyosinkomplexes führt (Wraith KS 2013).

Über oxLDL/CD36 aktivierte, isolierte Tz zeigten eine gesteigerte Oberflächenexposition von CD40L, einem Marker für entzündliche Reaktionen, hervorgerufen durch eine erhöhte Produktion an *reactive oxygen spezies* (ROS) in Tz (Assinger A 2010). ROS hemmten zudem den cGMP Signalweg in isolierten Tz. Dieser Signalweg führt zu einer Abnahme der Tz Adhäsion und Aggregation. Wird er ge-

hemmt, kommt es folglich zu einer Steigerung der Thrombin, Kollagen und ADP induzierten Tz Aggregation (Magwenzi S 2015).

Im Zusammenhang mit der Aktivierung von Tz durch oxLDL scheint neben CD36 auch noch der Scavenger Rezeptor A (SR-A) eine wesentliche Rolle zu spielen. Um die Wirkung von oxLDL auf isolierte Tz zu unterbinden, müssen beide Rezeptoren blockiert sein. Intrazellulär kommt es bei beiden Rezeptoren über die Aktivierung von p38MAPK und PLA2 letztlich zur Bildung von Thromboxan A2, ähnlich wie bei der Aktivierung durch natLDL, nur wesentlich stärker (Korporaal SJ 2007).

Bei der Wirkung von oxLDL auf bereits aktivierte Tz im PRP spielt der Lox-1-Rezeptor (siehe Kapitel 2.2.2.1) eine wesentliche Rolle. Seine Expression auf der Tz-Oberfläche steigt um das 1,5-2fache nach Stimulation durch ADP (Chen M 2001). Die Ergebnisse der Studie von Marwali et al legen zudem nahe, dass eine Aktivierung von Lox-1 einen Einfluss auf die Bindung von Fibrinogen hat und damit an der Aggregation von Tz beteiligt ist (Marwali MR 2007).

Unter dem Einfluss von verschiedenen Entzündungsmediatoren kommt es zur Bildung von Plättchen-Neutrophilen-Aggregaten (PNA) (von Hundelshausen P 2007, Totani L 2010), und gegenseitiger Stimulation (Lievens D 2010, Drechsler M 2010, Lievens D 2011). Auch oxLDL allein vermag die Bildung von PNAs im mit Leukozyten angereicherten Blut über die Stimulation von thrombozytärem P-Selectin anzuregen. Offenbar vermittelt über die Zell-Zell Interaktionen der PNAs, da unabhängig von löslichen Mediatoren, kommt es in der Folge zum gesteigerten Durchtritt von Neutrophilen durch das Endothel, was fortschreitende endzündliche Prozesse begünstigen kann (Badrnya S 2012). Eine Stimulation von Tz im Citrat-antikoagulierten Blut durch Inkubation mit oxLDL beobachteten auch Tornvall et al. 10minütige Inkubation von Blut mit oxLDL steigerte die ADP induzierte Tz Aggregation im Impedanz-Aggregometer signifikant (Tornvall P 1999).

### 2.3.4 Natives HDL

Der Großteil der Studien zeigt eine hemmende Wirkung von nativem HDL (natHDL) auf die Tz Funktion. In einer frühen Studie konnte bereits gezeigt wer-

den, dass die Thromboxan A2 Produktion von TZ während spontaner Gerinnung von Blut unter dem Einfluss von natHDL gehemmt wird (Beitz A 1990).

In gewaschenen Tz hemmt eine Inkubation mit natHDL die Thrombin und ADP induzierte Aggregation (Nofer JR 1998, Assinger A 2008). Plausible Erklärung dafür könnte einerseits der Effekt von HDL auf die thrombozytäre Fibrinogen-Bindung sein: die Anzahl der an Tz gebundenen Fibrinogen Moleküle sank nach 5minütiger Inkubation gewaschener Tz mit HDL und Stimulation durch Thrombin signifikant (Nofer JR 1998), andererseits ging auch die ADP-induzierte P-Selectin Expression der isolierten Tz unter dem Einfluss von HDL signifikant zurück (Assinger A 2008). In einer anderen Studie wurde der hemmende Effekt von HDL auf die Aggregation isolierter Tz in Zusammenhang mit einem Anstieg der NO-Synthase Aktivität in den Tz gebracht (Chen LY 1994).

Inkubation mit natHDL hemmt offensichtlich die auch durch oxLDL bereits hervorgerufene Aktivierung von Tz: Badrnya et al konnten zeigen, dass die oxLDL-induzierte intrazelluläre ROS Bildung in gewaschenen Tz (siehe Kapitel 2.3.3) gehemmt und die Expression von CD40L durch Inkubation mit HDL zurückging. Die durch oxLDL angeregte Bildung von PNAs in mit Leukozyten angereichertem Blut ging durch Inkubation mit natHDL wieder zurück (Badrnya S 2013).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen beobachteten Valiyaveettil et al im Aggregationsversuch mit gewaschenen Tz keinen signifikant hemmenden Effekt von nativem HDL. Eine Thrombin induzierte Tz Aggregation wurde hier nicht signifikant durch Inkubation mit natHDL beeinträchtigt. Bei höheren Konzentrationen von natHDL war zwar auch der hemmende Effekt größer, eine Signifikanz wurde dennoch nicht erreicht. Die Verfasser der Studie betonen, dass eine potentielle Oxidation von HDL sorgfältig vermieden wurde (Valiyaveettil M 2008).

Der Hauptrezeptor für HDL, SR-B1, befindet sich auch auf der Oberfläche von Tz. Imachi et al beobachteten eine negative Korrelation zwischen der Menge an exprimiertem Sr-B1 und der ADP induzierten Aggregation gewaschener Tz (Imachi H 2003). Bei in vivo Versuchen mit Mäusen konnte die hemmende Wirkung des nativen HDL auf die Tz-Funktion bestätigt und in einen Zusammenhang mit dem Rezeptor SR-B1 gebracht werden. Korporaal et al verglichen die Zeit bis zum throm-

botischen Verschluss der Karotisarterie nach Applikation von FeCl<sub>3</sub> an die Arterienwand von SR-B1 -/- Mäusen mit Wildtyp Mäusen (Korporaal SJ 2011). Der Verschluss der Arterie entstand bei den Knockout Mäusen doppelt so schnell wie beim Wildtyp. Die Forschungsgruppe zeigte mit Hilfe der Durchflusszytometrie, dass Tz von SR-B1 -/- Mäusen im Vergleich zu den Tz des Wildtyps in einem aktivierte Zustand zirkulieren: auf der Oberfläche der TZ von SR-B1 -/- Mäusen stieg der Anteil an Integrin α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> in der aktiven, Fibrinogen-bindenden Konformation und auch die Menge an P-Selectin nahm signifikant zu, beides Anzeichen einer Tz-Aktivierung und mögliche Erklärung für die höhere Thromboseanfälligkeit bei Fehlen des SR-B1 Rezeptors (Korporaal SJ 2011).

### 3 Fragestellung

Bei der Erforschung kardiovaskulärer Erkrankungen ist die Interaktion zwischen Tz und Lipoproteinen im Blutkreislauf von Bedeutung. Außer HDL und LDL befindet sich auch oxidativ modifiziertes LDL in der Zirkulation und könnte einen direkten Einfluss auf Tz ausüben. Bei der Oxidation der Lipoproteine entstehende Lipide wie Lysophosphatidsäure (LPA) könnten dabei die aktiven Substanzen darstellen

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie Tz im Blut reagieren, wenn sie über unterschiedlich lange Zeitperioden von 1min bis 90min mit erhöhten Konzentrationen von LDL, HDL und oxidativ modifiziertem LDL bzw. Oxidationsprodukten wie LPA inkubiert werden. Dabei sollten insbesondere die Fragen beantwortet werden, ob sich der Tz-aktivierende Einfluss von nativem und milde oxidiertem LDL unterscheidet, ob LPA eine Tz-aktivierende Komponente von moxLDL darstellt und ob HDL den zu erwartenden hemmenden Effekt zeigt.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Geräte

Aggregometer	Lumi-Aggregometer (Chronolog, Havertown, PA) Kanal-LABOR®-Aggregometer, Fresenius AG (Bad Homburg, Deutschland)
Impedanzaggregometer	Multiplate® (Dynabyte Medical, München, Germany) Durchflusszytometer FACScan, Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Ultrazentrifuge	Ultrazentrifuge L7-55 Beckman Coulter GmbH Sinsheim, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge pico und Megafuge 1.0RS, Heraeus Sepatech (Osterode, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen)
Spectrophotometer	Bio-Rad SmartSpec 3000
Wasserbad	GFL GmbH (Burgwedel, Deutschland)
Lichtmikroskop	D-65323, Leitz (Wetzlar, Deutschland)

#### 4.1.2 Puffer

BSA Puffer	150 mM NaCl 10mM Hepes 0,25mM Bovines Serumalbumin (BSA)
PBS	Dulbecco's Phosphate buffered Saline (Sigma-Aldrich Taufkirchen, Germany)
Puffer B (pH 6,2)	20 mM HEPES 2,9 mM KCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 0,36 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 138 mM NaCl

---

Puffer C (pH 7,4)	20 mM HEPES 2,9 mM KCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 0,36 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 138 mM NaCl
Dichtegradient 1	Dichte: 1,080g/l Aqua destillata 1g/l EDTA 120g/l NaCl
Dichtegradient 2	Dichte: 1,050g/l Aqua destillata 1g/l EDTA 74g/l NaCl
Dichtegradient 3	Dichte: 1,000g/l Aqua destillata 1g/l EDTA
Dialysepuffer	150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,05% (w/v)

#### 4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Acetylsalicylsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
ADP	50704, Trinity Biotech Company (Lemgo, Deutschland)
Apyrase	Adenosindi-/triphosphatase (A-7511, Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
BD FACS Lysing Solution (Erythrolyselösung)	(Erythrolyselösung) BD Biosciences (Bedford, MA, USA)
BSA - Bovines Serumalbumin	Thermo Fisher Scientific
BSA - fettsäurefrei	A-7511, Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
BHT: Butyliertes Hydroxytoluen	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

## Material und Methoden

---

Cholesterin FS Reagenz	Diagnostic Systems GmbH
Citrat, Trinatriumsalz	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
(±)-epinephrine	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ethyldiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Glucose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
Kaliumbromid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kollagenreagens (Horm®)	Nycomed Pharma (Unterschleissheim, Deutschland)
Kupfersulfat CuSO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Lysophosphatidsäure (LPA)	1-Palmitoyl-sn-glycero-3phosphate; Alexis Corp. (San Diego, CA, USA)
LPA5 Rezeptor Antagonist	PGM029615; Takeda Cambridge Ltd (Cambridge, England)
Malondialdehyd	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Refludan® Lepirudin,	Pharmion Ltd. (Marburg, Deutschland)
Thiobarbitursäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
TRAP-6 (PAR-1 agonist)	Bachem Distribution (Weil am Rhein)
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Zitronensäure

Merck (Darmstadt)

#### 4.1.4 Antikörper

PE Mouse Anti-Human CD41a

BD Biosciences  
(Bedford, MA, USA)

monoklonales anti-CD41a Mäuse IgG1,  
PE-gebunden

FITC Mouse Anti-Human PAC-1

BD Biosciences  
(Bedford, MA, USA)

monoklonales anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 Mäuse IgM  
FITC gebunden

Mouse anti Human CD62P antibody  
monoklonales anti-P-Selectin Mäuse IgG1  
FITC-gebunden

Bio-Rad AbD Serotec GmbH

#### 4.1.5 Verbrauchsmaterialien

Butterflykanülen (20-Gauge)

Intermedica GmbH  
(Mainz, Deutschland)

THROMBO-PLUS®-Röhrchen

Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

Entsalzungssäulen

EconoPac 10 DG Desalting Columns, Fa.BioRad

Konzentratoren

Pierce™ Protein Concentrator PES,  
100K und 30K *Molecular Weight Cut-Off*, 5-20ml Thermo Fisher Scientific

Lumi-aggregometer cuvettes, 450 $\mu$ l

Chronolog, Havertown, PA

Lumi-aggregometer  
disposable siliconized stir bars

Chronolog, Havertown, PA

Multiplate®-test cells

Dynabyte Medical  
(München, Deutschland)

## 4.2 Methode

### 4.2.1 Blutgewinnung

Blut wurde aus der Vena cubitalis gesunder, 20-40jähriger Probanden gewonnen, welche während der letzten 2 Wochen keinerlei Medikamente eingenommen hatten. Eine schriftliche Einverständniserklärung der Probanden in Übereinstimmung mit dem Helsinki Protokoll wurde vor der Blutentnahme eingeholt.

Die Blutabnahme erfolgte mittels einer 20 Gauge Butterfly-Kanüle in eine, je nach benötigter Menge, 20 oder 50ml Plastikspritze. In der Spritze war bereits eine dem Versuchsansatz entsprechendes Antikoagulans (1/10 des Blutvolumens) vorgelegt. Die ersten 3ml Blut wurden stets verworfen, um eine Verunreinigung des Blutes durch Gewebsthromboplastin zu verhindern.

Für die Multiplate- und FACS - Versuche im Blut wurde rekombinantes Hirudin in 0,9% NaCl gelöst, die finale Konzentration im Blut betrug 200U/ml. Zur Herstellung von PPP, PRP oder einer Suspension von gewaschenen Tz wurde eine 3,8%ige Trinatriumzitratlösung als Antikoagulanz verwendet.

### 4.2.2 Herstellung von Thrombozyten Suspensionen

#### 4.2.2.1 Herstellung von PRP und PPP

Direkt im Anschluss an die Blutabnahme wurde das Trinatriumzitrat-antikoagulierte Blut in 50ml Polypropylenröhrchen überführt und für 20min bei RT mit 160 x g (ohne Bremse) zentrifugiert. Aus dem Überstand konnte das PRP mit einer Polypropylenpipette aspiriert werden. Die Zählung der Tz erfolgte wie unter 4.2.2.3 beschrieben.

Für die Gewinnung von plättchenarmen Plasma (PPP) wurde das PRP nochmals für 10min bei 1000g (mit Bremse) zentrifugiert und der Überstand, der das PPP enthielt, vorsichtig abpipettiert.

#### 4.2.2.2 Herstellung einer Suspension gewaschener Thrombozyten

PRP wurde mit Acetylsalizylsäure (ASS, 1mM) und Apyrase (ADPase-Aktivität 0,5 U/l) versetzt, für 15min bei 37°C inkubiert und anschließend mit Zitronensäure (9mM) und EDTA (5mM) versehen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 800g für 20min bildete sich auf dem Boden des Röhrchens ein Tz-Pellet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in auf 37°C erwärmten Waschpuffer B vorsichtig resuspendiert. Puffer B enthielt zusätzlich Apyrase (f.c. 0,3U/ml) und war auf einen sauren pH-Wert von 6,2 eingestellt. Tz wurden in dieser Suspension, wie unter 4.2.2.3 beschrieben, ausgezählt.

Die Tz-Suspension wurde abermals für 20min bei 800g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Pellet mit Puffer C resuspendiert, welcher ebenfalls auf 37°C vorgewärmt wurde und Apyrase in einer finalen Konzentration von 0,3U/ml enthielt. Um eine Lösung mit der gewünschten Tz Konzentration von 500000/ $\mu$ l zu erhalten, wird die verwendete Menge an Puffer C nach folgender Formel ermittelt:

$$\frac{\text{gezählte TZ-Zahl in Puffer-B-Suspension} \times 10.000 \times 10\text{ml Puffer B}}{\text{gewünschte Tz-Zahl } / \mu\text{l Puffer-C-Suspension}} = \text{ml Puffer C}$$

Die fertige Suspension wurde mit Glukose in einer finalen Konzentration von 5mM versetzt und für mindesten 30min bei RT ruhen gelassen, um eventuelle Voraktivierungen und Desensibilisierungen abklingen zu lassen. Die Aggregationsversuche mit gewaschenen Tz wurden bis 4h nach Blutabnahme durchgeführt.

#### 4.2.2.3 Zählung Thrombozyten

Für die Zählung der TZ wurden 10 $\mu$ l der Proben entnommen, in ein Sarstedt-Röhrchen mit 2ml THROMBO-PLUS®-Puffer pipettiert und geschwenkt. Ein Tropfen der Suspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Nach 5min konnten 5 Felder mit Hilfe des Lichtmikroskops Leitz D-65323 gemäß Herstellerangaben ausgezählt werden.

### **4.2.3 Gewinnung und Modifikation von LDL**

#### **4.2.3.1 Gewinnung von LDL und HDL**

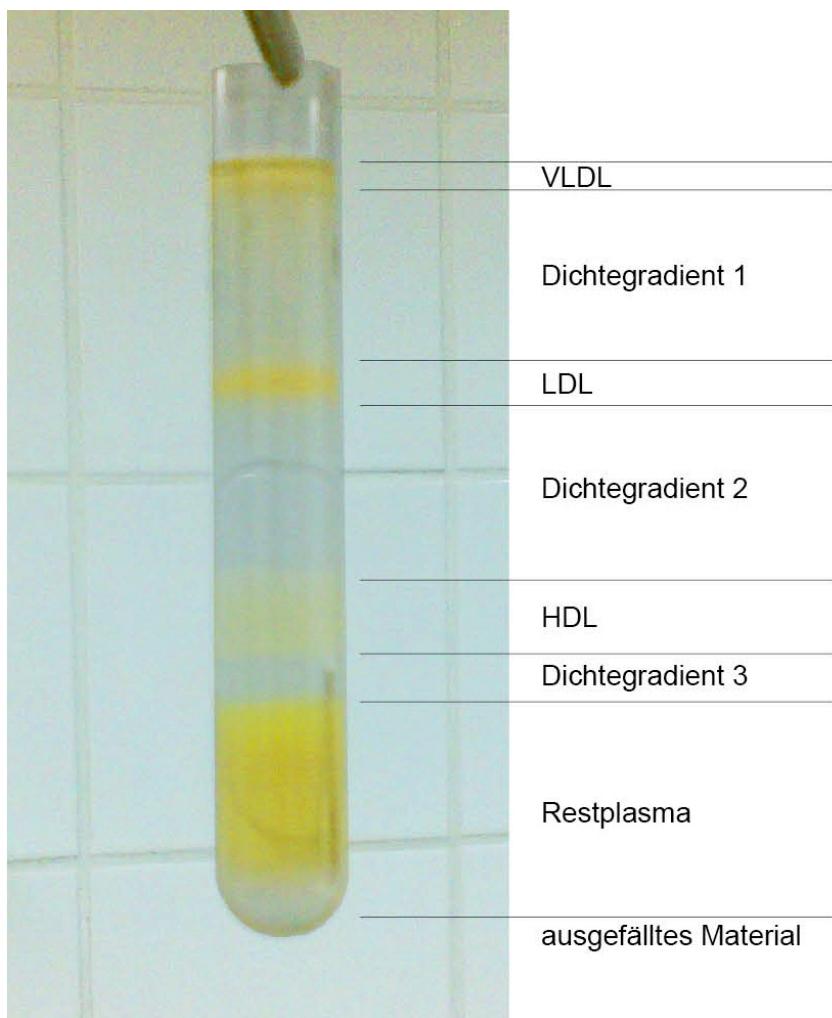
EDTA-Blut (50-60ml) wurde wie unter 4.2.1 beschrieben entnommen und in Anlehnung an das Verfahren von Schulz et al (Schulz T 1995) weiter verarbeitet. Das Blut wurde sofort nach Entnahme bei 4000rpm und 10°C für 30min zentrifugiert, das Plasma mit einer Pipette entnommen und mit Kaliumbromid (KBr 3,45mM f.c.) auf eine Dichte von 1,41g/ml eingestellt. Anschließend wurden jeweils 4ml Plasma in ein Ultrazentrifugen-Röhrchen der Fa. Beckmann pipettiert und mit dem folgenden dreistufigen Dichtegradienten überschichtet:

Dichtegradient 1: 1,080 g/ml: 3,5ml

Dichtegradient 2: 1,050 g/ml: 3ml

Dichtegradient 3: 1,000 g/ml: 3ml.

Jeder Dichtegradient bestand aus destilliertem Wasser und enthielt die für die Einstellung der Dichte benötigte Menge an NaCl sowie 1mg/ml EDTA als Oxidations- schutz. Pro Zentrifugationsschritt konnten 6 Röhrchen, also insgesamt 24ml Plas- ma, eingesetzt werden.



**Foto 1: Lipoproteinauf trennung**

Zentrifugenröhrlchen nach 24-stündiger Ultrazentrifugation und erfolgreicher Auf trennung der Lipoproteine

Nach 22-24h Ultrazentrifugation in einem Beckmann Ti 50.2 Rotor bei 256.000xg waren die im Blut enthaltenen Lipoproteine durch die Dichtegradienten separiert und konnten von der Oberfläche aus mit einer Pipette vorsichtig aspiriert werden. Dabei wurden die ersten beiden Schichten, VLDL und Dichtegradient 1, sowie die beiden letzten Schichten, Dichtegradient 3 und Restplasma, verworfen. Bis zur Weiterverarbeitung wurden LDL und HDL mit Stickstoff überschichtet, bei Dunkelheit und 4°C für maximal 1 Woche in 15ml Sarstedt Röhrchen gelagert. Für einen Versuch wurden die Lipoproteine von 4 verschiedenen Spendern gepoolt.

#### **4.2.3.2 Entfernung der Salze, Bestimmung der Proteinmenge und des Cholesterins sowie Konzentration der Lipoproteine**

Die exakte Bestimmung der Proteinkonzentration von HDL und LDL erfolgte nach der Methode von Smith et al (Smith PK 1985), bei der Kupferionen durch Proteine reduziert und einen farbigen Komplex mit BCA (*Bicinchoninic Acid*) bilden. Dieser Komplex ist wasserlöslich, seine Menge verhält sich linear zur Proteinkonzentration und er kann photometrisch im Fotometer bei 562nm Wellenlänge gemessen werden. Wir verwendeten das Bio-Rad SmartSpec 3000 Spectrophotometer. Die Eichkurve wurde mit bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt. Die benötigten Substanzen und die Vorgaben für die Verdünnungen zur Erstellung der Eichkurve stammten von der Firma ThermoScientific (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoScientific). Die Proteinmenge des durch die Ultrazentrifugation separierten LDL betrug zwischen 1,2-1,5mg/ml, die des HDL 2,7-3,1mg/ml.

Vor den Experimenten wurden zur Entfernung von KBr, NaCl und EDTA aus den Lipoproteinlösungen diese (2,5ml) auf Entsalzungs-Säulen (EconoPac 10 DG Desalting Columns, Fa. BioRad) aufgetragen, und mit PBS (3,5ml) eluiert. Die Säulen enthalten eine Polyacrylamidgel-Matrix, welche gewährleistet, dass Substanzen mit einem Molekulargewicht von >6000 Dalton in den Poren des Gels zurückgehalten werden und Substanzen <6000 Dalton ausgeschlossen werden.

Die nun nicht mehr durch EDTA vor Oxidation geschützten Lipoproteinlösungen wurden sofort aufkonzentriert. Dafür wurden Konzentratoren der Firma Thermo Fisher Scientific™ mit der Porengröße 100K MWCO (*Molecular Weight Cut-Off*) für LDL und 30K MWCO für HDL verwendet. Durch 60-90minütige Zentrifugation bei 4000g wurde LDL auf eine finale Konzentration von 16- 20mg/ml und HDL auf 8-10mg/ml eingeengt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Lipoproteine wieder mit Stickstoff überschichtet, bei Dunkelheit und 4°C für maximal 36h in 15ml Sarstedt Röhrchen gelagert.

Im Plasma, welches zur Gewinnung von LDL und HDL sowie für die Tz-Aggregationsversuche im Blut verwendet wurde, wurden Gesamt-, LDL- und HDL-Cholesterin (HDL-C) sowie Triglyceride bestimmt. Diese lagen bei den gesunden, jungen Probanden erwartungsgemäß in einem im ähnlichen Bereich:

	MW +/- SD von n=8 Spendern
Gesamtcholesterin	166 +/- 19 mg/dl
LDL-Cholesterin	89 +/- 18 mg/dl
HDL-Cholesterin	54 +/- 6 mg/dl
Triglyceride	71 +/- 16 mg/dl

**Tabelle 1: Plasmalipidprofile der Probanden**

(MW+/-SD; n=8)

Die Bestimmung erfolgte mit einem enzymatischen photometrischen Test von Deeg et al (Deeg P 1983). Dabei werden die Cholesterinester zunächst enzymatisch hydrolysiert und oxidiert. Durch die Wirkung von Peroxidase entsteht schließlich Chinonimin, ein violetter Farbstoff, welcher bei einer Wellenlänge von 500nm absorbiert und photometrisch gemessen wird. Das verwendete Reagenz stammte von der Firma DiaSys (Diagnostic Systems GmbH).

#### 4.2.3.3 Herstellung von moxLDL

In den Versuchen wurde milde oxidiertes LDL (moxLDL) verwendet. Das native, entsalzte und aufkonzentrierte LDL wurde gemäß Protokoll von A. Weidtmann mit Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) versetzt. Bei einer LDL Konzentration von 20mg/ml wurde  $\text{CuSO}_4$  in einer finalen Konzentration von  $640\mu\text{M}$  eingesetzt, bei einer geringeren LDL Konzentration entsprechend weniger. Die Substanzen wurden gut durchmischt und in einem 50ml Sarstedt Tube in horizontaler Lage über 24h bei  $37^\circ\text{C}$  im Wärmeschrank inkubiert. Nach Ablauf der 24h hatte sich das LDL deutlich verändert: von ursprünglich klar und orange war die Färbung zu opaque und gelb übergegangen.

Die Bestimmung des Ausmaßes der Lipidperoxidation erfolgte über die Messung der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS), nach Wallin et al (Wallin B 1993). Dabei handelt es sich um Malondialdehyd und andere Aldehyde, welche

## Material und Methoden

---

durch Oxidation der ungesättigten Fettsäuren in den Lipoproteinen entstehen. Durch die Reaktion mit Thiobarbitursäure entsteht ein violetter Farbstoff, welcher photometrisch bestimmt werden kann.

50µg LDL Protein wurden durch Zugabe zu 1ml 20% Trichloressigsäure und 0,1% Butylhydroxytoluol (BHT) ausgefällt. Thiobarbitursäure (1%, in NaOH gelöst) wurde hinzu pipettiert, der Ansatz geschüttelt und im Wasserbad bei 90-95°C für 40min erhitzt, wobei eine violette Färbung entstand. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 800g und 20°C wurde der Überstand vorsichtig aspiriert und seine Absorption bei 532nm im Photometer (Bio-Rad SmartSpec 3000 Spectrophotometer) bestimmt. Die Eichkurve wurde mit Malondialdehyd erstellt. Das in den Versuchen verwendete moxLDL wies einen Gehalt von 10 +/- 2 nmol TBARS/mg Protein (MW+/-SD; n=11) auf. Das verwendete natLDL wies mit einem Gehalt von 0,38+/-0,16nmol TBARS/mg Protein nur Spuren einer Oxidation auf.

Experiment Datum	moxLDL			natLDL		
	OD	nmol/ml	nmol/mg Protein	OD	nmol/ml	nmol/mg Protein
1 01.12.11	0,21	0,5	10	0,01	0,025	0,5
2 14.12.11	0,19	0,45	9	0,01	0,025	0,5
3 15.12.11	0,21	0,5	10	0,007	0,018	0,36
4 10.01.12	0,18	0,43	8,6	0,0015	0,004	0,08
5 17.01.12	0,197	0,47	9,4	0,0062	0,015	0,3
6 18.01.12	0,11	0,26	5,2	0,003	0,007	0,14
7 25.07.12	0,26	0,62	12,4	0,01	0,025	0,5
8 26.07.12	0,25	0,6	12	0,01	0,025	0,5
9 01.08.12	0,225	0,55	11	0,0067	0,015	0,3
10 07.08.12	0,233	0,55	11	0,01	0,025	0,5
11 08.08.12	0,241	0,57	11,4	0,01	0,025	0,5
MW		0,50	10,00		0,02	0,38
STAW		0,10	2,00		0,01	0,16

**Tabelle 2: Gehalt an TBARS in moxLDL und natLDL**

Ermittlung der Lipidperoxidation durch Bestimmung der TBARS im Photometer bei einer Wellenlänge von 532nm nach Wallin et al (Wallin B 1993). Als Standard diente Malondialdehyd.

### 4.2.4 Gewinnung Plaque

Die in unseren Versuchen verwendeten Plaques stammten von Patienten, welche auf Grund einer Karotisstenose eine gefäßchirurgische Operation durchführen

lassen mussten. Das schriftliche Einverständnis der Patienten zur Entnahme der Proben und die Genehmigung der Ethikkommission der LMU München lagen vor dem Durchführen des Eingriffs vor.

Bei der Operation wurde die atherosklerotische Läsion „en bloc“ entnommen; Media, Adventitia sowie gesunde Intima wurden geschont (Brandl R 1997). Nach Entnahme wurde die zentrale atheromatöse Plaqueregion mit fibröser Kappe und lipidreichem, nekrotischem Kern sorgfältig von den angrenzenden Bereichen, wie der distal gelegenen Plaqueschulterregion, dem Übergang zwischen gesunder Intima und der eigentlichen Läsion, und einer proximal der Läsion situierten Region mit diffuser Verdickung der Intima getrennt (Brandl R 1997). Ein Teil der Probe wurde sodann histomorphologisch untersucht, ein anderer Teil wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Die Weiterverarbeitung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Plaqueproben wurden langsam auf Eis aufgetaut, abgewogen, mit einem scharfen Skalpell zerkleinert und per Glaspotter in einem zylindrischen Glaspistill in Puffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA) homogenisiert (pH 7,4). Es wurde eine Endkonzentration von 100mg/ml Feuchtgewicht eingestellt. Bis zur Weiterverwendung wurde die Plaquesuspension in 100µl Portionen aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Nochmaliges Einfrieren und Wiederauftauen wurde vermieden.

#### **4.2.5 Vorbereitung von LPA und LPA5 Rezeptor Antagonist PGM029615**

LPA wurde in einer Lösung aus 80% Ethanol und 20% H<sub>2</sub>O bei -20°C gelagert. Für die Versuche wurden hiervon 100µl mit N<sub>2</sub> abgedampft und das verbleibende Sediment mit der gleichen Menge an BSA-Puffer resuspendiert, wodurch man eine 1mM Lösung erhielt.

Der pharmakologische LPA5 Rezeptor Antagonisten PGM029615 wurde genauso wie LPA gelagert, jedoch wurden 33,3µl dieser Lösung mit 200µl BSA-Puffer resuspendiert, um eine 1mM Lösung zu erhalten. Für die weitere Verwendung wurde diese nochmals mit BSA-Puffer auf eine Konzentration von 0,1mM verdünnt.

#### 4.2.6 Experimente

##### 4.2.6.1 Bestimmung der Thrombozyten-Aggregation im Blut

Die Tz-Aggregation im Blut wurde mit der von Toth et al beschriebenen Multiplate Analyse bestimmt (Toth O 2006). Es wurden zwei Mutiplate®-Geräte der Firma Dynabite verwendet.

In nicht aktiviertem Zustand zirkulieren Tz im Blut, werden sie jedoch durch Agonisten stimuliert, kommt es zur Adhäsion und Aggregation. Diese Tatsache wird bei der Multiplate Analyse genutzt. In der Messzelle des Mutiplate®-Geräts adhärieren die aktivierte Tz an einer Sensoroberfläche, einem Elektrodenpaar aus Anode und Kathode, und der elektrische Widerstand, die Impedanz, steigt. Dieser Widerstand wird bestimmt und stellt ein Maß für die Plättchenaggregation dar. Die Änderung des Widerstandes, also die zunehmende Aggregation, wird fortlaufend vom Mutiplate®-Gerät aufgezeichnet und als Kurve gegen die Zeit aufgetragen. Die Fläche unter der Kurve (*Area under the Curve = AUC*) wird schließlich bestimmt und in Aggregationseinheiten (AU\*min), als Maß bezogen auf die Zeit, angegeben. Die Aggregationsversuche mit Blut im Mutiplate®-Gerät wurden zwischen 30min und 3h nach Blutentnahme durchgeführt.

Wenn nicht anders angegeben, wurde Hirudin-antikoaguliertes Blut zu gleichen Teilen mit 0,9% NaCl-Lösung vermischt und in der Multiplate®-Einwegmesszelle bei 37°C für meist 10min vorinkubiert. Danach wurde ein magnetischer Polytetrafluorethylen-beschichteter Rührstab hinzugegeben und die Probe bei 800 rpm für 3min gerührt. Anschließend wurden die Tz-Stimuli (LPA, Adrenalin, atheromatöses Plaquematerial, Kollagen und ADP) zugegeben und die Veränderung der elektrischen Impedanz während 5min aufgezeichnet.

Bei den Versuchen zur Wirkung von moxLDL auf die Tz Funktion nach Inkubation, dargestellt in Abb. 5, setzte sich das pro Messzelle benötigte Volumen von 600µl folgendermaßen zusammen: Die für jeden Einzelversuch benötigte Menge von absolut 2,4mg natLDL und moxLDL bzw. 1,2mg HDL, jeweils gelöst in PBS, wurde durch Zugabe von 0,9% NaCl-Lösung auf ein Volumen von 300µl gebracht und mit 300µl Hirudin-antikoaguliertem Blut gemischt. Die jeweilige Kontrolle beinhaltete die gleiche Zusammensetzung aus Hirudinblut und PBS/NaCl bzw. DG2/NaCl.

Das Mengenverhältnis von PBS, LDL, HDL und DG2 zu NaCl variierte zwischen den verschiedenen Versuchen, da nicht immer die exakt gleiche Konzentration bei der Einengung von LDL und HDL erreicht wurde.

Die so vorbereiteten Proben wurden für insgesamt 60min vorinkubiert, davon 57min bei 37°C im Wasserbad. Die Proben wurden alle 10min vorsichtig geschwenkt. Für die letzten 3min Inkubationszeit wurden die Proben in die Messzelle des Mutilate®-Geräts pipettiert. Anschließend wurden der Rührer und die Agonisten Kollagen, ADP, Plaque oder Trap hinzugefügt und die Messung gestartet.

#### **4.2.6.2 Versuche zum Gestaltwandel und zur Aggregation**

Die Experimente zum Gestaltwandel und der Aggregation von Tz in PRP und in Suspensionen isolierter Tz wurden in einem Lumi-Aggregometer (Chronolog, Haverford, PA) nach der turbidimetrischen Methode von Born (Born GV 1963) durchgeführt. Dabei wird die Lichttransmission durch die verwendete Lösung unter ständigem Rühren bei 1100rpm und 37°C im Vergleich zur Lichttransmission einer entsprechenden Referenzlösung gemessen und fortlaufend aufgezeichnet. Referenzlösung für PRP war PPP, als Referenz für gewaschene Tz wurde eine plättchenarme Suspension aus 300µl Tz-Suspension und 100µL Puffer C verwendet.

In unseren Versuchen wurden jeweils 400µl der untersuchten Suspension nach vorheriger Inkubation bei 37°C in einer Küvette im Aggregometer platziert. Je nach Versuchsanordnung wurde die Basallinie während 0,5min aufgezeichnet, danach wurden 1 bis 3 Agonisten im Abstand von jeweils 1 bis 2min hinzugefügt.

Nach Stimulation kommt es zunächst zum Gestaltwandel, die Lichttransmission nimmt ab. Bei stärkerer Stimulation aggregieren anschließend die Tz und die Lichttransmission nimmt zu. Je nach Grad der Aktivierung ist die Aggregation reversibel oder irreversibel.

#### **4.2.6.3 Bestimmung der Thrombozyten Aktivierung nach Inkubation**

Die Messung der P-Selectin-Expression und der aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptoren auf Tz im Blut erfolgte mittels Durchflusszytometrie im BD FACS-Calibur-Gerät der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland).

## Material und Methoden

---

Die Methode der Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von Zellen, welche einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laserstrahl vorbeifließen. Dabei können mehrere Parameter gleichzeitig erfasst werden. Zum einen kann durch die Beurteilung der Lichtstreuung eine Aussage über den Zelltyp gemacht werden. So erlaubt die Auswertung der Streuung im flachen Winkel nach vorne, der sogenannte Forward-Scatter (FSC), eine Aussage über die Größe der Zelle, während die Streuung im rechten Winkel, der sogenannte Side-scatter (SSC), von Granula, welche in den Zellen eingelagert sind, verursacht wird. Zum anderen kann über die Messung von Fluoreszenz ein Nachweis über die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle erbracht werden. Dabei werden spezifische Antikörper verwendet, welche an fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt sind. Das entstehende Fluoreszenzsignal wird vom selben Detektor empfangen wie das Streulicht.

In den Versuchen wurde der Zelltyp (Tz) durch CD41a Antikörper (erkennt GPIIb auf der Tz-Oberfläche) identifiziert. Um eine Aussage über die Tz-Aktivierung zu machen, wurde die P-Selectin-Expression mit Hilfe von CD62 Antikörper und die Detektion der aktiven Konformation des Fibrinogen-Rezeptors mittels des PAC-1 Antikörpers gemessen.

Die Blutabnahme erfolgte wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben. Es wurde Hirudin-antikoaguliertes Blut verwendet. Jeweils 400 $\mu$ l Hirudinblut wurden in der Aggregationsküvette eines 2-Kanal-Labor-Aggregometers (Fresenius) mit Albumin (Kontrolle), LPA (20 $\mu$ M), Kollagen (0,3 $\mu$ g/ml) oder Plaque (1,25mg Feuchtgewicht/ml) im Thermoblock bei 37°C für 13min ohne Rühren inkubiert. Anschließend wurden die Proben (100 $\mu$ l) mit jeweils 15 $\mu$ l PE-konjugiertem (rot fluoreszierend) anti-CD41a Antikörper und FITC-konjugiertem (grün fluoreszierend) PAC-1 bzw. CD62 Antikörper während 15min bei Raumtemperatur (RT) in der Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die Proben in Eppendorf-Gefäße pipettiert, in denen bereits 1ml Erythrolyselösung (BD FACS Lysing Solution) vorgelegt war, und für 15min bei RT stehen gelassen. Die auf diese Weise markierten und lysierten Proben wurden für 8min bei 800g und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das zurückbleibende Zellpellet mit BD CellFIX während 15min bei Dunkelheit und RT resuspendiert. Es folgte die Auswertung im Durchflusszytometer.

#### **4.2.7 Statistik**

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (MW $\pm$ SD) angegeben, n entspricht der Anzahl der Experimente. Für die statistische Analyse wurde der gepaarte und der ungepaarte zweiseitige T-Test und die 2-Faktoren-Varianz-Analyse verwendet. Ergebnisse wurden als signifikant betrachtet, wenn  $p < 0,05$  war.

## Material und Methoden

---

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Sensibilisierung und Desensibilisierung der Thrombozytenaggregation durch LPA

LPA wirkt in nM-Konzentrationen direkt auf gewaschene Tz, in  $\mu$ M-Konzentrationen auf Tz im Blut und ist eine Tz-aktivierende Substanz von moxLDL (Siess W 1999, Essler M 2000, Haserück N 2007). Eine Vorinkubation der Tz mit LPA desensibilisiert die Tz auf eine nachfolgende Stimulation mit LPA (homologe Desensibilisierung) (Gueguen G 1999, Haserück N 2007).

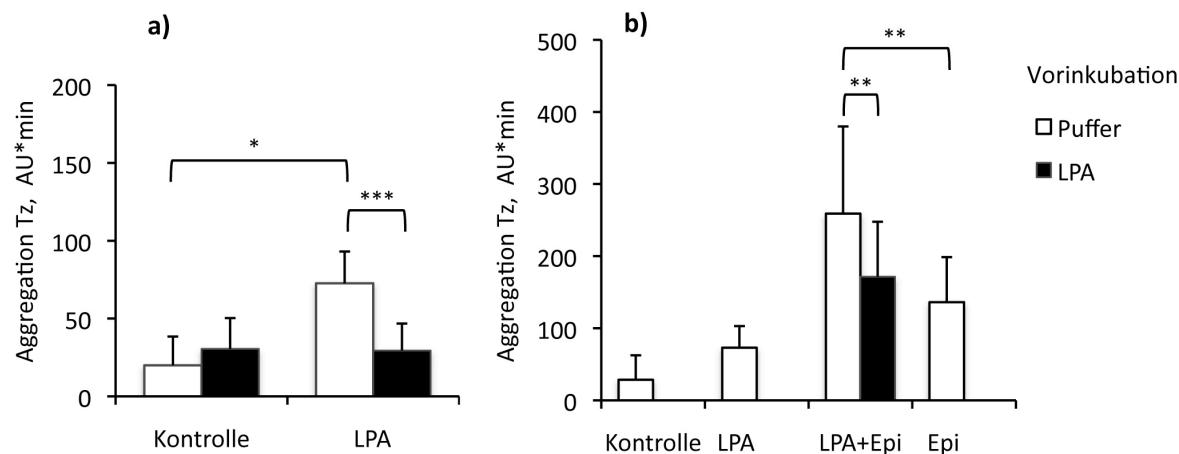
Es wurde daher die Wirkung einer Vorinkubation von Blut mit LPA auf die nachfolgende spontane und Stimulus-induzierte Aggregation von Tz im Blut mittels MEA gemessen. Hirudin-antikoaguliertes Blut wurde für 10min bei Raumtemperatur mit Kontroll-Puffer oder LPA ( $20\mu$ M) vorinkubiert.

#### 5.1.1 Vorinkubation mit LPA hemmt die LPA - induzierte Thrombozytenaggregation im Blut

Nach Vorinkubation mit Albumin-Puffer und anschließender Stimulation mit LPA kam es zu einer Tz-Aggregation, die durch Vorinkubation mit LPA komplett gehemmt werden konnte (Abb. 1a rechts). Es fand hier wie erwartet eine homologe Desensibilisierung statt: die LPA Rezeptoren der Tz im Blut wurden durch die Inkubation desensibilisiert und reagierten daher nicht mehr auf die 2. Zugabe von LPA. Nach Vorinkubation mit LPA war die Spontanaggregation im Vergleich zur Albumin-Kontrolle nicht signifikant erhöht (Abb. 1a links).

Wurde LPA zusammen mit Adrenalin (Epi), beides schwache Tz-Stimuli, zum Blut pipettiert, kam es zu einer synergistischen Tz-Aggregation. Auch hier ließ sich die Wirkung von LPA durch Vorinkubation mit LPA im Sinne einer homologen Desensibilisierung komplett hemmen (Abb. 1b).

## Ergebnisse



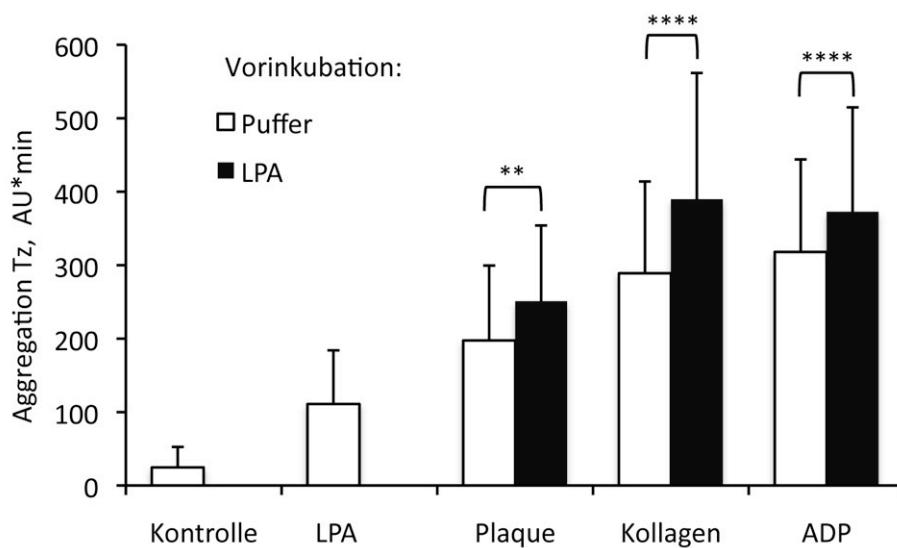
**Abb. 1 a + b: Homologe Desensibilisierung der Thrombozytenaggregation durch LPA**

Hirudin-antikoaguliertes Blut (0.3ml) wurde zu gleichen Teilen mit 0.9% NaCl-Lösung gemischt und für 10min mit albuminhaltigem Kontrollpuffer (12 $\mu$ l) oder LPA (20 $\mu$ M) bei Raumtemperatur vorinkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5min bei 37°C unter Rühren des Blutes ohne Stimulus (Kontrolle), mit LPA (20 $\mu$ M) alleine (Abb. 1a), oder mit LPA (20 $\mu$ M) und Epi (10 $\mu$ M) (Abb. 1b) inkubiert. Die kumulative Plättchenaggregation (AU\*min) wurde mittels Impedanzaggregometrie im Multiplate®-Gerät nach 5min gemessen. Die Werte sind die MW $\pm$ SD aus n=10 Experimenten.  
\*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,005

### 5.1.2 Vorinkubation mit LPA sensibilisiert die Thrombozytenaggregation induziert durch Plaque, Kollagen oder ADP im Blut

Nach Stimulation mit Plaque, Kollagen oder ADP wurde eine deutliche Tz Aggregation beobachtet. Diese Aggregation wurde durch Vorinkubation mit LPA für alle 3 Stimuli signifikant erhöht. Die Vorinkubation mit LPA führt offensichtlich zu einer Voraktivierung der Tz, die wiederum zu einer gesteigerten Antwort auf Stimulation durch andere Agonisten wie Kollagen, Plaque und ADP führt.

LPA akkumuliert im lipidreichen Kern atherosklerotischer Plaques und könnte bei der Plaque-induzierten Tz-Aggregation im Blut beteiligt sein. Nach der deutlichen Hemmung der LPA-induzierten Aggregation durch die LPA-Vorinkubation (Abb. 1a) wäre eher eine Verringerung statt einer Erhöhung der Plaque-induzierten Aggregation (Abb. 1c) zu erwarten gewesen. Offensichtlich ist der voraktivierende Effekt von LPA auf die Tz induziert durch andere Plaque-Bestandteile größer als der desensibilisierende Effekt auf die Wirkung der im Plaque enthaltenen LPA.



**Abb. 1c: Heterologe Sensibilisierung der Thrombozytenaggregation durch LPA**

Hirudin-antikoaguliertes Blut wurde wie in Legende zu Abb.1a beschrieben mit albuminhaltigem Kontrollpuffer (12 $\mu$ l) oder LPA (20 $\mu$ M) für 10min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die Proben wurden anschließend ohne Stimulus (Kontrolle), mit LPA (20 $\mu$ M), Plaquematerial (1,25mg Feuchtgewicht/ml), Kollagen (0,3 $\mu$ g/ml) oder ADP (5 $\mu$ M) inkubiert, und die kumulative Plättchenaggregation (AU\*min) mittels Impedanzaggregometrie im Multiplate®-Gerät nach 5min bestimmt. Die Werte sind MW $\pm$ SD aus n Experimenten: n=14 für Kontrolle, LPA, ADP; n=15 für Plaque, n=11 für Kollagen. \*\*p < 0,01, \*\*\*\*p < 0,001

## 5.2 Bedeutung der Inkubationszeit für die Wirkung von LPA

Eine Vorinkubation mit LPA führte zu einer heterologen Sensibilisierung der Tz. Mit den folgenden Versuchen sollte Klarheit darüber gewonnen werden, ob die Dauer der Inkubationszeit die Sensibilisierung der Tz durch LPA beeinflusste (Abb. 2), und ob sich diese Sensibilisierung als im Durchflusszytometer darstellbare Aktivierung der Tz nachweisen lässt (Abb. 3).

### **5.2.1 Dauer der Inkubationszeit hat keinen Einfluss auf die Sensibilisierung der Thrombozytenaggregation durch LPA**

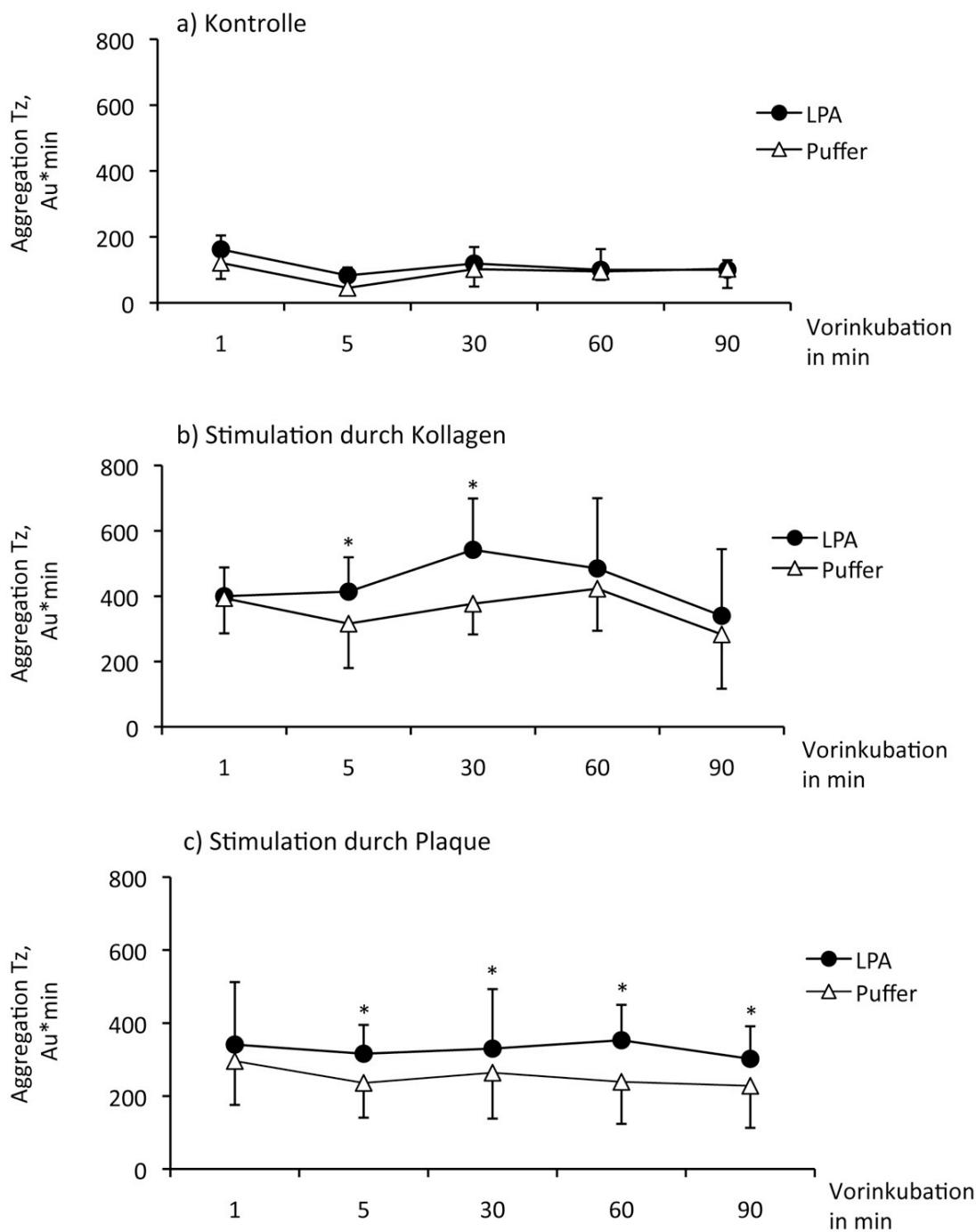
Blut wurde mit 20 $\mu$ M LPA oder Kontroll-Puffer für 1, 5, 30, 60 oder 90min bei 37°C vorinkubiert. Die Aggregation wurde anschließend im MEA gemessen.

Die Vorinkubation des Blutes mit LPA für 1 bis 90min zeigte keine Wirkung auf die durch den Start des Röhrens des Blutes induzierte Spontanaggregation im Vergleich zur Kontrolle (Vorinkubation mit Albumin).

5minütige und 30minütige Vorinkubation mit LPA ergab eine signifikante Sensibilisierung der Kollagen induzierten Tz Aggregation im Vergleich zur Vorinkubation mit Puffer, welche nach 60- und 90minütiger Vorinkubation nicht mehr beobachtet werden konnte. Die Tz-Aggregabilität auf Kollagen nahm nach 90min Vorinkubation mit und ohne LPA ab (Abb. 2b).

Die Plaque induzierte TZ Aggregation wurde signifikant durch Vorinkubation mit LPA für alle verwendeten Vorinkubationszeiten sensibilisiert. Lediglich bei der kurzen Vorinkubation von 1min erreichte die Sensibilisierung keine Signifikanz, vermutlich, weil die Einwirkzeit von LPA auf die Tz zu kurz war. Anders als bei Inkubation mit Kollagen, war bei Stimulation mit Plaque die Tz-Aggregation mit und ohne LPA Vorinkubation unabhängig von der Dauer der Vorinkubation konstant (Abb. 2c).

Vor allem bei Stimulation mit Plaque (Abb. 2c) lässt sich bereits visuell erkennen, dass der Unterschied zwischen Vorbehandlung mit Puffer oder LPA für alle Zeiten gleich und auch statistisch auf gleichem Niveau ist. Dies lässt sich sowohl für Plaque als auch für Kollagen außerdem statistisch belegen. Für beide Agonisten ist der Faktor Vorbehandlung (mit oder ohne LPA) signifikant, die Dauer der Vorbehandlung hingegen nicht. Daher kann geschlussfolgert werden, dass für die beobachtete Steigerung der Kollagen und Plaque induzierten TZ Aggregation lediglich die Vorinkubation mit LPA eine Rolle spielt, nicht aber die Dauer.



**Abb. 2a-2c: Einfluss der Inkubationszeit auf die Sensibilisierung der Thrombozytenaggregation durch LPA**

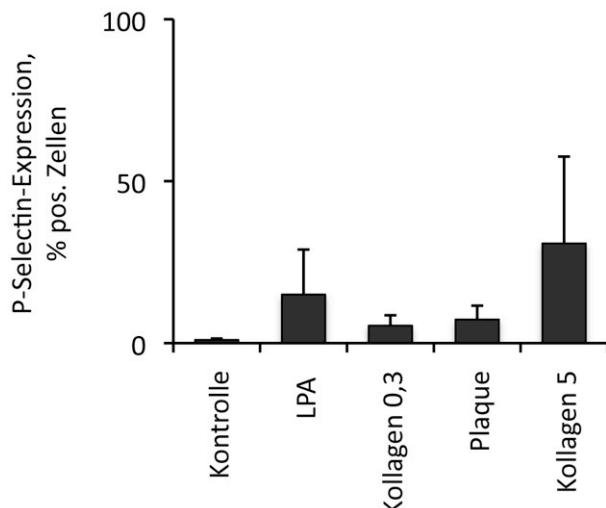
Hirudin-antikoaguliertes Blut (0,3ml) wurde zu gleichen Teilen mit 0,9% NaCl-Lösung gemischt und für 1, 5, 30, 60 und 90min mit albuminhaltigem Kontrollpuffer (12µl) oder LPA (20µM) bei 37°C vorinkubiert. Jede Probe befand sich in einem separaten Eppendorfgefäß und wurde entsprechend der Inkubationszeit alle 10min vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurden die Proben in MEA Küvetten überführt, für weitere 3min bei 37°C ohne Rühren und für 5min bei 37°C unter Rühren des Blutes ohne Stimulus (Kontrolle), mit Kollagen (0,3µg/ml) oder Plaquematerial (1,25mg Feuchtgewicht/ml) inkubiert. Die kumulative Plättchenaggregation (AU\*min) wurde mittels Impedanzaggregometrie im Multiplate®-Gerät während 5min gemessen. Die Werte sind die MW±SD aus n=4 Experimenten. \* p < 0,05

### **5.2.2 Die LPA Vorinkubation bewirkt eine Thrombozytenaktivierung**

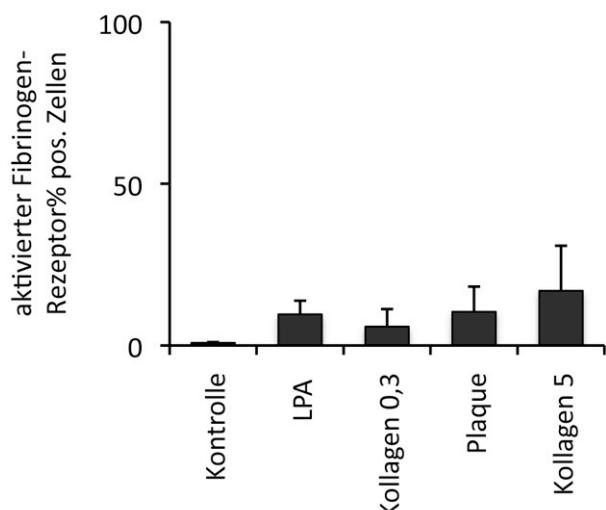
Die Spontanaggregation nach Vorinkubation von Blut mit LPA war nicht erhöht (Abb. 1a, 2a). Trotzdem wäre es möglich, dass LPA die Tz voraktivieren, was die anschließend erhöhte Aggregation auf andere Tz-Stimuli (Abb. 1c; Abb. 2b,c) erklären könnte. Die Voraktivierung der Tz durch LPA wurde gemessen anhand der Aktivierung des GPIIb/IIIa-Komplexes (Fibrinogenrezeptor) und der Sekretion der  $\alpha$ -Granula. Dafür wurde Blut mit Albumin (Kontrolle), LPA, bzw. Kollagen oder Plaque (als Positivkontrolle) bei 37°C für 13min inkubiert und die aktivierte GPIIb/IIIa-Rezeptoren sowie die P-Selectin-Expression auf den Tz mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Nach Inkubation mit LPA zeigten die Tz im Vergleich zur Kontrolle eine Erhöhung der P-Selectin Expression (Abb. 3a) und der aktiven Konformation des Fibrinogen-Rezeptors (Abb. 3b). Interessanterweise war die Stimulation nach Inkubation mit Kollagen und Plaque geringer als nach LPA. Wesentlich deutlicher fiel die Stimulation nach Inkubation mit einer hohen Konzentration Kollagen aus. Die Vorinkubation mit LPA führte offenbar zu einer Voraktivierung der Tz, welche möglicherweise Grund für die gesteigerte Aggregation bei Kontakt mit anderen Agonisten führt.

## a) P-Selectin Expression



## b) aktiverter Fibrinogen-Rezeptor

**Abb. 3: LPA induziert eine Aktivierung der Thrombozyten**

Jeweils 400 $\mu$ l Hirudin-antikoaguliertes Blut wurden mit Albumin (Kontrolle), LPA (20 $\mu$ M), Kollagen (0,3 $\mu$ g bzw. 5 $\mu$ g/ml) oder Plaque (1,25mg Feuchtgewicht/ml) bei 37°C für 13min lang vorinkubiert. Anschließend wurden die Proben mit anti-CD41a Antikörper und PAC-1 bzw. CD62 Antikörper inkubiert. Die Expression des aktivierten Fibrinogen-Rezeptors und von P-Selectin auf der Plättchenoberfläche wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Werte sind in Prozent der gemessenen Tz (=100 %) angegeben und stellen die MW $\pm$ SD aus n=4 Experimenten dar.

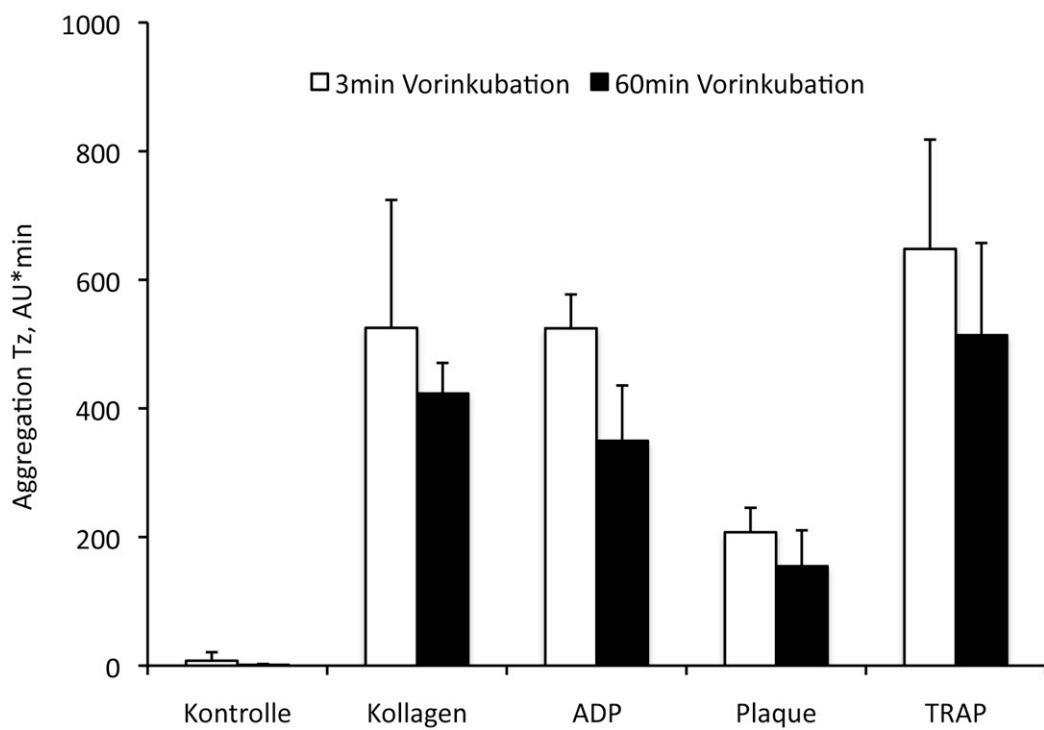
### **5.3 Einfluss von Lipoproteinen auf Thrombozyten im Blut**

Aufgrund des Vorhandenseins von Lipoproteinen im Blut besteht die Möglichkeit, dass diese die Tz-Aggregabilität beeinflussen (siehe Kapitel 2.2.1). Das Ziel der folgenden Versuche war es herausfinden, ob ein Langzeitkontakt erhöhter Konzentrationen der Lipoproteine natLDL, moxLDL und HDL mit Tz im Blut ein verändertes Ansprechen von Tz auf Tz-Stimuli bewirkt. Die Ergebnisse wurden mit der Wirkung nach einer plötzlichen Exposition von Tz mit LDL und moxLDL verglichen, wie sie nach Plaque-Ruptur auftreten kann. In vitro wurde diese Situation durch eine Kurzzeit-Inkubation von 3min simuliert.

#### **5.3.1 Einfluss der Inkubationszeit auf die Reaktionsfähigkeit der Thrombozyten im Blut (in Kontrollen)**

Möglicherweise verändert sich die Reaktivität von Tz während einer längeren Inkubationszeit. Um zu sehen, ob diese Veränderung einen signifikanten Einfluss auf den Unterschied der Tz Aggregation nach Kurz- oder Langzeitinkubation hat, wurde die Agonisten-induzierte Aggregation nach einer 3minütigen und einer 60minütigen Inkubation im MEA gemessen und verglichen (Abb. 4).

Für alle verwendeten Agonisten fiel die Aggregation der TZ nach 60min Inkubation etwas geringer aus. Sie war aber niemals signifikant gehemmt im Vergleich zur Aggregation nach 3minütiger Inkubation. Es konnte daher für die folgenden Versuche ausgeschlossen werden, dass die Reaktionsfähigkeit der Tz im Blut durch eine Langzeitinkubation von 60min signifikant beeinflusst wird.



**Abb. 4: Vergleich der Thrombozytenaggregation nach Kurz- und Langzeitinkubation des Blutes bei 37°C**

Hirudin-antikoaguliertes Blut (0.3ml) wurde zu gleichen Teilen mit 0.9% NaCl-Lösung gemischt und für 3min bzw. 60min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5min bei 37°C unter Rühren des Blutes ohne Stimulus (Kontrolle) oder mit Kollagen (0,3µg/ml), ADP (5µM), Plaquematerial (1,25mg Feuchtgewicht/ml) oder TRAP (5µM) inkubiert. Die kumulative Plättchenaggregation (AU\*min) wurde mittels Impedanzaggregometrie im Multiplate®-Gerät nach 5min gemessen. Die Werte sind MW±SD aus n=6 Experimenten.

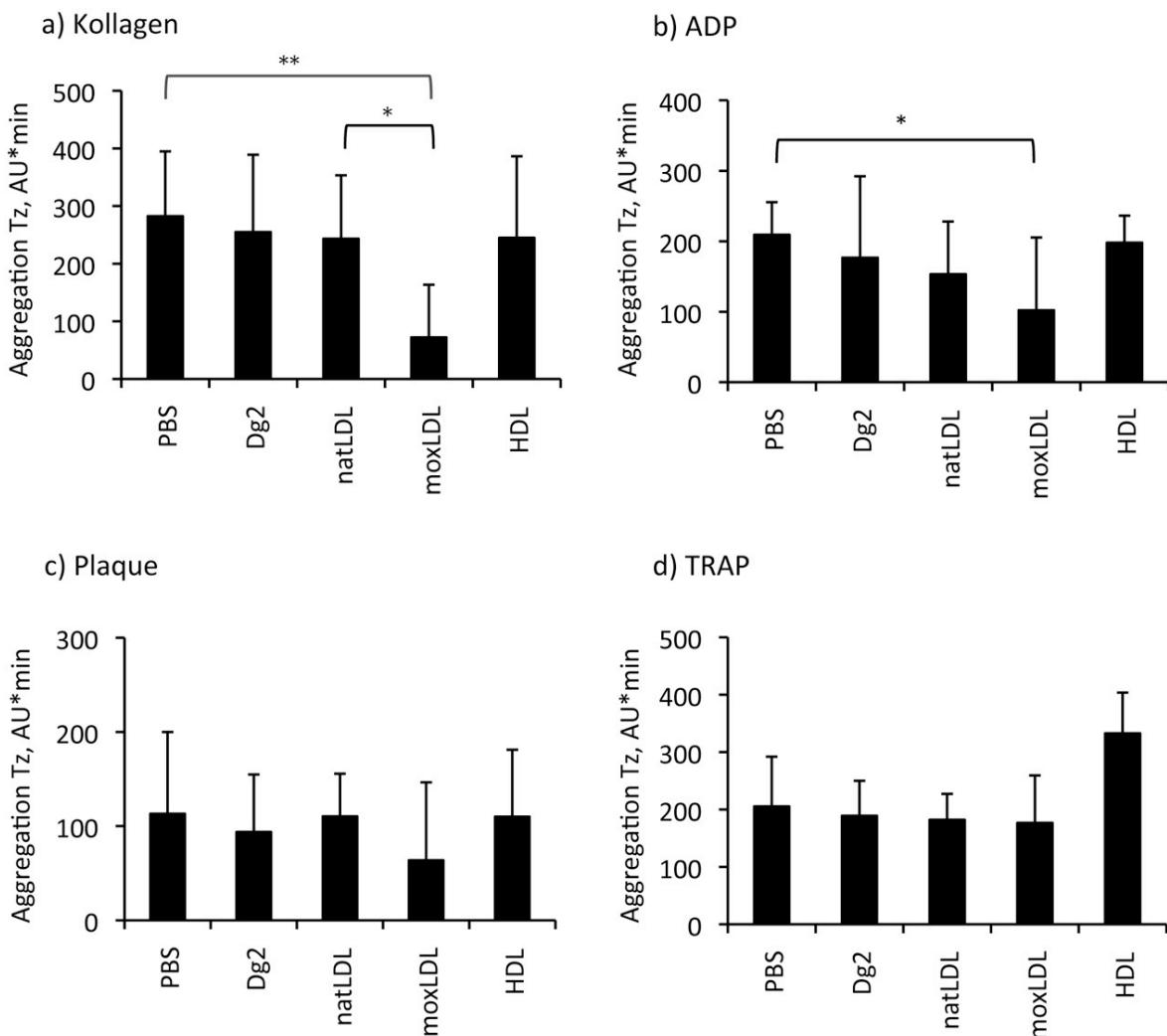
### 5.3.2 MoxLDL hemmt die Kollagen- und ADP-induzierte Thrombozytenaggregation im Blut nach Langzeitinkubation

Zunächst wurde die Langzeitwirkung der Lipoproteine LDL, moxLDL und HDL auf Tz getestet. Blut wurde für 60min mit natLDL, moxLDL, HDL oder Kontrollpuffer inkubiert. Als Kontrollpuffer wurde sowohl PBS, in welchem natLDL, moxLDL und HDL gelöst waren, als auch Dichtegradient 2 (DG2) verwendet. DG2 separiert während der Ultrazentrifugation LDL und HDL, die Einstellung seiner Dichte von 1,05g/ml erfolgt mit NaCl (siehe Kapitel 4.2.3.1). Anschließend wurden die Proben mit den Agonisten Kollagen, Plaque, ADP und TRAP stimuliert und die Aggregation im MEA gemessen (Abb. 5 a-d). Bei der Kontrollmessung ohne Stimulus lag die Aggregation, ausgedrückt in Aggregationseinheiten AU\*min, für die mit Kontrollpuffer, natLDL, moxLDL und HDL vorinkubierten Proben bei 0 (Ergebnisse nicht dargestellt).

Kollagen, als starker Tz-Stimulus, induzierte eine deutliche Aggregation (Abb. 5a). Dabei unterschied sich die Aggregation der mit natLDL und HDL vorinkubierten Tz nicht signifikant von der Aggregation der Tz, welche mit Kontrollpuffer inkubiert worden waren, während die Kollagen induzierte Aggregation von Tz, welche 60min mit moxLDL inkubiert worden waren, signifikant gehemmt war.

Das Ergebnis bei der ADP induzierten Tz Aggregation war vergleichbar, wenn auch die Aggregation insgesamt etwas niedriger war (Abb. 5b). Auch die durch ADP induzierte Tz Aggregation wurde durch Inkubation mit moxLDL im Vergleich zur Kontrolle signifikant gehemmt, während die Vorinkubation mit natLDL und HDL keinen Einfluss hatte.

Auch die durch Plaque (Abb. 5c) induzierte Aggregation zeigte eine Verminderung durch moxLDL (wenn auch nicht signifikant). Die durch TRAP (Abb. 5d) induzierte Aggregation zeigte interessanterweise eine Erhöhung nach HDL Vorinkubation, welche jedoch nicht signifikant war.



**Abb. 5: Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation nach Langzeitinkubation mit natLDL, moxLDL, oder HDL**

Zu Hirudin-antikoaguliertem Blut (0,3ml) wurde PBS, Dichtegradienten-Puffer 2 (DG2), natLDL (4mg/ml f.c.), moxLDL (4mg/ml f.c.) oder HDL (2mg/ml f.c.) gegeben und mit 0.9% NaCl-Lösung auf 0.6ml aufgefüllt (siehe Kapitel 4.2.5.1). Die Proben wurden für 60min bei 37°C vorinkubiert und währenddessen regelmäßig gemischt. Anschließend wurden die Proben in MEA Küvetten überführt und für 5min bei 37°C unter Rühren des Blutes mit Kollagen (0,3µg/ml), Plaquematerial (1,25mg Feuchtgewicht/ml), ADP (5µM) oder TRAP (5µM) im Multiplate®-Gerät inkubiert. Die kumulative Plättchenaggregation (AU\*min) wurde nach 5min gemessen. Die Werte sind MW±SD aus n Experimenten: n=11 für Kollagen, n=6 für ADP, n=6 für Plaque, n=7 für TRAP.

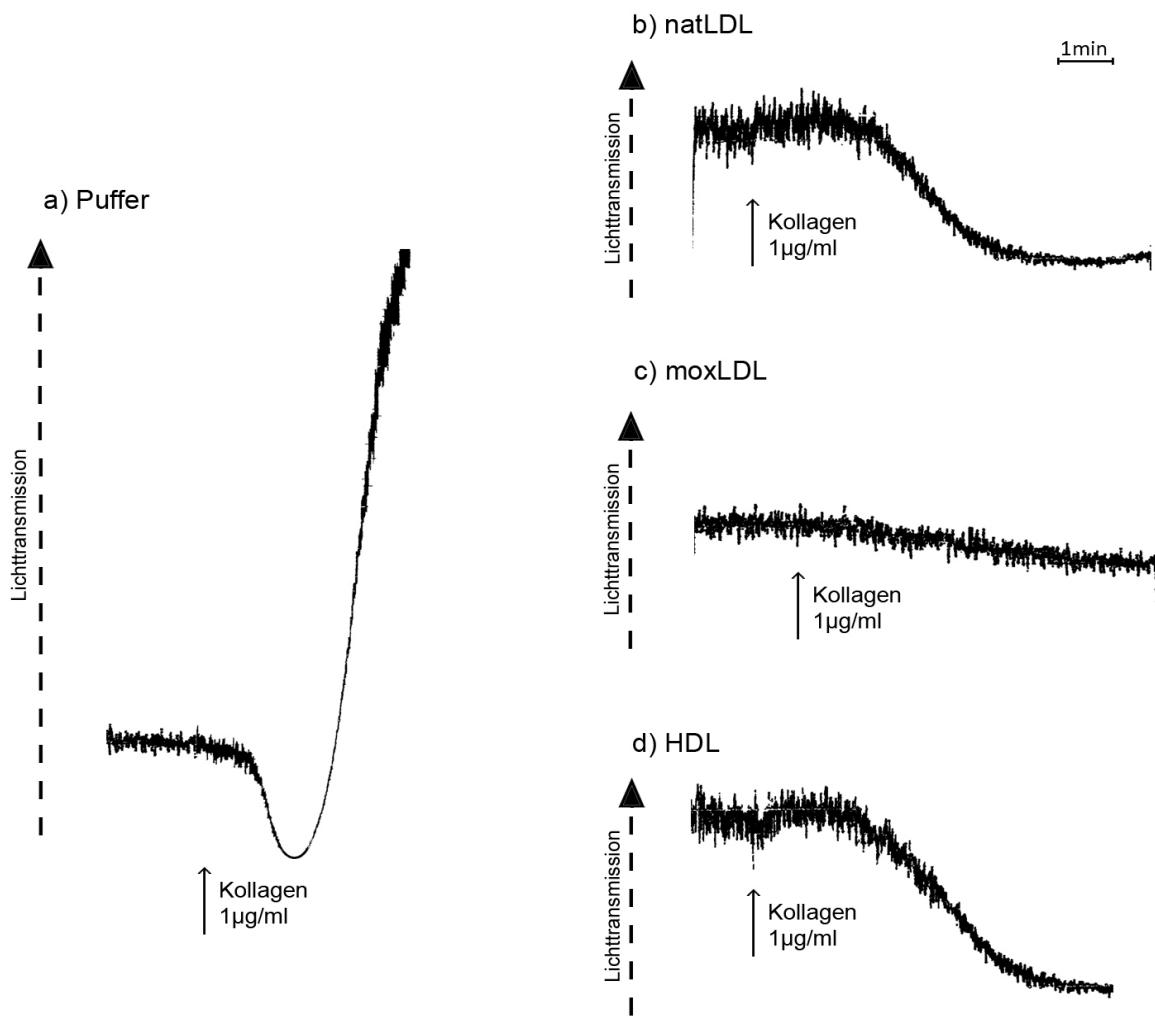
\*p < 0,05, \*\*p < 0,01

### **5.3.3 Wirkung von Langzeitinkubation mit natLDL, moxLDL und HDL auf Thrombozyten im PRP**

Nach der überraschend hemmenden Wirkung einer Langzeitinkubation von Blut mit moxLDL auf die Tz-Aggregation wurde untersucht, ob sich dieser Effekt auch im PRP beobachten lässt. PRP wurde zuvor, analog zu den Versuchen in Abb. 5, für 1h mit PBS (Kontrolle), natLDL, moxLDL oder HDL bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Kollagen oder ADP stimuliert und Gestaltwandel und Aggregation im Lumi-Aggregometer gemessen (Abb. 6 und 7).

#### **5.3.3.1 MoxLDL hemmt die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation und den Gestaltwandel im PRP nach Langzeitinkubation**

Die Vorinkubation von PRP mit natLDL oder HDL (Abb. 6b,d) für 1 Stunde und Stimulation mit Kollagen führte zu einem maximalen Gestaltwandel. Die in der Kontrolle (Vorinkubation mit PBS) beobachtete irreversible Aggregation (Abb. 6a) blieb jedoch aus. Eine Vorinkubation mit moxLDL dagegen führte zu einer kompletten Hemmung von TZ-Gestaltwandel und -Aggregation (Abb. 6c).

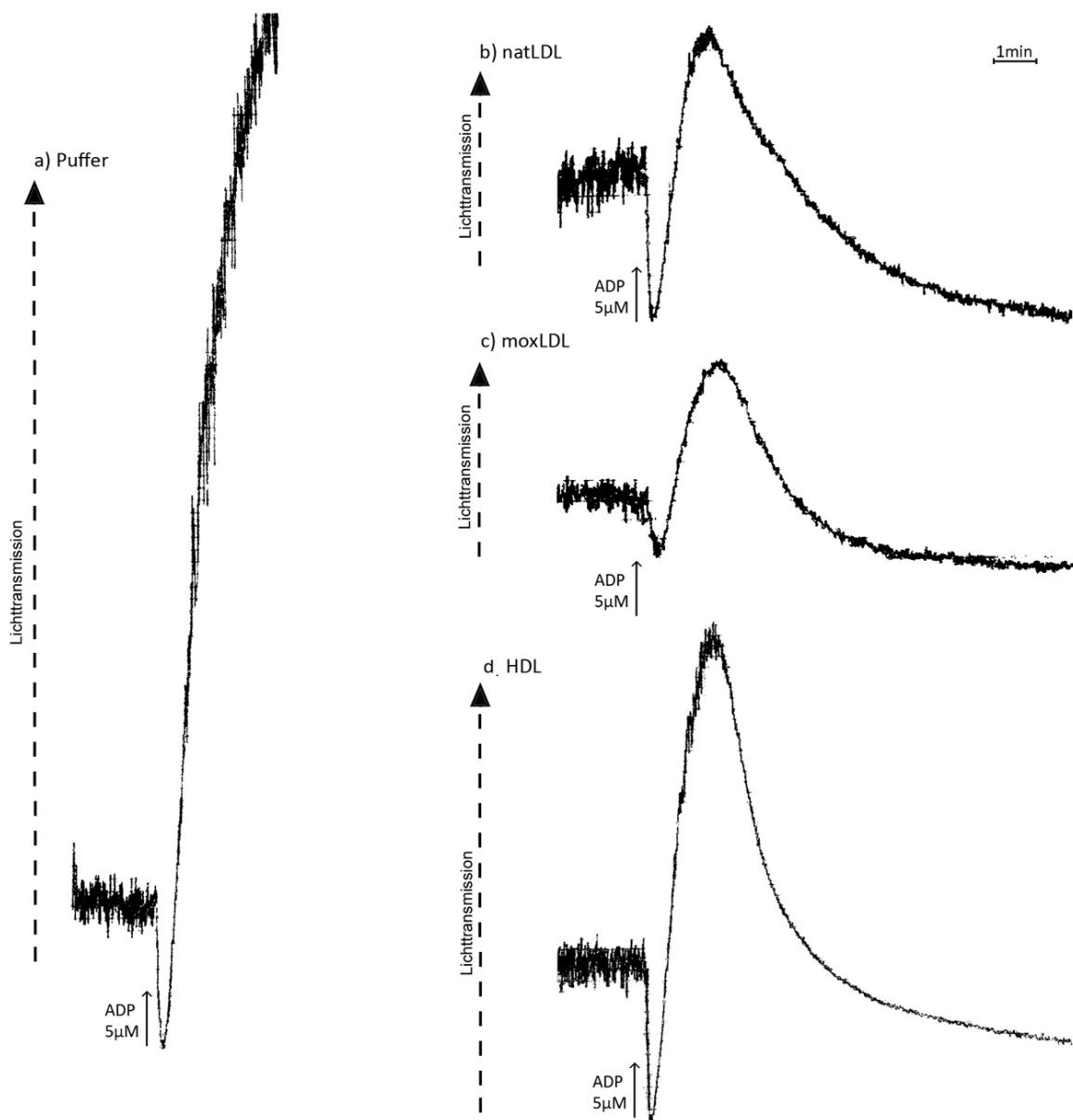


**Abb. 6: Wirkung von Langzeitinkubation mit natLDL, moxLDL und HDL auf die Kollagen stimulierte Tz-Aggregation im PRP**

Citrat PRP (0,4ml) wurde mit jeweils 20µl PBS (Kontrolle), natLDL (4mg/ml), moxLDL (4mg/ml) oder HDL (2mg/ml) für 1h bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurden die Proben in eine Aggregometerküvetten überführt, 1min lang bei 1000rpm und 37°C im Aggregometer gerührt und mit Kollagen (1µg/ml) stimuliert. Der thrombozytäre Gestaltwandel und die Aggregation wurden über die Änderung der Lichttransmission gemessen und aufgezeichnet. Das Experiment ist repräsentativ für 5 andere mit gleichen Ergebnissen.

### **5.3.3.2 MoxLDL hemmt die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation im PRP nach Langzeitinkubation**

Die ADP- induzierte irreversible Tz-Aggregation im PRP wurde durch die 1-stündige Vorinkubation bei 37°C mit natLDL, moxLDL und HDL in eine reversible Aggregation überführt. Die Hemmung von Gestaltwandel und Aggregation durch moxLDL war im Vergleich zu natLDL und HDL am deutlichsten (Abb. 7c), jedoch weniger ausgeprägt als in Versuch 5.3.3.1 nach Stimulation mit Kollagen (Abb.6c).



**Abb. 7: Wirkung von Langzeitinkubation mit natLDL, moxLDL und HDL auf die ADP stimulierte Thrombozytenaggregation im PRP**

Citrat PRP (0,4ml) wurde wie in Legende zu Abb. 6 beschrieben mit PBS, natLDL, moxLDL und HDL vorinkubiert und in eine Aggregometerküvette überführt. Anschließend wurde mit ADP (5 $\mu$ M) stimuliert. Der thrombozytäre Gestaltwandel und die Aggregation wurden über die Änderung der Lichttransmission gemessen und aufgezeichnet. Das Experiment ist repräsentativ für 4 andere mit gleichen Ergebnissen.

#### **5.3.4 MoxLDL hemmt die durch Kollagen induzierte Thrombozyten-Aggregation im Blut nach Kurz- und Langzeitinkubation**

Die Langzeitinkubation von Blut mit moxLDL für 60min bewirkte eine signifikante Hemmung der Kollagen induzierten Tz Aggregation (Abb. 5), natLDL und HDL hatten jedoch keinen Einfluss.

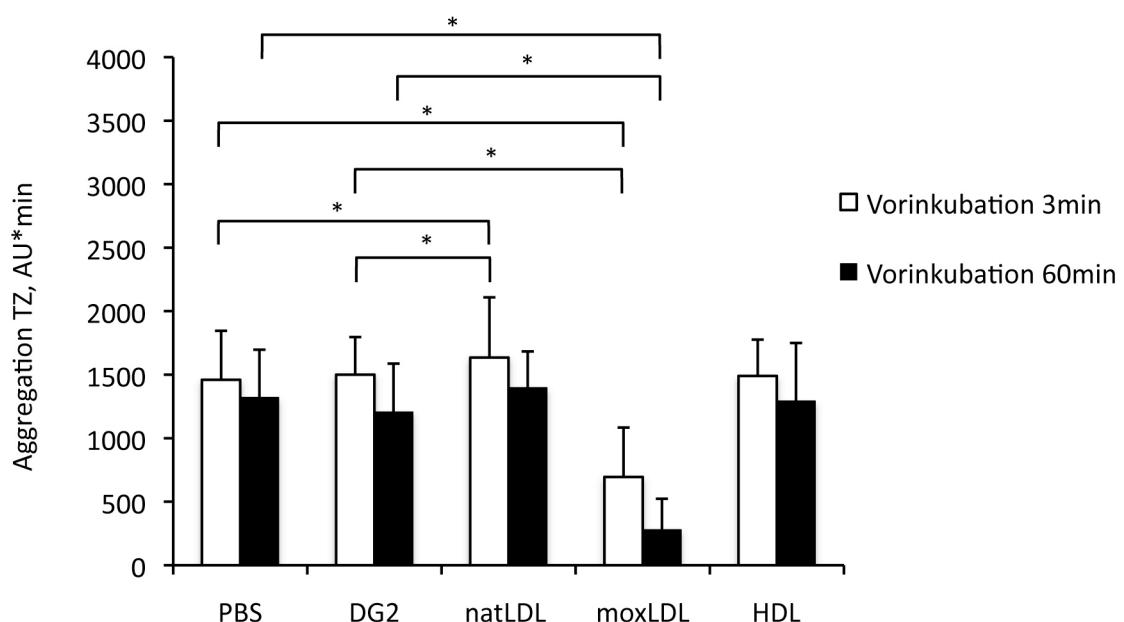
Um zu untersuchen, ob sich die Effekte der Lipoproteine auf die Tz nach einer kurzen Einwirkung eventuell unterscheiden, wurde Blut mit natLDL, moxLDL, HDL oder Puffer für 3min bzw. zum Vergleich für 60min inkubiert. Anschließend wurde die Kollagen- stimulierte Tz Aggregation im MEA gemessen (Abb. 8).

Interessanterweise zeigte die 3minütige Kurzzeit-Inkubation von Blut mit natLDL im Vergleich zur PBS- und DG2-Kontrolle, eine geringe (12% bzw. 11%), jedoch signifikante Steigerung der Kollagen-induzierten Tz Aggregation. Nach 60min Inkubation war kein Effekt zu beobachten. Offenbar nahm die sensibilisierende Wirkung von natLDL im Verlauf der Inkubationszeit ab.

Inkubation mit moxLDL bewirkte immer eine Hemmung: Die Kollagen induzierte Tz Aggregation war sowohl nach 3 als auch nach 60minütiger Inkubation von Blut mit moxLDL im Vergleich zur Kontrolle (Inkubation mit PBS und Inkubation mit DG2) signifikant gehemmt. Die Dauer der Inkubation war offenbar nicht ursächlich für die beobachtete Hemmung in Abb. 5.

Die Tz Aggregation nach Inkubation mit HDL unterschied sich weder nach 3 noch nach 60min Inkubation von der Kontrolle.

Insgesamt war die Aggregation nach 60min bei allen Proben im Vergleich zur 3minütigen Inkubation sichtbar geringer, und könnte mit einem zwar im Diagramm sichtbaren aber nicht signifikanten Rückgang der Reaktionsfähigkeit der Tz nach 60min zu begründen sein, der schon in Abb. 4 beobachtet worden war.

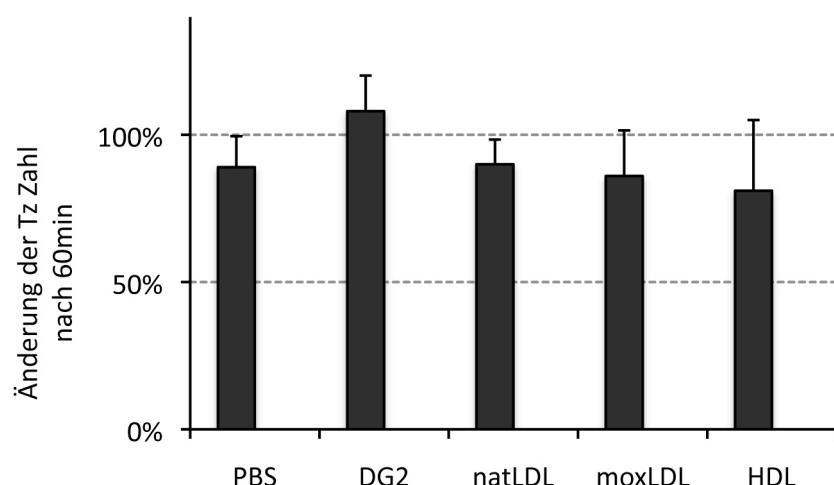


**Abb. 8: Vergleich der Thrombozytenaggregation stimuliert durch Kollagen nach Kurz- und Langzeitinkubation mit den Lipoproteinen natLDL, HDL und moxLDL**

Hirudin-antikoaguliertes Blut (0,3ml) wurde wie in der Legende zu Abb. 5 gemischt und für 3 bzw. 60min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Kollagen (0,3µg/ml) versetzt. Die kumulative Plättchenaggregation (AU\*min) wurde mittels Impedanzaggregometrie im Multiplate®-Gerät nach 10min gemessen. Die Werte sind MW±SD aus n=6 Experimenten. \* p < 0,05

### 5.3.5 Langzeitinkubation mit Lipoproteinen verändert die Anzahl der Thrombozyten im Blut nicht

Die starke Abnahme der Kollagen-stimulierten Tz-Aggregation nach 1-stündiger Inkubation des Blutes mit moxLDL könnte durch einen Abfall der Tz-Zahl, hervorgerufen durch Aggregation oder Schädigung, bedingt sein. Um dies zu untersuchen, wurde die Tz-Konzentration nach Kurz- und Langzeit-Inkubation des Blutes mit den Lipoproteinen bestimmt. Die Zahl der Tz verringerte sich während der einstündigen Inkubation gering und war sowohl nach PBS, als auch nach natLDL, moxLDL und HDL Inkubation zu beobachten (Abb. 9). Die beobachtete Hemmung der Tz-Aggregation durch moxLDL ist daher nicht mit einem Abfall der Tz-Konzentration zu erklären.

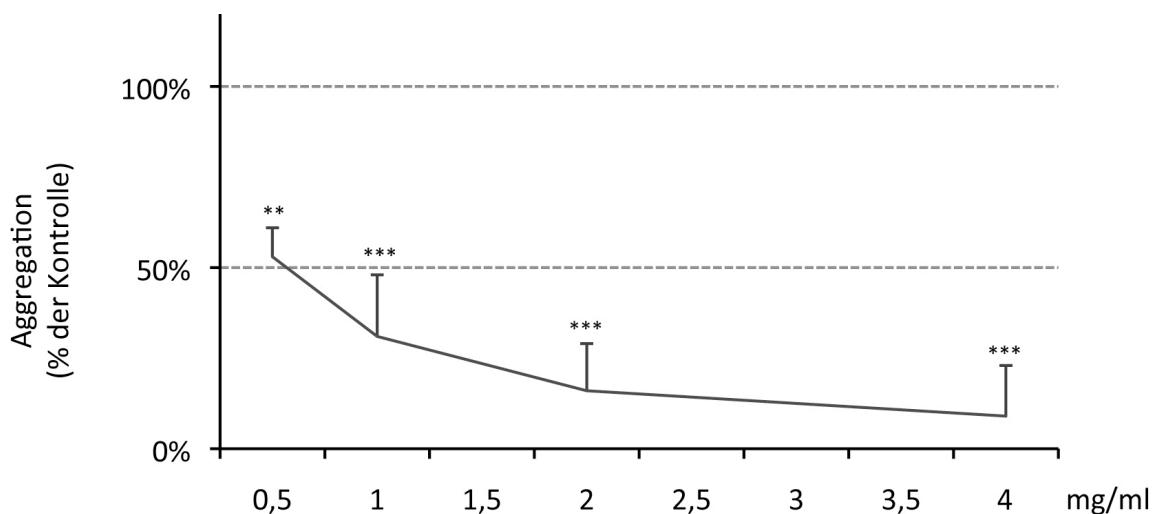


**Abb. 9: Darstellung der veränderten Thrombozytenanzahl nach 60min Inkubation**

Von den Proben aus Versuch 3.4 (Abb.8) wurden im Anschluss an die Inkubation und vor Stimulation durch Kollagen jeweils 10µl entnommen, in 2ml THROMBO-PLUS®-Puffer überführt und die Blutplättchenzahl in einer Neubauer-Zählkammer mit Hilfe des Lichtmikroskops Leitz D-65323 bestimmt (siehe Kapitel 4.2.2.3). Das Diagramm zeigt die Tz-Zahlen nach 60min in Prozent im Verhältnis zu den Zahlen nach 3min, welche als 100% gesetzt wurden. Die Werte sind die MW±SD aus n=4 Experimenten.

### 5.3.6 Die Hemmung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation durch moxLDL ist dosisabhängig

Für die bisherigen Versuche wurden große Konzentrationen an Lipoproteinen eingesetzt. Im folgenden wurde untersucht, ob sich der Einfluss von moxLDL bereits bei geringen Konzentrationen zeigt (Abb. 10). Der Versuchsaufbau war der gleiche wie in Versuch 5.3.2 (Abb. 5), nur fand die einstündige Inkubation mit steigenden Mengen an moxLDL und Kontrollpuffer statt. Es zeigte sich deutlich, dass der Einfluss der Vorinkubation mit moxLDL auf die Kollagen-induzierte Tz Aggregation dosisabhängig war: mit zunehmender Dosis an moxLDL stieg auch der hemmende Effekt auf die Tz Aggregation.



**Abb. 10: Dosisabhängigkeit des Effekts von moxLDL nach Langzeitinkubation auf die Kollagen induzierte Thrombozytenaggregation**

Hirudin-antikoaguliertes Blut (0,3ml) wurde mit PBS (Kontrolle) oder moxLDL in aufsteigender Konzentration (0,5, 1, 2, 4mg/ml) und 0,9% NaCl-Lösung (genaue Zusammensetzung analog zu Versuch Abb. 5) gemischt. Die Proben wurden für 60min bei 37°C inkubiert und anschließend mit Kollagen (0,3µg/ml) versetzt. Die kumulative Plättchenaggregation (AU\*min) wurde mittels Impedanzaggregometrie im Multiplate®-Gerät nach 5min gemessen. Die Werte sind MW±SD (% der PBS Kontrolle) aus n=5 Experimenten. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001

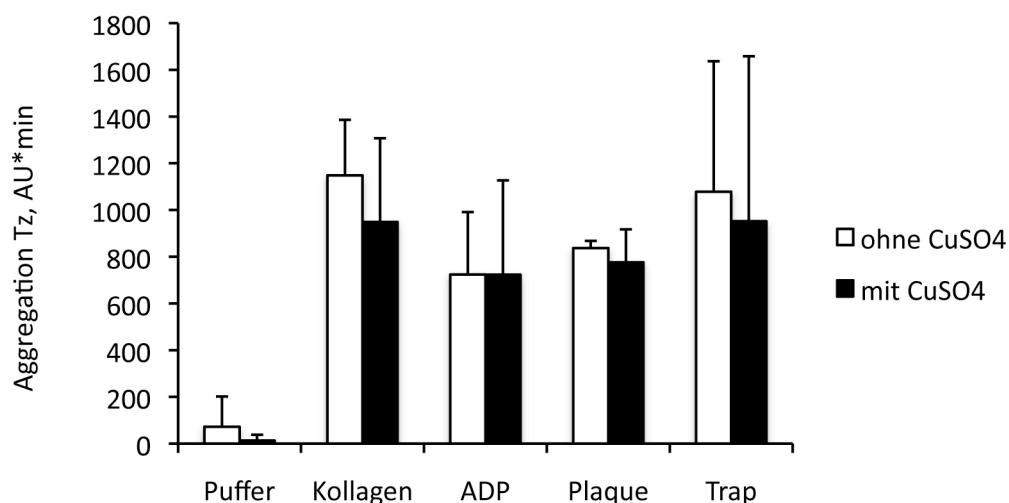
### **5.3.7 Langzeitinkubation mit CuSO<sub>4</sub> beeinflusst nicht die Thrombozytenaggregation im Blut**

Für die Herstellung von moxLDL wurde natLDL mit Kupfersulfat versetzt (siehe Kapitel 4.2.3.3). Mit der folgenden Versuchsreihe sollte geklärt werden, ob das noch im moxLDL enthaltene Kupfersulfat Ursache für die beobachtete Hemmung der TZ Aggregation sein könnte.

Dafür wurde Blut mit der gleichen Konzentration an Kupfersulfat, welche nach einer moxLDL Zugabe von 4mg/ml zu Blut enthalten war, vorinkubiert.

Nach 60min Inkubation mit PBS allein wurde für alle verwendeten Agonisten, im Vergleich zur Kontrolle, eine deutliche Tz Aggregation gemessen. Diese wurde durch Inkubation mit CuSO<sub>4</sub> nicht signifikant verändert (Abb. 11).

In den Proben noch vorhandenes Kupfersulfat ist also nicht Grund für die Hemmung der Kollagen induzierten Tz Aggregation nach Inkubation mit moxLDL.



**Abb. 11: Wirkung von Kupfersulfat auf die Thrombozytenaggregation bei Langzeitinkubation**

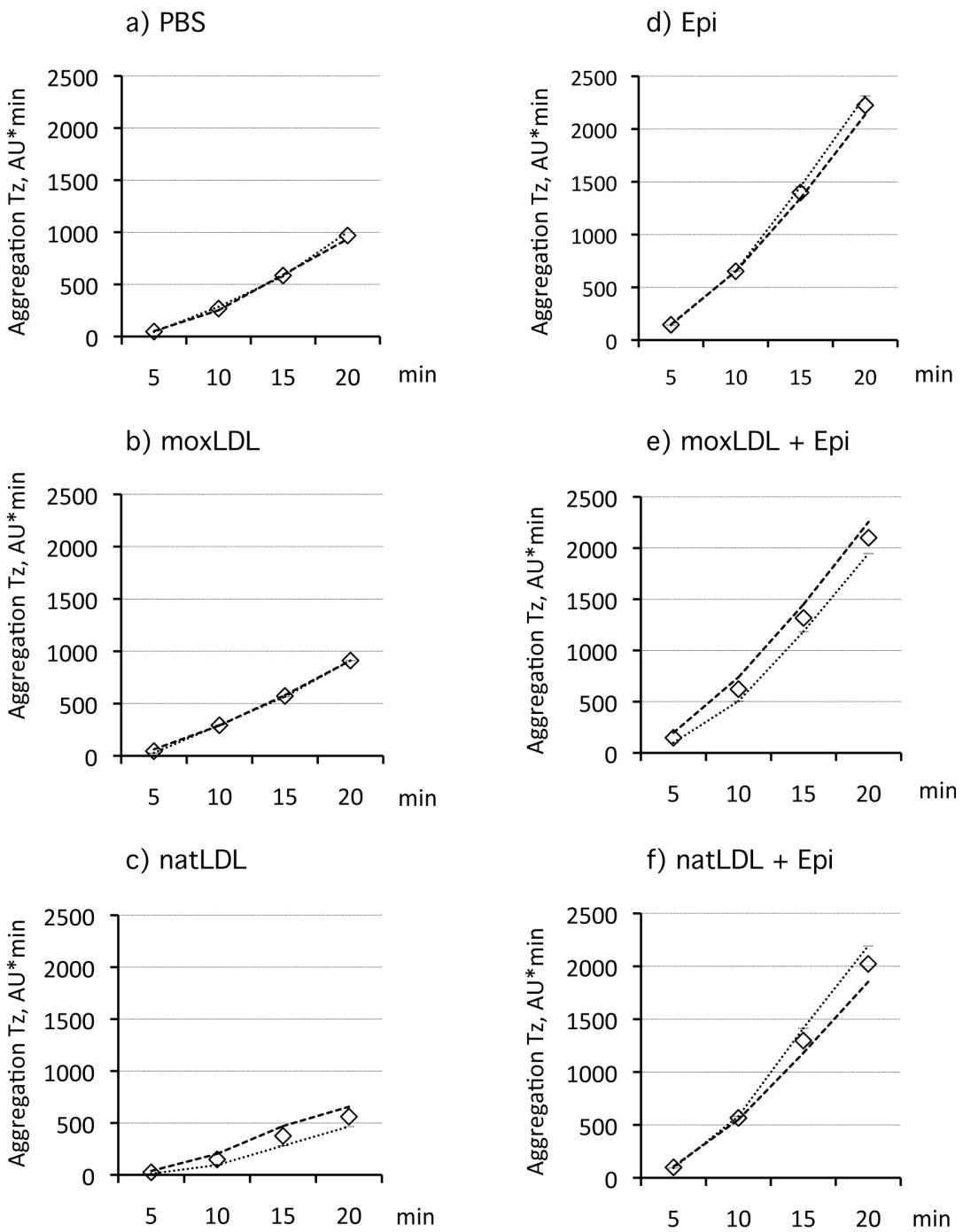
Hirudin-antikoaguliertes Blut (0,3ml) wurde zu gleichen Teilen mit PBS-Puffer (Kontrolle) oder  $\text{CuSO}_4$  (128 $\mu\text{M}$  f.c. in PBS) gemischt. Die Proben wurden für 60min bei 37°C inkubiert und anschließend wie in Abb. 5 mit Kollagen (0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Plaquematerial (1,25mg Feuchtgewicht/ml), ADP (5 $\mu\text{M}$ ) oder TRAP (5 $\mu\text{M}$ ) versetzt. Die kumulative Plättchenaggregation ( $\text{AU} \cdot \text{min}$ ) wurde mittels Impedanzaggregometrie im Multiplate®-Gerät nach 10min gemessen. Die Werte sind MW $\pm$ SD aus n=5 Experimenten.

### **5.3.8 Keine Voraktivierung von Thrombozyten durch moxLDL während der Inkubationszeit**

Die Inkubation mit LPA führte zu einer Sensibilisierung der Kollagen, Plaque und ADP induzierten Tz Aggregation (Abb. 2), im Durchflusszytometer konnte eine Voraktivierung durch LPA festgestellt werden (Abb. 3). Da LPA eine Tz-aktivierende Substanz in moxLDL ist, wäre es denkbar, dass es auch am Anfang einer Inkubation mit moxLDL zu einer Aktivierung der Tz kommt. Diese anfängliche Aktivierung könnte dann eine eingeschränkte Reaktionsfähigkeit der Tz nach 1h zur Folge haben, und der Grund für die beobachtete Hemmung der Kollagen- induzierten Tz Aggregation sein.

Um dies zu untersuchen, wurde Blut mit moxLDL und natLDL versetzt und die Aggregation kontinuierlich während 20min im MEA aufgezeichnet. Die Stimulation mit moxLDL unterschied sich nicht von der Kontrolle (Stimulation mit Puffer) (Abb. 12a-b). Die Aggregation nach Inkubation mit natLDL war interessanterweise wesentlich geringer (Abb. 12c).

Die durch Adrenalin stimulierte Aggregation war etwa doppelt so hoch (Abb. 12d) wie die Kontrolle mit PBS-Puffer (Abb. 12a). Durch zusätzliche Gabe von natLDL oder moxLDL konnte diese Aggregation nicht gesteigert werden (Abb. 12e,f). Eine Sensibilisierung der Tz im Blut durch natLDL oder moxLDL war während der 20minütigen Messung demnach nicht erkennbar.



**Abb. 12: Aufzeichnung der Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregation im Blut während 20min**

Hirudin-antikoaguliertes Blut (jeweils 0,3ml) wurde zunächst für 3min in MEA Küvetten vorinkubiert. Dann wurden die Proben für die Versuche, die in Diagramm 12a) bis 12c) dargestellt sind, mit jeweils 0,3ml PBS-Puffer, natLDL (4mg/ml f.c.) oder moxLDL (4mg/ml f.c.) in 0,9% NaCl-Lösung gemischt (genaue Zusammensetzung analog zu Versuch Abb. 5) und unter Rühren die Aggregation bis zu 20min gemessen. Für die Versuche in Abb. 12d) bis 12f) wurde den Proben zusätzlich noch Epi (10 $\mu$ M) hinzugefügt. Die kumulative Plättchenaggregation (AU\*min) wurde mittels Impedanzaggregometrie im Multiplate®-Gerät gemessen und die Werte nach 5, 10, 15 und 20min notiert. Dargestellt sind die Werte aus n=2 Experimenten, die Raute zeigt den Mittelwert

..... Messung 1 ----- Messung 2 ◇ MW aus 1&2

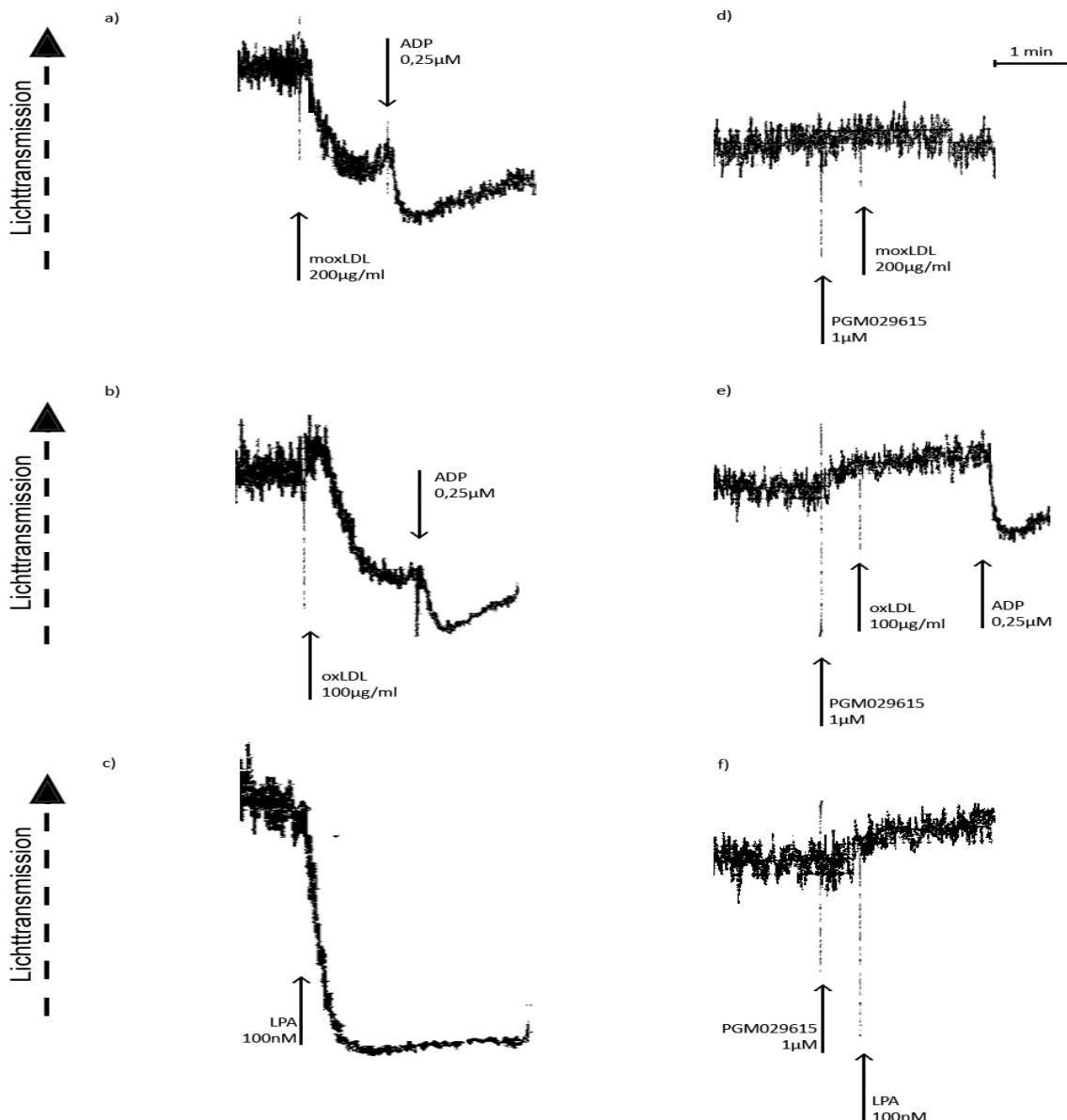
## **5.4 LPA - wirksamer Bestandteil in moxLDL?**

LPA bewirkte eine Sensibilisierung der Tz im Blut, unabhängig von der Inkubationszeit zwischen 1min und 90min (Abb. 1 und Abb. 2). MoxLDL zeigte diesen Effekt nicht. Im Gegenteil, auf die Kollagen und ADP induzierte Tz Aggregation im Blut übte Inkubation mit moxLDL eine hemmende Wirkung aus. Diese Beobachtung überraschte, da LPA in früheren Studien als aktive Substanz in moxLDL identifiziert wurde.

In den folgenden Versuchen wurden LPA Rezeptor Antagonisten verwendet, um das Vorhandensein und die Wirksamkeit von LPA in moxLDL zu untersuchen.

### **5.4.1 Ein pharmakologischer LPA5- Rezeptorantagonist hemmt komplett den durch LPA und moxLDL induzierten Gestaltwandel in Suspensionen isolierter Thrombozyten**

Isolierte Tz wurden mit moxLDL und LPA versetzt, der thrombozytäre Gestaltwandel im Aggregometer gemessen und aufgezeichnet (Abb. 13a-c). Durch vorherige Gabe eines LPA5-Rezeptor-Antagonisten konnte dieser GW für die verwendeten Substanzen komplett gehemmt werden (Abb. 13d-e). LPA ist also offensichtlich nicht nur Bestandteil von moxLDL, sondern ist in Suspensionen gewaschener Tz die für die Aggregation verantwortliche Substanz.



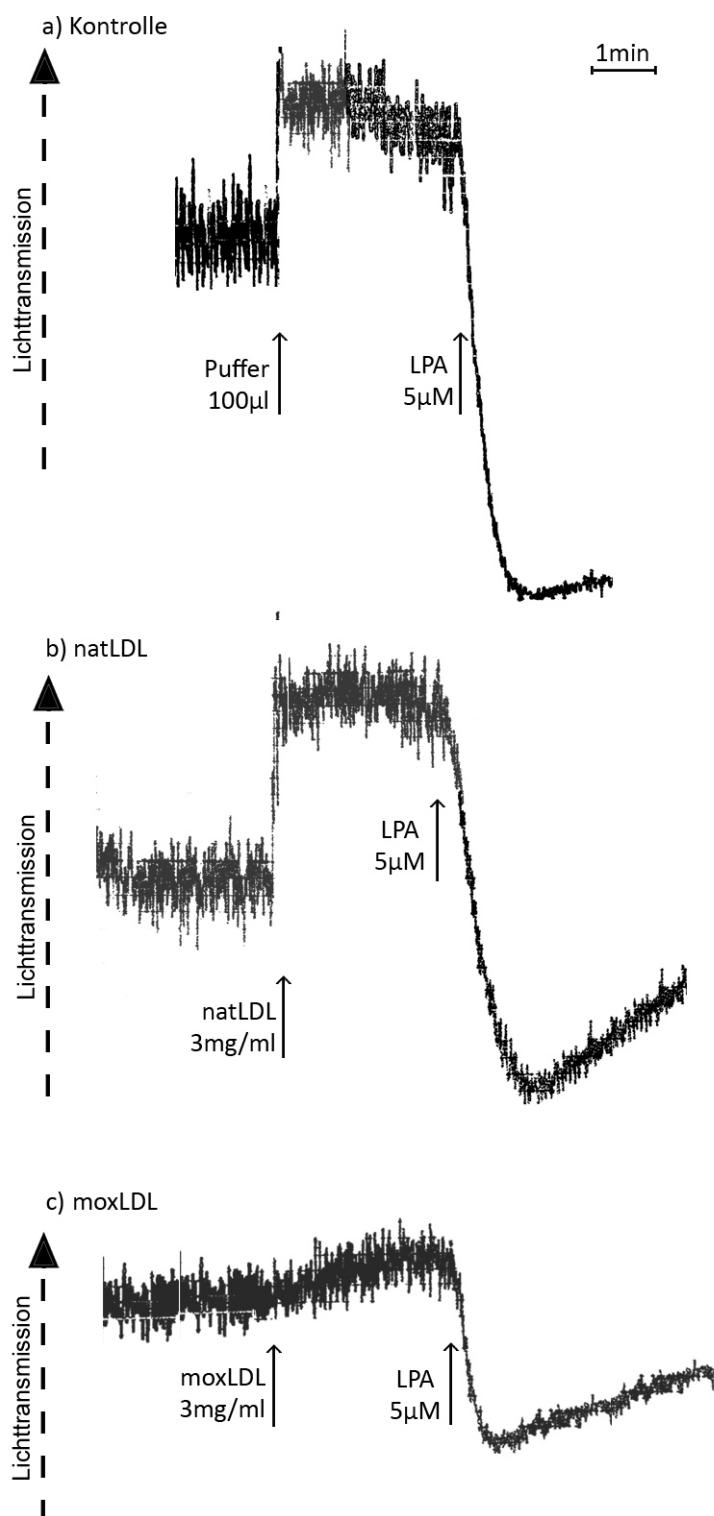
**Abb. 13: Wirkung des LPA5 Rezeptor Antagonisten PGM029615 auf den durch moxLDL, oxLDL und LPA induzierten Gestaltwandel isolierter Thrombozyten**

Abb. 13a), b), c): Eine Suspension gewaschener Tz wurde 1min lang bei 1000rpm und 37°C im Aggregometer zur Erstellung der Baseline gerührt, bevor moxLDL (200µg/ml), oxLDL (100µg/ml) und LPA (100nM) hinzugegeben wurden). Zur Erzielung eines maximalen Gestaltwandel (GW) wurde als 2. Agonist ADP (0,25µM) verwendet. Das Experiment ist repräsentativ für 2 andere mit gleichen Ergebnissen

Abb. 13d), e), f): Wie unter a)-c) beschrieben wurden isolierte Tz im Aggregometer inkubiert. Nach 1min wurde der LPA5 Rezeptor Antagonisten PGM029615 hinzugegeben und die Suspension für weitere 30sec gerührt. Anschließend wurden analog zu a)-c) moxLDL, oxLDL und LPA hinzugegeben. Zur Erzielung eines maximalen GW wurde als 2. Agonist ADP (0,25µM) verwendet. Der thrombozytäre Gestaltwandel und die Aggregation wurden während der gesamten Dauer des Versuchs über die Änderung der Lichttransmission gemessen und aufgezeichnet.

#### **5.4.2 MoxLDL hemmt die Wirkung von LPA auf Thrombozyten im PRP**

PRP wurde mit Albumin-Puffer (Kontrolle), natLDL und moxLDL für 1min im Aggregometer unter Röhren inkubiert und anschließend mit LPA versetzt. Durch die Gabe von LPA wurde ein thrombozytärer GW beobachtet (Abb. 14a). Während Inkubation mit natLDL keine Wirkung auf den LPA induzierten GW zeigte (Abb. 14b), reduzierte die Inkubation mit moxLDL den durch LPA induzierten thrombozytären GW (Abb. 14c). Auch dieses Ergebnis deutet auf das Vorhandensein und die Wirksamkeit von LPA in moxLDL hin. Bei der beobachteten Hemmung könnte es sich demnach um eine homologe Desensibilisierung des in moxLDL enthaltenen LPA handeln, wie sie bereits in Versuch im Kapitel 1.1 (Abb. 1b) gezeigt wurde.



**Abb. 14: Einfluss von moxLDL und natLDL auf den durch LPA induzierten Gestaltwandel von Thrombozyten im PRP**

14 a) bis c): Citrat PRP (0,3µl) wurde für 1 bis 1,5min bei 1000rpm und 37°C im Aggregometer zur Erstellung der Baseline gerührt, bevor jeweils 100µl Albumin-Puffer, natLDL (3mg/ml f.c.) oder moxLDL (3mg/ml f.c.) hinzugegeben wurden. Die Suspension wurde für weitere 2min gerührt und anschließend mit 5µM LPA versetzt.

Der thrombozytäre Gestaltwandel und die Aggregation wurden während der gesamten Dauer des Versuchs über die Änderung der Lichttransmission gemessen und aufgezeichnet.

Das Experiment ist repräsentativ für 2 andere mit gleichen Ergebnisse.

## 6 Diskussion

### 6.1 Methode

Die meisten Studien, die sich mit der Wirkung von Lipoproteinen befassten, verwendeten isolierte TZ. Gegenüber Blut oder plättchenreichem Plasma (PRP) wurden dabei Effekte von Plasmabestandteilen, welche die Interaktion von Lipoproteinen mit Tz unter Umständen im Sinne einer Tz-Aktivierung oder -Hemmung beeinflussen, ausgeschlossen. Bei der Wirkung im Organismus spielen jedoch alle Blutbestandteile eine Rolle. Aus diesem Grunde und um ein physiologisches Millieu zu schaffen, wurden die meisten der Versuche für diese Arbeit *in vitro* mit Blut durchgeführt.

Die verwendete hohe Konzentration von 4mg/ml LDL-Protein stellt eine Menge dar, welche bei Patienten mit unbehandelter familiärer Cholesterinämie gefunden wird (Lind S 2004, Raal FJ 2012, Al-Hinai AT 2013). Einem hohen HDL-Cholesterin-Wert >60mg/dl (NCEP 2002) wird eine gefäßprotektive Wirkung zugeschrieben. Daher wurde für die Versuche in dieser Arbeit eine leicht erhöhte Konzentration von 2mg/ml HDL Protein eingesetzt, was einem HDL-Cholesterin von ca. 80mg/dl entspricht.

Natives LDL und HDL sind physiologische Blutbestandteile und haben daher ständig Kontakt mit Tz. Nach Plaque-Ruptur kommt es zu einer plötzlichen Exposition von Tz auch gegenüber oxidativ-modifiziertem LDL (Siess W 2006). Darüber hinaus lassen verschiedene Studien vermuten, dass sich oxidativ modifiziertes LDL auch über einen längeren Zeitraum in der Blutzirkulation befinden kann (Yla-Herttula S 1994, Holvoet P 1998, Tanaga K 2002, Virella G 2004, Crisby M 2009, Lopes-Virella MF 2012) und daher auch über längere Zeit auf Tz einwirken könnte. Um diese Situation *in vitro* zu simulieren, wurde eine lange Inkubationszeit von 1h bei 37°C gewählt. Kürzere Inkubationszeiten von wenigen Minuten bei 37°C dienten als In-vitro-Modell einer plötzlichen Exposition von LDL oder oxidativ-modifiziertem LDL gegenüber Tz in zirkulierendem Blut, wie sie nach Plaque-Ruptur auftreten kann.

## 6.2 Wirkung von nativem LDL auf Thrombozyten im Blut

Eine Kurzzeitinkubation (3min) von Blut mit natLDL (4mg/ml) bewirkte in der vorliegenden Arbeit eine Sensibilisierung von Tz auf die Kollagen-induzierte Aggregation. Die Steigerung war gering, jedoch signifikant (Abb. 8). In früheren Studien mit Suspensionen isolierter Tz wurde gefunden, dass die Bindung von natLDL an den thrombozytären LDL-Rezeptor ApoER2' einen Signalweg stimuliert, welcher über Phosphorylierung der FAK und Aktivierung von MAP-Kinasen zu einer erhöhten Tz Reaktionsbereitschaft auf ADP, Thrombin und Kollagen führt (Korporaal SJ 2004, Relou IAM 2003, Hackeng CM 1999).

Im Gegensatz dazu wird in den meisten Studien nach kurzer Vorinkubation von PRP mit natLDL kein Effekt auf die ADP oder Kollagen induzierte Tz Aggregation beobachtet (Bröijersen A 1993, Naseem KM 1997, Tornvall P 1999). In einer dieser Studien wird nach 30minütiger Vorinkubation sogar eine Hemmung der ADP und Thrombin induzierten Aggregation beobachtet (Naseem KM 1997).

Eine Steigerung der Aggregabilität der Tz fanden auch Studien, die die Wirkung von natLDL auf Tz im Blut testeten (Bröijersen A 1993, Tornvall P 1999). Bei Bröijersen et al. wurde die ADP (0,1-0,3 $\mu$ M) induzierte Tz Aggregabilität, gemessen per Filtragometrie, durch 20minütige Vorinkubation mit 0,5mg/ml bis 1mg/ml natLDL dosisabhängig gesteigert. Ganz ähnlich waren die Beobachtungen von Tornvall et al. Hier bewirkte 10minütige Vorinkubation mit 1,25mg/ml natLDL eine signifikante Steigerung der ADP induzierten Tz Aggregation, gemessen im Impedanz-Aggregometer.

Anders fiel das Ergebnis nach längerer Vorinkubation aus. Nach 1stündiger Inkubation mit 4mg/ml natLDL wurde in der vorliegenden Arbeit keine Wirkung auf die Kollagen-, ADP-, Plaque- oder TRAP-induzierte Tz-Aggregation im Blut beobachtet (Abb. 5, Abb. 8).

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung liefern die Ergebnisse der Studie von Korporaal et al. Der oben beschriebene Effekt, bei dem es über den spezifischen LDL-Rezeptor ApoER2' zu einer erhöhten Reaktionsbereitschaft der Tz nach Inkubation mit natLDL kommt (Korporaal SJ 2004), war nur vorübergehend und nach 10-20min wieder verschwunden. Grund dafür war die Bindung von

natLDL an einen weiteren Rezeptor, PE CAM-1, welcher Start einer Signalkaskade ist, an deren Ende die ursprüngliche Aktivierung durch Dephosphylierung der p38MAP-Kinase wieder rückgängig gemacht wird (Relou IAM 2003-1, siehe Kapitel 2.3.1). Dies wurde als Schutzmechanismus vor Plättchenaktivierung durch zirkulierendes LDL betrachtet und könnte auch der Grund sein, dass in den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit nach 3minütiger Inkubation mit natLDL eine gesteigerte Kollagen induzierten Tz Aggregation im Blut zu sehen war, nach 1 Stunde aber kein Effekt mehr beobachtet werden konnte (Abb. 8).

### **6.3 Wirkung von Lysophosphatidsäure auf Thrombozyten im Blut**

Nach Vorinkubation des Blutes mit Albumin-Puffer und anschließender Stimulation mit LPA unter Rühren wurde eine Tz-Aggregation beobachtet (Abb. 1a links), was frühere Ergebnisse mit einer anderen Messung der Tz-Aggregation im Blut bestätigt (Haserück N 2007). Bei gleichzeitiger Gabe von LPA und Epi kam es zu einer synergistischen Tz-Aggregation (Abb. 1b). In einer früheren Studie war bereits die synergistische Wirkung von LPA und ADP bei gleichzeitiger Gabe auf die Tz Aggregation im Blut beobachtet worden (Haserück N 2007).

Eine Vorinkubation des Blutes mit LPA bewirkte offensichtlich eine Voraktivierung der Tz, die zu einer erhöhten Reaktionsbereitschaft nach Stimulation durch weitere Tz-Agonisten führt: LPA hatte eine sensibilisierende Wirkung auf die anschließende Tz-Aggregation induziert durch Plaque, Kollagen und ADP (Abb. 1c), und zwar für unterschiedliche lange Inkubationszeiten zwischen 1min und 90min (Abb. 2b-c).

Die Aktivierung der Tz nach Inkubation mit LPA konnte mittels Durchflusszytometrie anhand der aktiven Konformation des GPIIb/IIIa-Komplexes (Fibrinogenrezeptor) sowie der gesteigerten P-Selectin Expression, als Folge der Sekretion der  $\alpha$ -Granula, gezeigt werden. Diese Aktivierung könnte also Ursache für eine gesteigerte TZ Aggregation nach Stimulation durch weitere Agonisten wie Kollagen und ADP sein.

Die Plaque induzierte Tz- Aggregation wurde ebenfalls durch Vorinkubation mit LPA sensibilisiert, die Dauer der Inkubation hatte keinen Effekt. Diese Beobachtung überraschte zunächst, da LPA auch eine Tz-aktivierende Substanz in Plaques ist (Siess W 1999, Rother E 2003) und die LPA Rezeptoren der Tz durch Vorinkubation des Blutes mit LPA desensibilisiert wurden (Abb.1a rechts). Entsprechend war hier eine Hemmung erwartet worden. Eine mögliche Erklärung für die überraschende Beobachtung könnten andere, in Plaque enthaltene und Tz stimulierende Komponenten wie Kollagen, Proteoglykane, Hyaluronsäure und vWF liefern (van Zanten GH 1994, Lafont A 2003; Kolodgie FD 2004, Penz S 2005). Der voraktivierende Effekt von LPA auf Tz könnte die Wirkung dieser Tz-stimulierenden Komponenten sensibilisiert haben.

Überraschenderweise zeigte eine Vorinkubation des Blutes mit LPA weder für eine kurze noch für eine lange Inkubationsdauer eine von der Kontrolle signifikant erhöhte Spontanaggregation (Abb. 1a, 2a).

#### **6.4 Wirkung von milde oxidiertem LDL auf Thrombozyten im Blut**

MoxLDL hatte einen hemmenden Effekt auf die Tz-Funktion im Blut. Damit stehen die Ergebnisse dieser Arbeit im Gegensatz zu den meisten anderen Studien, die eine aktivierende Wirkung von moxLDL aber auch oxLDL auf isolierte Tz, Tz im PRP und im Blut beobachteten (siehe Kapitel 2.3.2 und 2.3.3: Weidtmann A 1995, Naseem KM 1997, Baumann-Simmons J 2000, Zangl KJ 2003, Podrez EA 2007, Korporaal SJ 2007, Assinger A 2010, Badrnya S 2012, Wraith KS 2013, Magwenzi S 2015).

Die Wirkung von moxLDL auf isolierte Tz lässt sich offenbar auf LPA zurückführen, welche in moxLDL als aktive Substanz identifiziert wurde (Siess W 1999, Essler M 2000). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass LPA Bestandteil in moxLDL ist und in einer Suspension isolierter Tz die wirksame Komponente darstellt: Der durch moxLDL induzierte Gestaltwandel gewaschener Tz konnte durch Vorinkubation mit einem pharmakologischen LPA5 Antagonisten komplett gehemmt werden (Abb. 13a). Ähnlich vermochte die 1minütige Vorinku-

## Diskussion

---

bation von moxLDL und PRP die stimulierende Wirkung von LPA auf Tz im PRP deutlich zu hemmen (Abb.14c). Vermutlich desensibilisierte die im moxLDL enthaltene LPA die entsprechenden Rezeptoren auf den Tz, so dass die folgende Gabe von LPA, im Vergleich zur Kontrolle, nur noch eine eingeschränkte Wirkung zeigte. Der Mechanismus entspräche der in Abb.1a gezeigten homologen Desensibilisierung.

Auf Grund dieser Beobachtungen war zu erwarten gewesen, dass die Wirkung von moxLDL auf Tz im Blut der Tz-sensibilisierenden Wirkung von LPA ähnelt. Doch entgegen den Erwartungen konnte mit moxLDL kein aktivierender oder sensibilisierender Effekt auf Tz im Blut gezeigt werden. Die alleinige Gabe von moxLDL bewirkte, anders als alleinige Gabe von LPA (Abb. 1a), keine Erhöhung der Spontanaggregation (Abb. 12b). Auch die gleichzeitige Gabe von moxLDL und Epi mit Messung der Aggregation bis zu 20min zeigte keinerlei Synergismus (Abb. 12) wie LPA und Epi (Abb. 1b). Es ist daher unwahrscheinlich, dass moxLDL wie LPA während einer frühen Phase der 60minütigen Inkubationszeit eine Tz-Sekretion wie z.B. eine P-Selectin Expression der Tz im Blut bewirkt.

Anders als LPA hemmte die Vorinkubation mit moxLDL die Kollagen ( $0,3\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und ADP ( $5\mu\text{M}$ ) induzierte Tz Aggregation im Blut signifikant. Der Effekt war in einem Bereich von  $0,5\text{-}4\text{mg}/\text{ml}$  moxLDL dosis-abhängig und unabhängig von der Inkubationsdauer. Er wurde sowohl nach einer kurzen Vorinkubation von 3min als auch nach langer Vorinkubation von 60min beobachtet (Abb. 5+8). Eine geringere Anzahl an Tz in den mit moxLDL inkubierten Proben konnte weder im Vergleich zu den Proben, welche mit Puffer, HDL oder natLDL inkubiert worden waren, gefunden werden, noch konnte ein signifikanter Abfall der Tz Zahl nach 60minütiger Inkubation beobachtet werden (Abb. 9). Ein solcher Rückgang der Tz Zahl z.B. durch eine mox-LDL induzierte Tz-Schädigung oder frühe Tz-Aktivierung, kommt als Erklärung für die beobachtete Hemmung der Tz-Aggregation demnach nicht in Frage.

Auch im PRP wurde eine Hemmung der Kollagen- und ADP-induzierten Tz-Aktivierung durch 60minütige Inkubation mit  $4\text{mg}/\text{ml}$  moxLDL, im Vergleich zu natLDL und HDL, beobachtet (Abb. 6c; Abb. 7c). In Diskrepanz zu den Ergebnis-

sen der Versuche dieser Arbeit wurde in früheren Studien, die allerdings mit isolierten Tz durchgeführt wurden, teilweise schon ab Konzentrationen von 0,2mg/ml ein Gestaltwandel (Zangl KJ 2003) und ab 0,4mg/ml eine irreversible Tz-Aggregation im Aggregometer beobachtet (Weidtmann A 1995).

Eine interessante Beobachtung wurde in der Studie von Naseem et al gemacht. Im PRP bewirkte eine 1minütige Inkubation mit moxLDL in Konzentrationen zwischen 0,25 und 0,75mg/ml eine signifikante Potenzierung der ADP (1 $\mu$ M)-stimulierten Aggregation (Naseem KM 1997). Bei einer Konzentration von 1mg/ml moxLDL ging die Potenzierung aber deutlich zurück und war nicht mehr signifikant. Bei Tornvall et al hatte 10minütige Vorinkubation von PRP mit 1,25mg/ml moxLDL ebenfalls keine Wirkung auf eine nachfolgende Stimulation mit ADP (Tornvall P 1999). Diese Beobachtungen könnten ein Hinweis darauf sein, dass die in den Versuchen für diese Arbeit verwendeten hohen Konzentrationen zumindest im PRP der Grund für eine Hemmung sein könnten. Im Blut konnte diese Vermutung durch den Versuch in Abb. 10 allerdings entkräftet werden, da hier schon geringe Konzentrationen ab 0,5mg/ml zu einer Hemmung der Kollagen induzierten Tz Aggregation führten.

In der Studie von Tornvall et al wurde der Einfluss von moxLDL auf die Reaktionsfähigkeit von Tz im Blut, ähnlich wie in dieser Arbeit, per Impedanz-Aggregometrie gemessen. Die Versuche lieferten jedoch gegenteilige Ergebnisse: Nach 10minütiger Inkubation von Blut mit 1,25mg/ml moxLDL und Stimulation durch ADP konnte eine signifikante Steigerung beobachtet werden (10min Ink, 1,25mg/ml moxLDL, ADP). Eine Ursache könnte in der unterschiedlichen Art der LDL-Oxidation liegen. Bei Tornvall et al wurde gering konzentriertes LDL (0,6mg/ml) für kurze Zeit (135-180min) mit Kupfersulfat oxidiert. Dabei wurden zwar ähnlich geringe Werte an MDA wie in dieser Arbeit gemessen, (5,1 bzw. 7 nM/mg Protein im Vergleich zu 10,5nM/mg Protein in der vorliegenden Arbeit), jedoch wurde auch eine elektrophoretische Mobilität des LDL ermittelt, welche bei moxLDL nicht bestehen sollte und ein Zeichen dafür ist, dass das modifizierte LDL über Scavenger Rezeptoren und nicht mehr nur über LPA Rezeptor erkannt wird und damit eher im Bereich der oxidierten LDL einzuordnen ist (siehe nächster Absatz).

Die Mehrheit der Studien, welche mit modifiziertem LDL arbeiteten, verwendeten oxidiertes LDL als Agonist. Die genaue Grenze, ab wann es sich nicht mehr um milde oxidiertes sondern um oxidiertes LDL handelt, ist nicht definiert. Wie bereits erwähnt (siehe Kapitel 2.2.3) werden bei der Lipoprotein Oxidation zunächst die Lipide oxidiert und erst bei weiter voranschreitender Oxidation auch das Protein. Als Zeichen einer milden Oxidation wird z.B. die Erkennung des moxLDL über LPA Rezeptoren angegeben (Zangl KJ 2003). Als Hinweis auf eine stärkere Oxidation, welche neben den Lipiden auch den Proteinanteil des LDL betrifft, gilt die Erhöhung der elektrophoretischen Mobilität (Naseem KM 1997) und die Erkennung durch Scavenger Rezeptoren (Steinbrecher UP 1987). Eine Unterscheidung des Oxidationszustandes kann außerdem über die Menge der gemessenen TBARS getroffen werden.

Korporaal et al vermuteten, dass bei der Wirkung von milde (*partially*) oxidiertem LDL auf Tz vier Rezeptoren relevant sind, die typisch für drei, im moxLDL enthaltene, verschiedene Modifikationsformen des LDL sind: natLDL wirkt über den ApoER2<sup>1</sup>, LPA (als charakteristischer Bestandteil von moxLDL) über den LPA-Rezeptor und oxLDL über CD36 und SR-A (Korporaal SJ 2007). Aus diesem Grund wurden bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit auch Studien hinzugezogen, welche oxidiertes LDL verwendeten.

Auch diese Studien kamen mehrheitlich zu dem Ergebnis, dass oxLDL eine sensibilisierende Wirkung auf Tz ausübt.

Nur eine frühe Studie fand eine hemmende Wirkung von oxLDL (0,25-1mg/ml) auf isolierte Tz und Tz in PRP (Naseem KM 1997) ähnlich der, die in den Experimenten für diese Arbeit mit moxLDL im Blut beobachtet wurden. Mit zunehmender Konzentration von oxLDL stieg in der Studie von Naseem et al auch die Hemmung der ADP induzierten Tz Aggregation. Als Erklärung nannten die Verfasser die Tz hemmende Wirkung von reaktiven Aldehyden wie 4-Hydroxynonenal. Diese Vermutung konnte kürzlich bestätigt werden (Ravi S 2016) und könnte in den Versuchen für diese Arbeit als Erklärung für die beobachtete Hemmung von Tz im Blut herangezogen werden. Allerdings sollte dann der hemmende Einfluss von reaktiven Aldehyden auch in Suspensionen isolierter Tz sichtbar sein. Hier hatte

moxLDL, über seinen Inhaltsstoff LPA, sowohl in den Versuchen für diese Arbeit (Abb. 13a) als auch in früheren Studien, wie bereits oben erwähnt, eine eindeutig aktivierende Wirkung (Weidtmann A 1995, Baumann-Simmons J 2000, Zangl KJ 2003).

Podrez et al beschrieben eine Klasse modifizierter Phosphatidylcholine ( $\text{oxPC}_{\text{cd}36}$ ) als aktive Substanz in oxLDL, deren sensibilisierende Wirkung über einen klassischen Scavenger Rezeptor, CD36, vermittelt wird. P-Selectin Expression und Konformationsänderung des Fibrinogen-Rezeptors durch oxLDL bzw.  $\text{oxPC}_{\text{cd}36}$  als Zeichen für die Aktivierung der Tz konnten an isolierten Tz nachgewiesen werden (Podrez EA 2002 und 2007). Eine frühe Aktivierung der Tz durch moxLDL könnte auch eine Erklärung dafür liefern, dass es nach einer Vorinkubation von 60min zu einer Hemmung der Kollagen und ADP induzierten Tz Aggregation kommt. Es fand sich allerdings in den Versuchen für diese Arbeit, wie oben ausgeführt, eine solche frühe Tz-Aktivierung durch moxLDL nicht (Abb. 12).

Interessant ist die von Badrnya et al beobachtete Interferenz der Wirkung von HDL auf die oxLDL induzierte Aktivierung von Tz (Badrnya S 2013) welche die moxLDL Ergebnisse dieser Arbeit zumindest teilweise erklären könnte. Die Autoren beobachteten, dass eine 5minütige Inkubation von isolierten Tz mit 0,2-0,4mg/ml natHDL die durch oxLDL (10-150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) induzierte Bildung von ROS in Tz und Expression von Oberflächen-CD40L auf Tz signifikant hemmte. Im Blut vermochte eine 5minütige Inkubation mit 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  HDL die oxLDL (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) induzierte Bildung von Plättchen-Neutrophilen-Aggregaten (PNAs) signifikant zu hemmen. Im für diese Arbeit verwendeten Versuchsaufbau wurde Blut von gesunden Individuen verwendet, die einen Gehalt von durchschnittlich 54+/-6 mg/dl HDL-Cholesterin im Blut hatten, was einer Menge von ca. 1,25mg/ml HDL Protein entspricht. Dieses HDL war natürlich während der 1stündigen Inkubationszeit mit 4mg/ml moxLDL ebenfalls anwesend und wäre zumindest eine Erklärung für eine ausbleibende sensibilisierende Wirkung von moxLDL auf die Tz Aggregation. Eine Erklärung für die beobachtete Hemmung liefert der beschriebene Einfluss von HDL allerdings nicht.

Badrnya et al verwendeten für die Modifikation von LDL Hypochlorit, ein Verfahren, bei dem ausschließlich Proteine modifiziert werden und die Lipidoxidation in etwa der von nativem LDL entspricht (Volf I 2000). Bei der in der vorliegenden Arbeit gewählten Oxidationsmethode (nach Esterbauer) steht eine milde Modifikation der Lipide im Vordergrund, während eine Modifikation der Proteine weitgehend vermieden wird (Weidtmann A 1995). Die Wirkung, die Badrnya et al mit hypmoxLDL beobachtete, deckt sich jedoch mit anderen Studien, bei denen LDL durch den Zusatz von Kupfer- oder Eisenionen oxidiert wurde (Badrnya S 2013).

### **6.5 Wirkung von HDL auf Thrombozyten im Blut**

Natives HDL hatte in den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit weder nach Kurz- noch nach Langzeitinkubation eine Wirkung auf Tz im Blut. Auch im PRP konnte in den Versuchen für diese Arbeit keine hemmende Wirkung auf die Kollagen und ADP-induzierte Tz Aggregation durch Inkubation mit HDL beobachtet werden, die sich von der Wirkung von nativem LDL unterschied (Abb. 6d und 7d). In der Literatur finden sich jedoch einige Studien, welche zeigen, dass die Inkubation mit physiologischen Mengen an HDL auf gewaschene Tz eine hemmende Wirkung ausübt (Chen LY 1994, Nofer JR 1998, Assinger A 2008). Allerdings widerspricht eine Arbeit bei gleichem Versuchsaufbau, Verwendung von 0,2-1mg/ml HDL, 2min Inkubation, anschließender Stimulation durch 0,1U/ml Thrombin und Messung im Aggregometer, diesen Ergebnissen. Eine signifikante Hemmung findet sich laut den Autoren dieser Studie erst mit oxHDL (Valiyaveettil M 2008).

Offenbar spielt die thrombozytäre Expression des HDL Rezeptors eine große Rolle bei der beobachteten, hemmenden Wirkung von HDL. Die Studie von Imachi et al lässt einen Zusammenhang zwischen der Menge an exprimiertem SR-B1 auf Tz und einer hemmenden Wirkung von HDL auf die Tz Aggregation vermuten. Starke Expression von SR-B1 korrelierte mit geringer Tz Aggregation (Imachi H 2003). Offenbar ist nicht die Menge an HDL, sondern die Menge an exprimiertem Rezeptor der entscheidende Faktor für die Wirkung von HDL. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum in den Versuchen für diese Arbeit trotz überhöhter Menge an HDL kein Effekt auf die Tz Aggregation beobachtet werden konnte, da die throm-

bozytäre HDL-Rezeptordichte möglicherweise bei den untersuchten Blutspendern niedrig war.

## 7 Zusammenfassung

Tz spielen eine zentrale Rolle bei der intraluminalen Thrombose infolge einer Ruptur oder Erosion atherosklerotischer Plaques, der Atherothrombose. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob Lipoproteine bei diesem Prozess von Bedeutung sein könnten. LDL und moxLDL, die nach Plaqueruptur freigelegt werden oder möglicherweise im Blutkreislauf in erhöhter Konzentration vorhanden sind, könnten prothrombotisch wirken, indem sie Tz voraktivieren und dadurch die Sensibilität der Tz auf andere Agonisten erhöhen. HDL könnte die gegenteilige Wirkung haben. Eine verstärkte Tz-Aktivierung durch LDL und moxLDL und eine verminderte Hemmung durch HDL könnte die überschießende Thrombusbildung erklären, welche immer wieder nach Plaqueruptur oder -erosion beobachtet wird und so ausgedehnt sein kann, dass ein ganzes Gefäß verschlossen wird.

Während bisherige Studien zu diesem Thema vor allem isolierte Tz verwendeten, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von natLDL, moxLDL und HDL auf Tz im Blut untersucht, um möglichst physiologische Bedingungen zu gewährleisten. Bezüglich der Wirkung von moxLDL auf die Tz-Aktivierung ist die vorliegende Arbeit die erste, welche mit Blut durchgeführt wurde.

Kurzzeitinkubation mit natLDL zeigte eine geringe, jedoch signifikante sensibilisierende Wirkung auf Tz im Blut bei nachfolgender Stimulation mit Kollagen und bestätigt damit Ergebnisse früherer Studien, welche mit isolierten Tz durchgeführt wurden (Weidtmann A 1995, Hackeng CM 1999, Relou IAM 2003-2, Korporaal SJ 2004). Nach einstündiger Inkubation von natLDL mit Blut wurde hingegen kein Effekt mehr auf die Tz-Funktion beobachtet. Eine ähnliche Beobachtung wurde in einer Studie mit natLDL und isolierten Tz gemacht. Nach 10-20min verschwand der zunächst aktivierende Effekt von natLDL auf isolierte Tz wieder. Die Arbeitsgruppe interpretierte dies als Schutzmechanismus vor Plättchenaktivierung durch zirkulierendes LDL (Relou IAM 2003-1).

NatHDL hatte in den Versuchen im Rahmen dieser Arbeit weder nach Kurz- noch nach Langzeitinkubation eine Wirkung auf Tz im Blut oder im PRP. In der Literatur finden sich einige Studien, welche eine hemmende Wirkung von Inkubation mit

physiologischen HDL-Konzentrationen auf isolierte Tz zeigen (Chen LY 1994, Nofer JR 1998, Assinger A 2008), allerdings auch eine Arbeit, die bei gleichem Versuchsaufbau wie die vorher genannten keine Wirkung von HDL beobachtete (Valiyaveettil M 2008).

Das überraschende Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die hemmende Wirkung von moxLDL auf die Tz-Aggregation im Blut. Dieses Resultat steht im Gegensatz zu allen anderen Arbeiten zu diesem Thema.

MoxLDL hatte in früheren Studien eine aktivierende Wirkung auf isolierte Tz (Weidtmann A 1995, Naseem KM 1997, Zangl KJ 2003). Die aktivierende Wirkung auf isolierte Tz konnte auf LPA zurückgeführt werden, welche als die wesentliche Tz-aktivierende Substanz in moxLDL identifiziert wurde (Siess W 1999, Essler M 2000). Die sensibilisierende Wirkung von LPA auf Tz im Blut, wie auch die Rolle von LPA als aktive Komponente in moxLDL bei dessen Wirkung auf isolierte Tz und Tz im PRP, konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Auf dieser Grundlage war eine ähnliche, sensibilisierende Wirkung von moxLDL auf Tz im Blut erwartet worden.

Doch anders als LPA und anders als in früheren Versuchen mit isolierten Tz hemmte die Vorinkubation mit moxLDL die durch Kollagen und ADP induzierte Tz-Aggregation im Blut und im PRP. Die Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Kurven und der Vergleich von Kurz- und Langzeitinkubation zeigten, dass die hemmende Wirkung von moxLDL auf Tz im Blut schon bei geringen Konzentrationen (0,5mg/ml) beobachtet werden konnte, und unabhängig von der Länge der Vorinkubationszeit war.

Auch wenn keine Erklärung für die Tz-hemmende Wirkung von moxLDL gefunden werden konnte (ausgeschlossen werden konnten mögliche Tz-toxische Wirkungen von moxLDL), so ist die Beobachtung sicher auf die Verwendung von Blut in den Experimenten der vorliegenden Arbeit zurückzuführen. Offenbar hemmen Plasmapbestandteile wie andere Lipoproteine und Plasmaproteine die aktivierende Wirkung von moxLDL im Blut. Die Versuche von Badrnya et al mit HDL, welches die oxLDL induzierte Sensibilisierung isolierter Tz hemmte, deuten in diese Richtung (Badrnya S 2012). Haserück et al beobachteten, dass die für eine Tz Aggregation

## Zusammenfassung

---

benötigte Konzentration an LPA in isolierten Tz im nM-Bereich und im Blut im  $\mu$ M-Bereich liegt. Sie erklärten dies mit Plasmaproteinen wie Albumin, welche LPA im Blut binden (Haserück N 2007).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen demnach vermuten, dass die Wirkungen, welche in zahlreichen Arbeiten für HDL und oxidativ modifiziertes LDL in isolierten Tz beschrieben wurden, *in vivo* keine Rolle spielen (HDL) oder völlig anders sind (moxLDL). Es ist aufgrund der Ergebnisse unwahrscheinlich, dass moxLDL, entweder nach Plaqueruptur freigelegt oder im Blutkreislauf vorhanden, prothrombotisch wirkt.

## 8 Literatur

Acton S, Rigotti A, Landschulz KT (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*. 1996 Jan 26;271(5248):518-20

Al-Hinai AT, Al-Abri A, Al-Dhuhi H (2013). First case report of familial hypercholesterolemia in an Omani family due to novel mutation in the low-density lipoprotein receptor gene. *Angiology*. 2013 May;64(4):287-92.

Amento EP, Ehsani N, Palmer H (1991). Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1991 Sep-Oct;11(5):1223-30.

Aslan JE, Itakura A, Gertz JM (2012). Platelet shape change and spreading. *Methods Mol Biol*. 2012;788:91-100.

Assinger A, Schmid W, Eder S (2008). Oxidation by hypochlorite converts protective HDL into a potent platelet agonist. *FEBS Lett*. 2008 Mar 5;582(5):778-84

Assinger A, Koller F, Schmid W (2010). Hypochlorite-oxidized LDL induces intra-platelet ROS formation and surface exposure of CD40L—A prominent role of CD36. *Atherosclerosis* 2010, 213, 129–134.

Badimon JJ, Lettino M, Toschi V (1999). Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation*. 1999 Apr 13;99(14):1780-7

Badrnya S, Butler LM, Söderberg-Naucler C (2012). Platelets directly enhance neutrophil transmigration in response to oxidised low-density lipoprotein. *Thromb Haemost* 2012; 108: 719–72

Badrnya S, Assinger A, Wolf I (2013). Native high density lipoproteins (HDL) interfere with platelet activation induced by oxidized low density lipoproteins (OxLDL). *Int J Mol Sci*. 2013 May 10;14(5):10107-21.

## Literatur

---

Baker DL, Morrison P, Miller B (2002). Plasma lysophosphatidic acid concentration and ovarian cancer. JAMA. 2002 Jun 19;287(23):3081-2

Baker DL, Desiderio DM, Miller DD (2001). Direct quantitative analysis of lysophosphatidic acid molecular species by stable isotope dilution electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry. Anal Biochem. 2001;292:287-295.

Barter P, Gotto AM, LaRosa JC (2007). HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. N Engl J Med. 2007 Sep 27;357(13):1301-10

Barter PJ, Nicholls S, Rye KA (2004). Antiinflammatory Properties of HDL. Circ Res. 2004 Oct 15;95(8):764-72

Baumann-Siemons J (2000). Milde oxidiertes LDL stimuliert die Proteintyrosinphosphorylierung während des Gestaltwandels menschlicher Thrombozyten. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der LMU

Beitz A , Nikitina NA, Giessler C (1990). Modulation of TXA2. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 1990 May;40(1):57-61.

Benitez S, Camacho M, Arcelus R (2004). Increased lysophosphatidylcholine and non-esterified fatty acid content in LDL induces chemokine release in endothelial cells. Relationship with electronegative LDL. Atherosclerosis 2004; 177: 299–305.

Berliner JA, Territo MC, Sevanian A (1990). Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. J Clin Invest. 1990 Apr;85(4):1260-6

Bjerve KS, Daae LN, Bremer J (1974). The selective loss of lysophospholipids in some commonly used lipid-extraction procedures. Anal Biochem. 1974 Mar;58(1):238-45.

Born GV, Cross MJ (1963). Effect of adenosine diphosphate on the concentration of platelets in circulating blood. Nature 197, 974-976.

Brandl R, Richter T, Haug K (1997). Topographic analysis of proliferative activity in carotid endarterectomy specimens by immunocytochemical detection of the cell cycle-related antigen Ki-67. Circulation 96, 3360- 3368.

Bröijersén A, Wallén NH, Vitols S (1993). Autologous low density lipoprotein enhances platelet aggregation in whole blood, as measured by in vitro filtragometry. *Platelets*. 1993;4(1):11-5.

Brown MS, Goldstein JL (1990). Scavenging for receptors. *Nature*. 1990; 343: 508-509

Cannon CP, Blazing MA, Giugliano RP (2015). Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med*. 2015 Jun 18;372(25):2387-97.

Carnevale R, Bartimoccia S, Nocella C (2014). LDL oxidation by platelets propagates platelet activation via an oxidative stress-mediated mechanism. *Atherosclerosis*. 2014 Nov;237(1):108-16

Castelli WP (1988). Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease--the Framingham Heart Study. *Can J Cardiol*. 1988 Jul;4 Suppl A:5A-10A.

Chan HC, Ke LY, Chu CS (2013). Highly electronegative LDL from patients with ST-elevation myocardial infarction triggers platelet activation and aggregation. *Blood*. 2013 Nov 21;122(22):3632-41

Chen LY, Mehta JL (1994). Inhibitory effect of high-density lipoprotein on platelet function is mediated by increase in nitric oxide synthase activity in platelets. *Life Sci*. 1994;55(23):1815-21.

Chen M, Kakutani M, Naruko T (2001). Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Mar 23;282(1):153-8

Choi JW, Herr DR, Noguchi K (2010). LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50:157-86

Corti R, Farkouh ME, Badimon JJ (2002). The vulnerable plaque and acute coronary syndromes. *Am. J. Med* 113, 668–680

Crisby M, Kublickiene K, Henareh L (2009). Circulating levels of autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein and C-reactive protein levels correlate with endothelial function in resistance arteries in men with coronary heart disease. *Heart Vessels*. 2009 Mar;24(2):90-5.

Dahlen GH, Dahlen GH, Guyton JR (1986). Association of levels of lipoprotein Lp(a), plasma lipids, and other lipoproteins with coronary artery disease documented by angiography. *Circulation*. 1986 Oct;74(4):758-65.

Deeg P, Daunor R, Haubitz I (1993). Die Risikofaktorenkonstellation vor und nach Rehabilitation bei Pat. mit H-K-L-Erkrankung. *Herz/Kreislauf* 1 (1993) 22-25

Draude G, Hrboticky N, Lorenz RL (1999). The expression of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX- 1) on human vascular smooth muscle cells and monocytes and its down-regulation by lovastatin. *Biochem Pharmacol*. 1999;57(4):383–386.

Drechsler M, Megens RT, van Zandvoort M (2010). Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation* 2010; 122: 1837–1845.

Essler M Retzer M, Bauer M (2000). Stimulation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized LDL proceeds through activation of lysophosphatidic acid receptors and the Rho/Rho-kinase pathway. Inhibition by lovastatin.

Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G (1990). Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chem Res Toxicol* 1990; 3: 77–92.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 341–390.

Esterbauer H, Gieseg SP, Giessauf A (1995). Free Radicals Lipoprotein Oxidation and Atherosclerosis-Biological and Clinical Aspects. S.11-26, Richelieu Press 1995

Estruch M, Sánchez-Quesada JL, Ordóñez Llanos J (2013). Electronegative LDL: a circulating modified LDL with a role in inflammation. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:181324

Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation and lipid metabolism. *J Clin Inv* 2001; 108: 785–791.

Fernandez-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E (1994). Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: Implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23:1562–1569.

Frank PG, Marcel YL (2000). Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J Lipid Res.* 2000 Jun;41(6):853-7

Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (2012). *Pharmakologie und Toxikologie*. Springer 2012. Kapitel 41 S. 410-411

Galis ZS, Sukhova GK(1994). Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994; 94: 2493-2503

Gawaz M (2001). *Blood Platelet*. Thieme Verlag 2001. S. 7

Gawaz M, Neumann FJ, Schomig A (1999). Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy. *Circulation.* 1999 Jan 5;99(1):E1-E11.

Getz GS, Reardon CA (2009). Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J Lipid Res.* 2009 Apr; 50(Suppl): S156–S161

Golebiewska EM, Poole AW (2015). Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* 2015 May;29(3):153-62.

Gueguen G, Gaige B, Grevy JM (1999). Structure-activity analysis of the effects of lysophosphatidic acid on platelet aggregation. *Biochemistry* 1999; 38: 8440–8450.

Guyton JR, Klemp KF (1996). Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 Jan;16(1):4-11

Hackeng CM, Pladet MW, Akkerman JW (1999). Low density lipoprotein phosphorylates the focal adhesion-associated kinase p125(FAK) in human platelets independent of integrin alphaIIb beta3. *J Biol Chem.* 1999 Jan 1;274(1):384-8.

Haserück N (2007). Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation induced by the atherosclerotic plaque lipid lysophosphatidic acid. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der LMU

Haserück N, Erl W, Pandey D (2004). The plaque lipid lysophosphatidic acid stimulates platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation in whole blood: involvement of P2Y1 and P2Y12 receptors. *Blood* 2004; 103: 2585–2592

Hevonenja T, Pentikainen MO, Hyvonen MT (2000). Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 189–210.

Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S (1998). Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation*. 1998 Oct 13;98(15):1487-94.

Imachi H, Murao K, Cao W (2003). Expression of human scavenger receptor B1 on and in human platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 May 1;23(5):898-904

Japaridze L, Sadunishvili M, Megreladze I (2016). Combination therapy effectiveness of ezetimibe and atorvastatin in patients with acute coronary syndrome. *Georgian Med News*. 2016 Mar;(252):15-22.

Karlsson H, Kontush A, James RW (2015). Functionality of HDL: antioxidation and detoxifying effects. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;224:207-28

Karten B, Beisiegel U, Gercken G (1997). Mechanisms of lipid peroxidation in human blood plasma: a kinetic approach. *Chem Phys Lipids*. 1997 Aug 29;88(2):83-96. PubMed PMID: 9314186

Khandoga AL, Pandey D, Welsch U (2011). GPR92/LPA5 lysophosphatidate receptor mediates megakaryocytic cell shape change induced by human atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Res*. 2011 Apr 1;90(1):157-64.

Kolodgie FD, Burke AP, Wight TN (2004). The accumulation of specific types of proteoglycans in eroded plaques: a role in coronary thrombosis in the absence of rupture. *Curr Opin Lipidol*. 2004 Oct;15(5):575-82. Review.

Korporaal SJ, Meurs I, Hauer AD (2011). Deletion of the HDL Receptor SRBI in Mice Modulates Thrombosis Susceptibility and Indirectly Affects Platelet Function by Elevation of Plasma Free Cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Jan;31(1):34-42

Korporaal SJ, Van Eck M, Adelmeijer J (2007). Platelet Activation by Oxidized Low Density Lipoprotein Is Mediated by CD36 and Scavenger Receptor-A. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007;27:2476-2483

Korporaal SJ, Relou IA, van Eck M (2004). Binding of low density lipoprotein to platelet apolipoprotein E receptor 2' results in phosphorylation of p38MAPK. *J Biol Chem.* 2004 Dec 10;279(50):52526-34.

Krieger M (1999). Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:523-58.

Lafont A (2003). Basic aspects of plaque vulnerability. *Heart.* 2003 Oct;89(10):1262-7.

Lewington S, Whitlock G, Clarke R (2007). Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet.* 2007 Dec 1;370(9602):1829-39

Lewis GF, Rader DJ (2005). New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res.* 2005 Jun 24;96(12):1221-32

Libby P (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874.

Lievens D, von Hundelshausen P (2011). Platelets in atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2011 Nov;106(5):827-38.

Lievens D, Zernecke A, Seijkens T (2010). Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis. *Blood* 2010; 116: 4317–4327.

Lind S, Olsson AG, Eriksson M (2004). Autosomal recessive hypercholesterolemia: normalization of plasma LDL cholesterol by ezetimibe in combination with statin treatment. *J Intern Med.* 2004 Nov;256(5):406-12.

## Literatur

---

Litvinov D, Mahini H, Garelnabi M (2012). Antioxidant and Anti-Inflammatory Role of Paraoxonase 1: Implication in Arteriosclerosis Diseases. *N Am J Med Sci.* 2012 Nov; 4(11): 523–532.

Lopes-Virella MF, Hunt KJ, Baker NL (2012). The Levels of MDA - LDL in Circulating Immune Complexes predict Myocardial Infarction in the VADT study. *Atherosclerosis.* 2012 Oct; 224(2): 526–531.

Magwenzi S, Woodward C, Wraith KS (2015). Oxidized LDL activates blood platelets through CD36/NOX2-mediated inhibition of the cGMP/protein kinase G signaling cascade. *Blood.* 2015;125(17):2693-2703

Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr (1984). Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res.* 1984 Dec 1;25(12):1277-94.

Malara A, Balduini A (2012). Blood platelet production and morphology. *Thrombosis research.* 2012;129(3):241-4. Epub 2012/01/10.

Marmur JD, Thiruvikraman SV, Fyfe BS (1996). Identification of active tissue factor in human coronary atheroma. *Circulation* 1996; 94:1226 –32.

Marwali MR, Hu CP, Mohandas B (2007). Modulation of ADP-Induced Platelet Activation by Aspirin and Pravastatin: Role of Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1, Nitric Oxide, Oxidative Stress, and Inside-Out Integrin Signaling. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 Sep;322(3):1324-32.

Moolenaar WH (1995). Lysophosphatidic Acid, a Multifunctional Phospholipid Messenger. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 12949-12952

Moriwaki H, Kume N, Sawamura T (1998). Ligand specificity of LOX-1, a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Oct;18(10):1541-7.

Naseem KM, Goodall AH, Bruckdorfer KR (1997). Differential effects of native and oxidatively modified low-density lipoproteins on platelet function. *Platelets.* 1997;8(2-3):163–173.

Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST (2004). The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res* 2004; 45: 993–1007.

NCEP (2002). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report, *Circulation*. 2002 Dec 17;106(25):3143-421.

Nofer JR, van der Giet M, Tölle M (2004). HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest.* 2004 Feb;113(4):569-81

Nofer JR, Walter M, Kehrel B (1998). HDL3-mediated inhibition of thrombin-induced platelet aggregation and fibrinogen binding occurs via decreased production of phosphoinositide-derived second messengers 1,2-diacylglycerol and inositol 1,4,5-tris-phosphate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 Jun;18(6):861-9.

Nurden AT (1999). Inherited abnormalities of Platelets. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; 82/2 (Aug) pp.165-1004 Pages: 468-480

Pan B, Kong J, Jin J (2016). A novel anti-inflammatory mechanism of high density lipoprotein through up-regulating annexin A1 in vascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jun;1861(6):501-12

Park YM (2014). CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp Mol Med.* 2014 Jun 6;46:e99

Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG (1990). High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 1044, 275–283. 10.1016/0005-2760(90)90314-N

Penz, S. (2005). Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI, *FASEB J.* 19, 898–909

Perdomo G, Henry Dong H (2009). Apolipoprotein D in Lipid Metabolism and Its Functional Implication in Atherosclerosis and Aging. *Aging (Albany NY)*. 2009 Jan;1(1):17-27.

## Literatur

---

Phillips DR, Charo IF, Parise LV (1988). The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 71, 831-843.

Plow EF, Ginsberg MH (1989). Cellular adhesion: GPIIb-IIIa as a prototypic adhesion receptor. *Prog Hemost Thromb* 9, 117-156.

Podrez EA, Byzova TV, Febbraio M (2007). Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype. *Nat Med.* 2007;13(9):1086–1095.

Podrez EA, Poliakov E, Shen Z (2002). Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J. Biol. Chem.* 277, 38503–38516 (2002).

Pötzsch B, Madlener K (2010). Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie. Springer Verlag 2010, 2. Auflage, ISBN 9783642015441, S.77

Raal FJ, Santos RD (2012). Homozygous familial hypercholesterolemia: current perspectives on diagnosis and treatment. *Atherosclerosis*. 2012 Aug;223(2):262-8.

Ravi S, Johnson MS, Chacko BK (2016). Modification of platelet proteins by 4-hydroxynonenal: Potential Mechanisms for inhibition of aggregation and metabolism. *Free Radic Biol Med.* 2016 Feb; 91:143-53

Reininger AJ (2010). A 2-Step Mechanism of Arterial Thrombus Formation Induced by Human Atherosclerotic Plaques. *JACC Volume 55, No. 1, 1147-1158.*

Relou IAM, Bax LA, van Rijn HJ (2003-2). Site-specific phosphorylation of platelet focal adhesion kinase by low-density lipoprotein. *Biochem J.* 2003 Jan 15;369(Pt 2):407-16.

Relou IAM, Gorter G, Ferreira IA (2003-1). Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1) Inhibits Low Density Lipoprotein-induced Signaling in Platelets. *J Biol Chem.* 2003 Aug 29;278(35):32638-44

Renz H (2003). Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin: Patophysiologie, Pathobiochemie, Hämatologie. Verlag Walter de Gruyter, 2003. ISBN 3110200139, 9783110200133

Ross R (1999). Atherosclerosis, an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126

Rother E, Brandl R, Baker DL (2003). Subtype selective antagonists of Lysophosphatidic acidreceptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation* 108, 741-747.

Ruggeri ZM (2002). Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 8, 1227-1234.

Sánchez-Quesada JL, Benítez S, Ordóñez-Llanos J (2004). Electronegative low-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol.* 2004 Jun;15(3):329-35

Sano Y, Gomez FE, Kang W (2002). Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *J Biol Chem.* 2002 Jun 14;277(24):21197-206

Saulnier-Blache JS, Girard A, Simon MF (2000). A simple and highly sensitive radioenzymatic assay for lysophosphatidic acid quantification. *J Lipid Res.* 2000 Dec;41(12):1947-51.

Sawamura T, Kume N, Aoyama T (1997) An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature.* 1997;386(6620):73–77

Schaller MD (2001). Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Jul 25;1540(1):1-21.

Schulz T, Schiff H, Lorenz R: Preserved antioxidative defense of lipoproteins in renal failure and during hemodialysis. *Am. J. Kidney Dis.* 4/1995, 25/4, S. 564-571

Siess W, Essler M, Brandl R (2000). Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate: two lipid villains provoking cardiovascular diseases? *IUBMB Life* 2000, 49, S. 167-171

Siess W (1989). Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev.* 1989 Jan;69(1):58-178

Siess W (2006). Platelet Interaction with Bioactive Lipids Formed by Mild Oxidation of Low-Density Lipoprotein. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006;35:292–304

Siess W, Zangl KJ (1999). Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96, pp. 6931–6936

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985 Oct;150(1):76-85

Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M (1999). Human serum Paraoxonase/Arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids : apolipoprotein A-I stabilizes activity.

Steinberg D (1997). Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. Circulation. 1997;95:1062–1071.

Steinbrecher, UP (1987). Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatisation of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. J Biol Chem 1987;262:3603-3608.

Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. Nature. 1997 Mar 20;386(6622):292-6.

Tanaga K, Bujo H, Inoue M (2002). Increased Circulating Malondialdehyde-Modified LDL Levels in Patients With Coronary Artery Diseases and Their Association With Peak Sizes of LDL Particles. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002 Apr 1;22(4):662-6.

Thon JN, Italiano JE (2012). Platelets: production, morphology and ultrastructure. Handbook of experimental pharmacology. 2012(210):3-22.

Tornvall P, Chirkova L, Toverud KD (1999). Native and oxidized low density lipoproteins enhance platelet aggregation in whole blood. Thromb Res. 1999 Aug 15;95(4):177-83.

Toschi V, Gallo R, Lettino M (1997). Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. Circulation. 1997 Feb 4;95(3):594-9.

Totani L, Evangelista V (2010). Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 2357–2361.

Toth O, Calatzis A, Penz S (2006). Multiple electrode aggregometry: A new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 96, 781-788.

Valiyaveettil M, Kar N, Ashraf MZ (2008). Oxidized high-density lipoprotein inhibits platelet activation and aggregation via scavenger receptor BI. *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):1962-71

van Zanten GH, de Graaf S, Slootweg, PJ (1994). Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin Invest* 93, 615-632.

Vandvik PO, Lincoff AM, Gore JM (2012). Primary and Secondary Prevention of Cardiovascular Disease. *Chest*. 2012 Feb; 141(2 Suppl): e637S–e668S.

Virella G, Thorpe S, Alderson NL (2004). Definition of the immunogenic forms of modified human LDL recognized by human autoantibodies and by rabbit hyperimmune antibodies. *J Lipid Research*. 2004;45:1859–67

Volf I, Roth A, Cooper J (2000). Hypochlorite modified LDL are a stronger agonist for platelets than copper oxidized LDL. *FEBS Lett*. 2000 Oct 20;483(2-3):155-9

von Hundelshausen P, Weber C (2007). Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res* 2007; 100: 27–40

Wallin B, Rosengren B, Shertzer HG (1993). Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Anal Biochem*. 1993 Jan;208(1):10-5

Weidtmann A, Scheithe R, Hrboticky N (1995). Mildly oxidized LDL induces platelet aggregation through activation of phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(8):1131–1138.

Weidtmann A(1996). Wirkungen von nativem und unterschiedlich stark oxidiertem LDL auf Thrombozyten. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der LMU

WHO Fact Sheet

(Reviewed September 2016). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>

## Literatur

---

Williams JR, Khandoga AL, Goyal P (2009). Unique Ligand Selectivity of the GPR92/LPA5 Lysophosphatidate Receptor Indicates Role in Human Platelet Activation. *J Biol Chem.* 2009 Jun 19; 284 (25) : 17304-19

Wraith KS, Magwenzi S, Aburima A (2013). Oxidized low-density lipoproteins induce rapid platelet activation and shape change through tyrosine kinase and Rho kinase-signaling pathways. *Blood.* 2013 July 25; 122(4): 580–589.

Yang Y, Shi R, Cao Z (2016). VPO1 mediates oxidation of LDL and formation of foam cells. *Oncotarget.* 2016 May 5. doi: 10.18632/oncotarget.9193

Yla-Herttula S, Palinski W, Butler SW (1994). Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes, epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994;14:32– 40.

Zangl KJ (2003). Identifikation von Lysophosphatidsäure als Thrombozytenaktivierende Substanz milde oxidierte Lipoproteine. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der LMU

## 9 Anhang

### 9.1 Foto

Foto 1: Lipoproteinauf trennung	S. 29
---------------------------------	-------

### 9.2 Tabellen

Tabelle 1: Plasmalipidprofile der Probanden	S. 31
Tabelle 2: Gehalt an TBARS in moxLDL und natLDL	S. 32

### 9.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1a+b: Homologe Desensibilisierung der Thrombozytenaggregation durch LPA	S.40
Abb 1c: Heterologe Sensibilisierung der Thrombozytenaggregation durch LPA	S. 41
Abb. 2a-c: Einfluss der Inkubationszeit auf die Sensibilisierung der Thrombozytenaggregation durch LPA	S. 43
Abb. 3: LPA induziert eine Aktivierung der Thrombozyten	S. 45
Abb. 4: Vergleich der Thrombozytenaggregation nach Kurz- und Langzeitinkubation des Blutes bei 37°C	S. 47
Abb. 5: Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation nach Langzeitinkubation mit natLDL, moxLDL, oder HDL	S. 49

- Abb. 6: Wirkung von Langzeitinkubation mit natLDL, moxLDL und HDL auf die Kollagen stimulierte Thrombozytenaggregation im PRP S. 51
- Abb. 7: Wirkung von Langzeitinkubation mit natLDL, moxLDL und HDL auf die ADP stimulierte Thrombozytenaggregation im PRP S. 53
- Abb. 8: Vergleich der Thrombozytenaggregation nach Kurz- und Langzeitinkubation stimuliert durch Kollagen mit den Lipoproteinen natLDL, HDL und moxLDL S.55
- Abb. 9: Darstellung der veränderten Thrombozytenanzahl nach 60min Inkubation S. 56
- Abb. 10 Dosisabhängigkeit des Effekts von moxLDL nach Langzeitinkubation auf die Kollagen induzierte Thrombozytenaggregation S. 57
- Abb. 11: Wirkung von Kupfersulfat auf die Thrombozytenaggregation bei Langzeitinkubation S. 59
- Abb. 12: Aufzeichnung der Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregation im Blut während 20min S. 61
- Abb. 13: Wirkung des LPA5 Rezeptor Antagonisten PGM029615 auf den durch moxLDL, oxLDL und LPA induzierten Gestaltwandel isolierter Thrombozyten S. 63
- Abb. 14: Einfluss von moxLDL und natLDL auf den durch LPA induzierten Gestaltwandel von Thrombozyten im PRP S. 65

## 9.4 Abkürzungen

### A

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Apo	Apolipoprotein
ASS	Acetylsalicylsäure (Aspirin®)
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>Aggregation Unit</i>
AUC	Fläche unter der Aggregationskurve ( <i>area under the curve</i> ) (Multiplate®-System)

### B

BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
BCA	Bicinchoninsäure ( <i>bicinchoninic acid</i> )
BTH	Butylhydroxytoluol

### C

Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CD	Cluster of Differentiation
Cu <sup>2+</sup>	Kupfer
CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat

**D**

DG Dichtegradient

**E**

EDTA Ethyldiamintetraacetat

eLDL elektronegatives LDL

Epi Adrenalin (*epinephrine*)

**F**

FACS fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (*fluorescence activated cell sorting*)

Fe<sup>2+</sup> Eisen

FeCl<sub>3</sub> Eisenchlorid

**G**

GW Gestaltwandel

**H**

HEPES 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Wasserstoffperoxid

HDL *High Density Lipoprotein*

HDL-C HDL-Cholesterin

**I**

ILDL *Intermediate Low Density Lipoprotein*

**K**

KBr            Kaliumbromid

KCl            Kaliumchlorid

**L**

LCAT          Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase

LDL            *Low Density Lipoprotein*

LPA            Lysophosphatidsäure

LOX-1        *Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*

**M**

Mg<sup>2+</sup>        Magnesium

MgCl<sub>2</sub>        Magnesiumchlorid

moxHDL        milde oxidiertes *High Density Lipoprotein*

moxLDL        milde oxidiertes *Low Density Lipoprotein*

MW            Mittelwert

MDA            Malondialdehyd

MPO            Myeloperoxidase

MAP            *Mitogen activated protein*

MLC            *Myosin Light Chain*

MLCP        *Myosin Light Chain Phosphatase*

**N**

NaCl        Natriumchlorid

NADPH        Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

## Anhang

---

NaOH	Natriumhydroxid
natHDL	natives HDL
natLDL	natives LDL
NOX2	NAD Phosphat Oxidase 2

### O

O.D.	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
------	--

### P

PAC-1	Antikörper zur Markierung der aktivierte Konformation des Fibringen-Rezeptors auf Tz
PBS	Phosphat-gepufferte Saline ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PDGF	Platelet derived growth factor
PECAM	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PLA2	Phospholipase A2
PNA	Plättchen Neutrophilen Aggregate
PON-1	Paraoxonase-1
PPP	plättchenarmes Plasma ( <i>platelet-poor plasma</i> )
PRP	plättchenreiches Plasma ( <i>platelet-rich plasma</i> )

### R

RT	Raumtemperatur
ROS	<i>reactive oxygen spezies</i>

**S**

SD	<i>Standard Deviation</i> Standardabweichung
SRA	Scavenger Receptor Klasse A
SRB	Scavenger Receptor Klasse B

**T**

Tz	Thrombozyten
Tab.	Tabelle
TF	<i>tissue factor</i> (Gewebethromboplastin)
	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
TXA2	Thromboxan A2
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TRAP	<i>thrombin receptor activating peptide</i>

**V**

vWF	von Willebrand Faktor
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>

**W**

WHO	<i>World Health Organisation</i>
-----	----------------------------------

## 9.5 Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunde
k	tausend
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar (= mol/l)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
mA	Milliamper
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
min	Minute
MWCO	Molecular Weight cut-off
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
pH	pH-Wert
% (v/v)	Volumenprozent (Volumen pro Volumen)

% (w/v)	Gewichtsprozent (Gewicht pro Volumen)
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
s, bzw. sek.	Sekunden
U	Unit
UV	ultraviolet
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

## **Eidesstattliche Versicherung**

**Feische, Gesa**

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Wirkung der Lipoproteine LDL, moxLDL und HDL auf die Thrombozytenfunktion im Blut**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde

Zollikerberg, 09.04.2018

---

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand