

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

# **Bedeutung der Thrombozytenaktivierung für die Progression der Atherosklerose bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von  
Simon Ersel  
aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. W. Bocksch

2. Prof. Dr. med. E. Steinhagen-Thiessen

3. Priv.-Doz. Dr. med. R.-M. Liehr

Datum der Promotion: 14.12.2007

---

- Inhaltsverzeichnis -

<b>1. Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1. Diabetes und Atherosklerose	8
1.2. Pathophysiologie der diabetischen Gefäßerkrankung	9
1.2.1. Endothelzell dysfunktion	9
1.2.2. Dysfunktion vaskulärer glatter Muskelzellen	9
1.2.3. Thrombozytenfunktion bei Diabetikern	9
1.3. Thrombozyten und Hämostase	10
1.4. Morphologie und Physiologie der Thrombozyten	11
1.4.1. Adhäsion	12
1.4.2. Aggregation	14
1.4.3. Interaktion aktivierter Thrombozyten mit anderen Zellen	16
1.5. Thrombozytäre Membranglykoproteine	17
1.5.1. Integrine	17
1.5.1.1. Der GPIIb-IIIa-Integrinrezeptor ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3)	17
1.5.2. Leuzinreiche Glykoproteine	19
1.5.3. Selektine	19
1.5.4. Immunglobulin-Typ	19
1.6. Atherosklerose und Thrombozyten	20
1.7. Bildgebung der Atherosklerose mit Hilfe der B-Mode Sonografie	22
1.7.1. Ultraschall	22
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>24</b>
<b>3. Patienten und Methodik</b>	<b>25</b>
3.1. Patientenuntersuchung	25
3.1.1. Beschreibung der Studienpopulation	25
3.1.2. Carotis-B-Mode Sonografie	28
3.1.2.1. Bestimmung der Intima-Media-Dicke (IMD)	28
3.1.2.2. Intraobservervariabilität	30
3.1.2.3. Definition der Atheroskleroseprogression	30
3.2. Labormethoden	30
3.2.1. Immunologische Marker	30
3.2.1.1. Marker für GPIb-V-IX	30

Inhaltsverzeichnis	4
3.2.1.2. Marker für GPIIb-IIIa	31
3.2.1.3. Degranulationsmarker	31
3.2.1.4. Marker für die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion	31
3.2.2. Verwendete monoklonale Antikörper	31
3.2.3. Durchflusszytometrische Bestimmung thrombozytärer Membranglykoproteine	32
3.2.3.1. Prinzip der Durchflusszytometrie	32
3.2.3.2. Probengewinnung	34
3.2.3.3. Cyfix-Konservierung	34
3.2.3.4. Probenweiterverarbeitung / Zweifachfärbung	34
3.2.3.5. Durchführung	35
3.2.3.6. Messung	36
3.2.3.7. Darstellung der Messung	36
3.2.3.8. Quantitative Beschreibung der Antikörperbindung	37
3.2.4. Durchflusszytometrische Untersuchung der Thrombozyten-Leukozyten- Interaktion	39
3.2.4.1. Monoklonale Antikörper	39
3.2.4.2. Probengewinnung	39
3.2.4.3. Probenweiterverarbeitung / Dreifachfärbung	39
3.2.4.4. Durchführung	39
3.2.4.5. Messung	40
3.2.4.6. Darstellung der Messung	41
3.3. Statistische Auswertung	43
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>44</b>
4.1. Patientencharakteristik	44
4.1.1. Auswertung der Carotis B-Mode Sonografie	47
4.1.2. Ergebnisse zu Patienten mit und ohne Atheroskleroseprogression	48
4.1.3. Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse und koronare Intervention	51
4.2. Durchflusszytometrische Untersuchung	52
4.2.1. Expression thrombozytärer Membranglykoproteine	52
4.2.2. Thrombozyten-Leukozyten Interaktion	54
4.2.2.1. Nachweis leukozytärer Aktivierungsmarker bei Thrombozyten- Leukozytenkoaggregaten	54
<b>5. Diskussion</b>	<b>57</b>
5.1. Studienpopulation	57

Inhaltsverzeichnis	5
<hr/>	
5.2.	Einfluss der Thrombozytenaktivierung auf die Progression der Atherosklerose 58
5.3.	Bedeutung der Thrombozyten-Leukozyten Interaktion auf die Progression der Atherosklerose 59
5.4.	Klinische Bedeutung 61
5.5.	Limitationen der Studie 63
5.6.	Ausblick 64
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung 68</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis 71</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang 79</b>

## Inhaltsangabe

**Hintergrund** – Auf Grund einer akzelerierten Atherosklerose und der im Verlauf der Erkrankung auftretenden mikro- und makroangiopathischen Komplikationen zählt Diabetes mellitus zu den Hauptursachen sowohl der koronaren Herzerkrankung, der ischämischen Apoplexie, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit als auch der diabetischen Nephropathie und Retinopathie [1] [2]. Thrombozyten spielen eine Schlüsselrolle bei der Atherogenese und thromboembolischen Komplikationen bei Diabetespatienten.

**Methoden und Ergebnisse** – Wir untersuchten prospektiv insgesamt 172 Typ 2 Diabetespatienten zu Studienbeginn und nach einer follow-up Phase von einem Jahr bezüglich der Expression thrombozytärer und leukozytärer Antigene und der Zunahme der Intima-Media Dicke der Carotisarterie. Die Intima-Media Dicke der Arteria carotis communis wurde bilateral zu Studienbeginn und nach einem Jahr gemessen. Die Thrombozytenaktivierung wurde durch den Einsatz immunologischer Marker (CD62P, CD63, CD62L) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Prävalenz der Atheroskleroseprogression ( $\Delta\text{IMD}>0$ ) betrug in dieser Studienpopulation 62,8%. Wir fanden heraus, dass Diabetespatienten mit Progression der IMD eine signifikant höhere Expression von P-Selektin, CD63 und eine verminderte Expression von CD62L (Leukozytenaktivierung) im Vergleich zu Patienten mit stabiler Atherosklerose haben. Darüber hinaus ergab eine multivariate logistische Regressionsanalyse, dass die Thrombozytendegranulation von CD63 einen Prädiktor für die Progression der IMD, unabhängig von klassischen Risikofaktoren und HbA1c, bei Diabetespatienten darstellt.

**Schlussfolgerung** – Eine erhöhte systemische Thrombozytendegranulation und Leukozytenaktivierung ist mit der Progression der Atherosklerose bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert.

**Schlüsselwörter:** Atherosklerose • IMD • Zelladhäsionsmoleküle • Diabetes mellitus • Thrombozyten

---

**Abstract**

**Background** - Accelerated atherosclerosis and micro- and macrovascular complications make diabetes mellitus a leading cause of coronary artery disease, ischemic stroke, retinopathy and chronic renal failure [1] [2]. Plateles play a key role in atherogenesis and thromboembolic complications in patient with type 2 diabetes.

**Methods and Results** - We prospectively examined the relation between systemic platelet activation and progression of carotid wall thickness in 172 patients with type 2 diabetes within one year. The IMT of the common carotid artery was measured bilaterally at study entry and after one year. Platelet activation was assessed with the use of immunological markers of platelet activation (CD62P, CD63, CD62L) and flow cytometry. The prevalence for progression of atherosclerotic carotid disease in this population was 62.8%. We found that diabetic patients with progression of the IMT had a significantly increased expression of P-Selectin, CD63 and reduced expression of L-Selectin (leukocyte activation) compared to patients with stable carotid disease. Moreover a multivariate logistic regression analysis revealed that degranulation of platelet CD63 is a predictor for progression of IMT independently of classical risk factors and HbA1c in diabetic patients.

**Conclusions** – Enhanced systemic platelet degranulation and leukocyte activation is associated with progression of carotid artery in type 2 diabetes patients.

**Key words:** atherosclerosis • IMT • cell adhesion molecules • diabetes mellitus • platelets

## **1. Einleitung**

### **1.1. Diabetes und Atherosklerose**

Weltweit sind schätzungsweise 100 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt [3] mit steigender Inzidenz in den westlichen Industrienationen. Den überwiegenden Teil bilden dabei Typ 2 Diabetespatienten (90-95 %). Diabetes mellitus geht mit einer akzelerierten Atherosklerose einher und begünstigt das Auftreten sowohl mikro- als auch makroangiopathischer Komplikationen. Daher zählt Diabetes mellitus zu den Hauptursachen sowohl der koronaren Herzerkrankung, der ischämischen Apoplexie, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit als auch der diabetischen Retinopathie und der chronischen Niereninsuffizienz [1] [2]. Unabhängig von arteriellem Hypertonus, Rauchen, Adipositas und Hypercholesterinämie stellt Diabetes mellitus einen wesentlichen Risikofaktor für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität dar [4]. Die koronare Herzkrankheit, die Haupttodesursache bei Diabetespatienten, ist zum Zeitpunkt der Diagnose meist schon weiter vorangeschritten als bei Normalpatienten und weist insgesamt eine schlechtere Prognose auf [5]. Für eine spätere Diagnose und die schlechtere Prognose sind dabei vor allem stumme myokardiale Ischämien verantwortlich. Hieraus wird ersichtlich, dass die Erforschung der pathophysiologischen Grundlagen von Diabetes mellitus und Atherosklerose nicht nur aus epidemiologischer Sicht von immenser Bedeutung ist, sondern auch langfristig die Möglichkeit neuer, optimaler Behandlungsstrategien für dieses Hochrisikokollektiv eröffnet.

Diabetes mellitus führt über die veränderte Stoffwechsellage wie chronische Hyperglykämie als auch Dyslipoproteinämie und Insulinresistenz zu einer arteriellen Dysfunktion und geht mit einem hyperkoagulablen Zustand einher [1]. Eine zentrale Bedeutung im Zusammenhang mit der aggressiven und schneller voranschreitenden Atherosklerose bei Diabetespatienten kommt den zahlreichen Funktionsveränderungen verschiedener Zelltypen zu, vor allem der Thrombozyten.

Im Folgenden soll auf diese verschiedenen relevanten Veränderungen auf zellulärer Ebene bei Diabetespatienten näher eingegangen werden.

---

## **1.2. Pathophysiologie der diabetischen Gefäßerkrankung**

### **1.2.1. Endothelzellfunktion**

Die Hyperglykämie inhibiert die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch Blockade der endothelialen NO-Synthaseaktivität [6]. NO ist nicht nur ein potenter Vasodilatator, sondern auch in der Lage, die Plättchenstimulation zu unterdrücken. Es begrenzt inflammatorische Reaktionen, indem es die Leukozytenadhäsion an das Endothel verringert und eine Abnahme der Proliferation und Migration glatter Muskelzellen bewirkt. Zusätzlich besteht bei Diabetespatienten eine verminderte Prostazyklinproduktion (PGI<sub>2</sub>) der Endothelzellen [7]. PGI<sub>2</sub>, welches einen Gegenspieler von Thromboxan A<sub>2</sub> darstellt, hemmt zum einen die Thrombozytenadhäsion an Endothelzellen und wirkt zum anderen vasodilatatorisch. Stattdessen kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von Endothelin-1, das stark vasokonstriktorisch wirkt und darüberhinaus das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System stimuliert [1]. Über die Regulation des Transkriptionsfaktors NF-κB werden Gene aktiviert, die für zahlreiche Mediatoren der Atherosklerose kodieren. So kommt es zu einer Zunahme der Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen [1].

### **1.2.2. Dysfunktion vaskulärer glatter Muskelzellen**

Bei Diabetes findet sich eine Stimulation der Atherogenität glatter Muskelzellen [1]; zum einen über die Bildung freier Sauerstoffradikale [8] und zum anderen vermutlich über eine verstärkte Migration glatter Muskelzellen, welche bei Zellkulturen von Diabetes mellitus Typ 2 Patienten *in vitro* nachgewiesen werden konnte [9].

### **1.2.3. Thrombozytenfunktion bei Diabetikern**

Die Diabeteserkrankung geht mit einer gesteigerten Thrombozytenaktivierung einher, welche zur Ausbildung der Atherosklerose prädisponiert [10] [11]. Sie führt zu einer Vielzahl von Veränderungen der Thrombozytenfunktion, wozu eine beschleunigte Plättchen turn-over Rate [12] und eine erhöhte primäre und sekundäre Plättchenaggregation [13] [11] zählen.

Thrombozyten von Diabetespatienten besitzen eine verringerte Membranfluidität und weisen eine veränderte Ca<sup>2+</sup>-Hämostase mit Zunahme der intrazellulären Kalziummobilisation [14] auf, was sowohl den Aktivierungszustand der Thrombozyten als auch die Freisetzung wichtiger biologischer Substanzen beeinflusst [15]. Zu diesen Substanzen, die bei gesteigerter Thrombozytenaktivierung vermehrt freigesetzt werden, gehören unter anderem Thromboxan A<sub>2</sub>, β-

---

Thromboglobulin und Plättchen Faktor 4 [16] [17]. Sie fördern sowohl die Thrombozytenadhäsion als auch die Thrombozytenaggregation.

Die Hyperglykämie führt zu einer Abnahme der thrombozytären PGI<sub>2</sub>- und NO-Produktion [18] und zu einem Anstieg von freien Sauerstoffradikalen [19]. Dies verursacht neben einer zusätzlich gesteigerten Thromboxan A<sub>2</sub>-Synthese ein Ungleichgewicht zwischen thrombogenen und antithrombotischen Faktoren [20].

Thrombozyten von Diabetespatienten weisen eine vermehrte Expression aktivierungsabhängiger Adhäsionsmoleküle wie GPIIb-IIIa [21], P-Selektin und anderer Substanzen wie lysosomales GP53 [22] sowie eine erhöhte Sensitivität gegenüber Kollagen auf [23]. Dies trägt neben einer vermehrten Oberflächenexpression des Fibrinogenrezeptors [21] zu einer verstärkten Fibrinogenbindung und Aggreabilität bei. Über die Adhäsionsmoleküle wird darüber hinaus die Interaktion mit Leukozyten vermittelt, die eine wichtige Rolle bei der Mediation inflammatorischer Reaktionen im Bereich der Gefäßwand spielen.

### **1.3. Thrombozyten und Hämostase**

Das komplexe Hämostasesystem wird durch plasmatische, zelluläre und vaskuläre Anteile gewährleistet. Auf zellulärer Ebene sind es die Thrombozyten, die eine zentrale Rolle bei der primären Blutstillung spielen. Die Hämostase wird durch eine Gefäßwandläsion ausgelöst und nach ihrem zeitlichen Verlauf in primäre Hämostase, sekundäre Hämostase und Fibrinolyse unterteilt. Thrombozyten sind in der Lage, an subendotheliale Strukturen zu adhären und durch die Interaktion mit weiteren Blutplättchen einen primär hämostatischen Thrombus zu bilden. Nach Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade kommt es zur Bildung von Fibrin, welches zur Verfestigung des fragilen Plättchenaggregats führt (sekundärer hämostatischer Thrombus). Während der folgenden Heilungsphase wird ein Teil des hämostatischen Thrombus wieder abgebaut (Fibrinolyse). Alle an der Hämostase beteiligten Systeme besitzen sowohl pro- als auch antithrombotische Mechanismen, die sich physiologischerweise im Gleichgewicht befinden. Überwiegen prothrombotische Einflüsse, kommt es zur Thromboseneigung, im umgekehrten Fall wird das Auftreten von Blutungen begünstigt. Neben der physiologischen Blutstillung zum Schutz vor Blutverlusten, sind Thrombozyten an vielen pathophysiologischen Prozessen maßgeblich beteiligt, wie etwa der Atherosklerose und der Bildung akuter arterieller Thrombosen.

## 1.4. Morphologie und Physiologie der Thrombozyten

Die zellkernlosen Thrombozyten werden im Knochenmark aus Megakaryozyten gebildet. Ihre Anzahl im Blut beträgt 150 000 – 300 000 pro  $\mu\text{l}$ . Mit einem Durchmesser von 2-4  $\mu\text{m}$  und einer durchschnittlichen Oberfläche von 8  $\mu\text{m}^2$  im ruhenden Zustand sind sie die kleinsten korpuskulären Bestandteile des zirkulierenden Blutes. Im peripheren Blut beträgt ihre Überlebenszeit etwa 7 Tage bis sie schließlich im retikuloendothelialen System der Leber und Milz abgebaut werden. Ultrastrukturell lassen sich vier morphologische Bereiche des Thrombozyten unterscheiden [24]:

*Periphere Zone:* Sie besteht aus der Zytoplasmamembran und den verschiedenen darauf befindlichen Glykoproteinen, Proteinen und Mukopolysacchariden, welche zusammengenommen die Glykokalyx bilden. Die Zytoplasmamembran selbst besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht, in die Membranproteine eingelassen sind, welche Rezeptoren für Agonisten wie ADP, Thrombin oder spezielle Adhäsionsproteine sein können.

*Strukturelle Zone:* Dieser Bereich setzt sich aus verschiedenen Strukturproteinen zusammen, den submembranös gelegenen Mikrotubuli und den Aktin- und Myosinfilamenten. Diese Strukturproteine sind an der Formveränderung des ruhenden diskoiden Blutplättchens in die aktive Form mit Ausbildung von Pseudopodien und der Oberflächenvergrößerung beteiligt.

*Zone der Organellen:* Dazu gehören die im Zytoplasma vorkommenden Mitochondrien, der Golgi-Apparat, Ribosomen und plättchenspezifische Granula. Die Plättchengranula werden unterteilt in dichte Granula,  $\alpha$ -Granula und Lysosomen und dienen als Speicherort für Proteine und andere Substanzen, die für die Plättchenfunktion essentiell sind (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1 – Inhaltsstoffe thrombozytärer Speichergranula**

Dichte Granula:	$\alpha$ -Granula:	Lysosom:
ATP	<b>adhäsive Proteine</b>	$\alpha$ -Arabinoside
ADP	Fibrinogen	$\beta$ -Galactoside
$\text{Ca}^{2+}$	Von-Willebrand-Faktor	$\beta$ -Glucuronidase
Serotonin	Glykoprotein IIb-IIIa	N-Acetylglucosaminidase
Phosphat	<b>Wachstumsfaktoren</b>	Elastase
Guaninnukleotide	PDGF	Kollagenase
	TGF- $\beta$	Kathepsin
	<b>Zytokinähnliche Proteine</b>	

	PF 4 β-Thromboglobulin	
--	---------------------------	--

PDGF = Platelet derived growth factor

TGF-β = Transforming growth factor-β

PF-4 = Plättchenfaktor 4

*Membransystem:* Das Membransystem setzt sich aus dem offenen kanalikulären System („surface connected open canalicular system“, SCS) und dem dichten tubulären System („dense tubular system“, DTS) zusammen. Das SCS ist über Kanäle mit der Plasmamembran verbunden und bietet zusätzliche Membrankapazität bei Aktivierung und Oberflächenvergrößerung. Darüberhinaus können Granula durch Verschmelzung mit dem SCS ihre Inhaltsstoffe in den Extrazellulärraum abgeben. Das DTS, ein Abkömmling des rauhen endoplasmatischen Retikulums, ist einer der Hauptspeicherorte für freie Kalziumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ), welche ab einer bestimmten Konzentration im Zytoplasma Formveränderung und Degranulierung des Thrombozyten auslösen.

#### 1.4.1. Adhäsion

Der erste Schritt der primären Hämostase vollzieht sich durch die Adhäsion ruhender Blutplättchen an die verletzte Gefäßwand. Dies wird auch als primäre Adhäsion bezeichnet (Abb. 1).

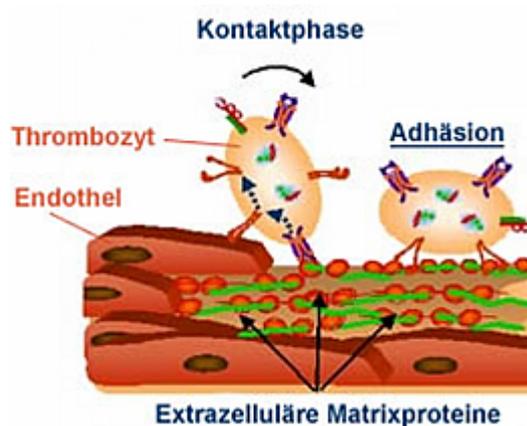
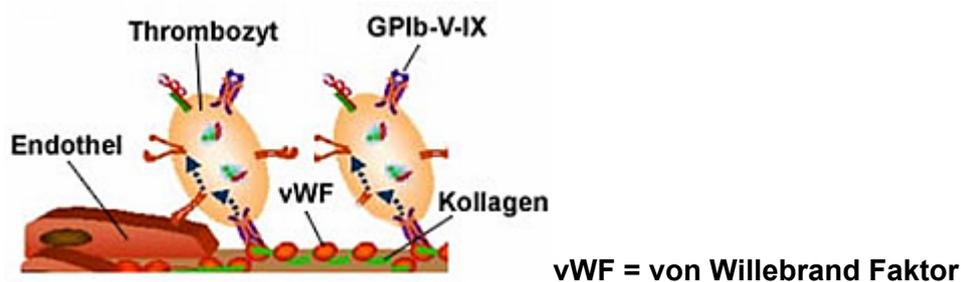


Abb. 1 – **Kontaktphase und Adhäsion von Thrombozyten als Teil der primären Hämostase.** Die Interaktion von Thrombozyten mit dem Endothel wird über extrazelluläre Matrix- und thrombozytäre Membranglykoproteine vermittelt (Quelle modifiziert nach: [http://www.med.monash.edu.au/medicine/box\\_hill/research/blood-platelet.html](http://www.med.monash.edu.au/medicine/box_hill/research/blood-platelet.html))

Die Anlagerung schon aktivierter Blutplättchen an subendotheliale Strukturen wird sekundäre Adhäsion genannt. Es kommt neben Formveränderung, Spreizung und Aktivierung der adhären Plättchen zur Freisetzung von Granulainhaltsstoffen. Der Adhäsionsvorgang wird durch thrombozytäre Membranglykoproteine vermittelt (Abb. 2). Hierbei spielt der von-Willebrand-Faktor eine zentrale Rolle. Dieses Strukturprotein der extrazellulären Matrix, das im Bereich des Subendothels an Kollagen gebunden ist, wird durch die Gefäßverletzung freigelegt und ermöglicht die Bindung von zirkulierenden Blutplättchen über das Glykoprotein Ib-V-IX (Kontaktphase).



**Abb. 2 – Bindung zirkulierender Thrombozyten über das Glykoprotein Ib-V-IX an den freiliegenden von-Willebrand Faktor.** (Quelle modifiziert nach: [http://www.med.monash.edu.au/medicine/box\\_hill/research/blood-platelet.html](http://www.med.monash.edu.au/medicine/box_hill/research/blood-platelet.html))

Das thrombozytäre membranständige Adhäsionsmolekül GPIb-V-IX besitzt eine hohe Affinität zum vWF und ermöglicht damit auch in Gefäßgebieten mit hohen Scherkräften eine Adhäsion an die Gefäßwand. Die zusätzliche Stabilisierung dieser Bindung wird über weitere membranständige Adhäsionsrezeptoren wie Kollagen-, Fibronectin- und Lamininrezeptoren hergestellt (Phase der Stabilisierung). Für die Formveränderung (shape change) ist insbesondere die Bindung des thrombozytären Kollagenrezeptors  $\alpha 2\beta 1$  an Kollagen verantwortlich (Phase der Aktivierung). Es kommt zu einer Oberflächenvergrößerung des Thrombozyten und zur Ausbildung von Pseudopodien, um die Gefäßläsion effektiv abzudichten. Über die Freisetzung des Arachidonsäuremetaboliten Thromboxan A<sub>2</sub> aus den adhären und aktivierten Thrombozyten in den Extrazellulärraum und die Bindung an spezifische Thromboxanrezeptoren kommt es zur Aktivierungsverstärkung. TXA<sub>2</sub> wirkt vasokonstriktorisch und begünstigt somit die Thrombusbildung. Weitere Granulainhaltsstoffe werden sezerniert und wirken teils autokrin über eine Aktivierungsverstärkung und teils parakrin über eine Stimulation ruhender Thrombozyten (Sekretion). Adhärente Thrombozyten sind in der Lage, ruhende Thrombozyten aus der Zirkulation zu rekrutieren und zu aktivieren. Diese Interaktion erfolgt über den GPIIb-IIIa Rezeptor. Es kommt zur Aggregation der Blutplättchen untereinander. Wenn die Thrombozyten

vollkommen über dem Subendothel ausgespreizt sind und damit die Endothelläsion abdichten, ist die Adhäsionsphase beendet.

### 1.4.2. Aggregation

Als Aggregation bezeichnet man den Vorgang der Koadhäsion von Thrombozyten untereinander. Auch hier wird eine primäre von einer sekundären Aggregation unterschieden. Thrombozyten binden nicht direkt untereinander. Vielmehr wird diese Bindung indirekt über ein Überbrückungsprotein, das Fibrinogen, vermittelt. Fibrinogen (Abb. 3) ist ein multivalentes Adhäsionsmolekül, das aus einer zweifach angelegten  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette besteht, die sich zu einem Homodimer paaren.

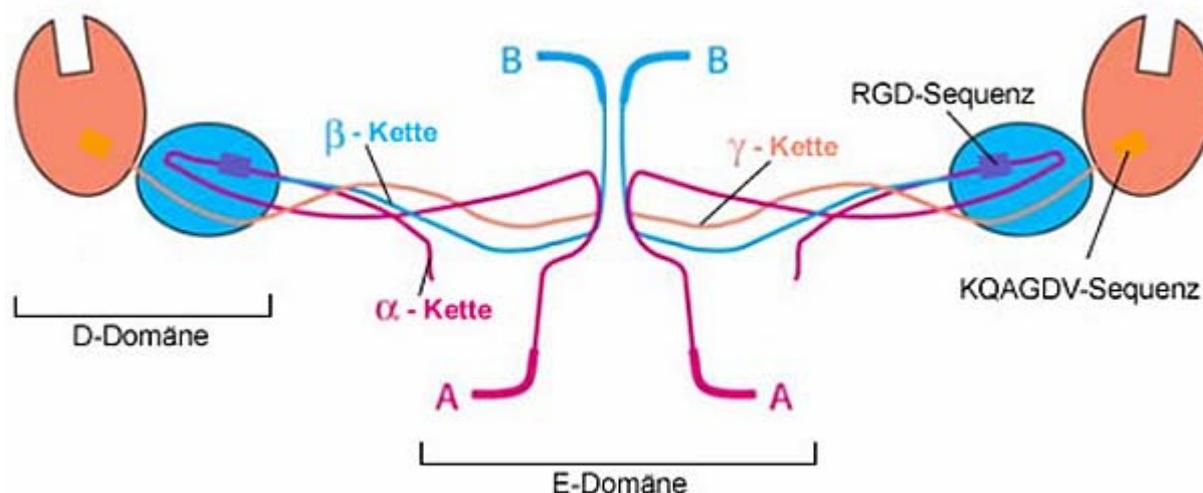


Abb. 3 – **Schematische Darstellung zum Aufbau des Fibrinogenmoleküls.** Sowohl die RGD- als auch KQAGDV-Sequenz sind spezifische Sequenzen, die vom GPIIb-IIIa erkannt werden können. (Quelle modifiziert nach:

<http://oregonstate.edu/instruction/bb450/stryer/ch10/Slide51.jpg>)

Die Bindung zum Fibrinogen kommt über den thrombozytären Fibrinogenrezeptor GPIIb-IIIa zustande und erfordert zudem noch die Anwesenheit von Kalziumionen. Nur aktivierte Thrombozyten sind in der Lage, lösliches Fibrinogen zu binden. Durch die Aktivierung von Thrombozyten durch Agonisten wie ADP, Thrombin, Thromboxan A<sub>2</sub> oder Adrenalin werden unterschiedliche zelluläre Signalkaskaden ausgelöst. Hierbei kommt es unter anderem zu einer Konformationsänderung des GPIIb-IIIa Rezeptors, mit der Folge, dass lösliches Fibrinogen an spezifische Erkennungssequenzen binden kann. Über diese Fibrinogenbindung wird die Ausbildung weiterer Plättchenaggregate ermöglicht [25] (Abb. 4).

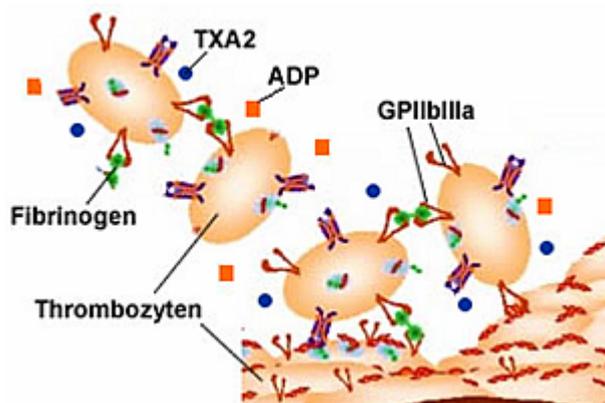


Abb. 4 – Ausbildung von Plättchenaggregaten durch Bindung von Fibrinogen an GPIIb-IIIa. (Quelle modifiziert nach: [http://www.med.monash.edu.au/medicine/box\\_hill/research/blood-platelet.html](http://www.med.monash.edu.au/medicine/box_hill/research/blood-platelet.html))

Zudem werden Substanzen freigesetzt, die die Interaktion von Thrombozyten untereinander und mit dem Gefäßendothel fördern [26] [27]. Einen Überblick über wichtige Substanzen und deren Bedeutung gibt Tabelle 2:

**Tabelle 2 – Biologische Substanzen und ihre hämostaseologische Bedeutung**

ADP	Intrazelluläre Kalziumfreisetzung Shape change Aktivierung des GPIIb-IIIa Rezeptors
Ca <sup>2+</sup> (als third messenger und extrazelluläres Ion)	Shape change Fibrinogenbindung Degranulierung
Thrombin	Thrombozytenaktivierung Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin
Thromboxan A2, Serotonin	Vasokonstriktion, Zellaktivierung

In der primären Phase der Aggregation ist die Blutplättchenbindung über Fibrinogenbrücken noch reversibel. Erst in einem Zeitverlauf von 10-30 Minuten kommt es dann zu einer irreversiblen Stabilisierung der Fibrinogenbindung an den GPIIb-IIIa Komplex. Damit ist die sekundäre Phase der Aggregation abgeschlossen. Nun beginnt die sekundäre Hämostase mit der Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade und der Bildung von Thrombin und Fibrin.

Der komplette Prozess der primären Hämostase soll in einer Übersichtsgrafik noch einmal veranschaulicht werden (Abb. 5).

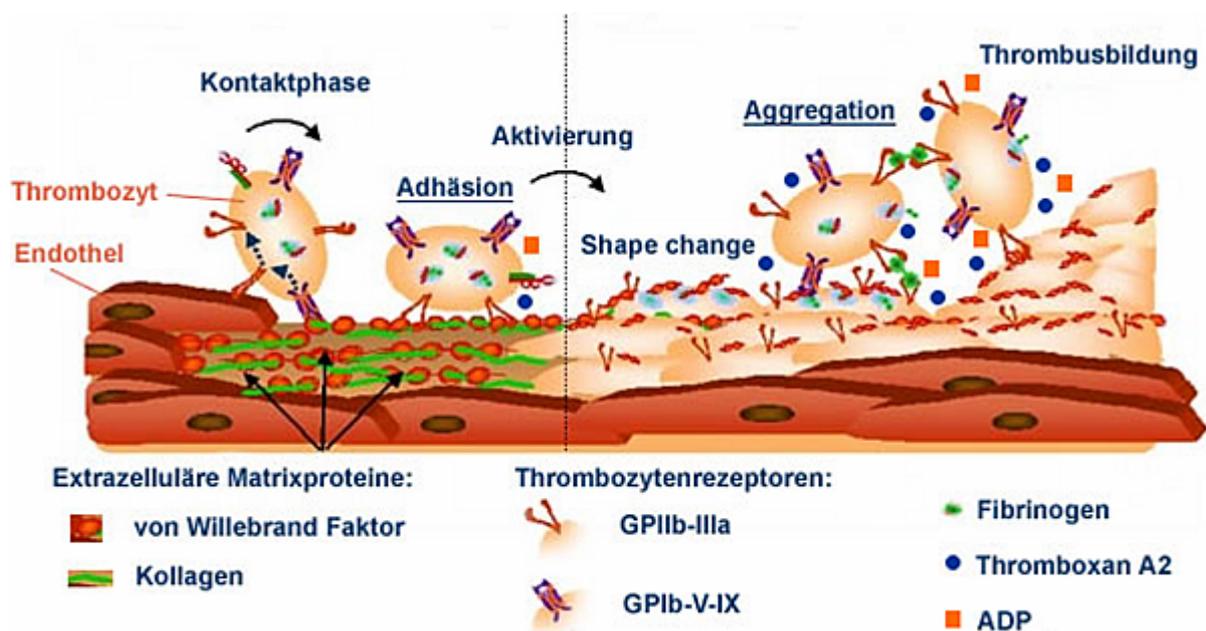


Abb. 5 – Zusammenfassende Darstellung von Adhäsion und Aggregation mit anschließender Thrombusbildung. Nach Adhäsion zirkulierender Thrombozyten im Bereich des verletzten Endothels kommt es zu deren Aktivierung, was eine Formänderung bewirkt und die Bindung von Fibrinogen ermöglicht. Über die Bildung von Fibrinogenbrücken kommt es zur Plättchenaggregation, was schließlich zur Thrombusbildung führt. (Quelle modifiziert nach: [http://www.med.monash.edu.au/medicine/box\\_hill/research/blood-platelet.html](http://www.med.monash.edu.au/medicine/box_hill/research/blood-platelet.html))

### 1.4.3. Interaktion aktivierter Thrombozyten mit anderen Zellen

Neben homotypischen Kontakten interagieren Thrombozyten mit einer Vielzahl nicht-thrombozytärer, vaskulärer Zellen. Dazu zählen vor allen Dingen Leukozyten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen.

Eine wichtige Rolle bei der Vermittlung solcher Zellinteraktionen spielen die aus den  $\alpha$ -Granula freigesetzten zytokinähnlichen Substanzen, wie  $\beta$ -Thromboglobulin, PF-4 und RANTES [28] [29] [30]. Sie wirken unter anderem chemotaktisch auf Leukozyten und bewirken deren Aktivierung. Leukozyten tragen ihrerseits durch Auslösung prokoagulatorischer Prozesse zur Thrombusbildung bei [31].

Daneben werden durch Wachstumsfaktoren wie dem „platelet derived growth factor“ (PDGF) und dem „transforming growth factor  $\beta$ “ (TGF-  $\beta$ ), die ebenfalls durch Thrombozyten sezerniert werden, Umbauvorgänge an der Gefäßwand initiiert. Diese fördern die Proliferation von Fibroblasten und glatten Muskeltzellen [32]. Thrombozyten sind nicht nur im Stande, an

---

subendotheliale Matrix zu adhären. Sie können bei pathophysiologischen Bedingungen auch an Endothelzellen mit veränderten adhäsiven Eigenschaften binden. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) und CD40-Ligand (CD40-L) gehören zu den Substanzen, die bei der Aktivierung von Thrombozyten in das Blutplasma abgegeben bzw. vermehrt exprimiert werden [33] [34]. Sie vermitteln unter anderem eine Alteration des Endothels und ermöglichen damit die Adhäsion von Thrombozyten an Endothelzellen [35] [36]. Im folgenden Kapitel soll auf die für die Thrombozytenfunktion wichtigen Membranglykoproteine näher eingegangen werden.

## **1.5. Thrombozytäre Membranglykoproteine**

Das Zusammenspiel von Thrombozyten, Endothelzellen und plasmatischen Gerinnungsfaktoren bei der Hämostase wird durch zahlreiche unterschiedliche Adhäsionsrezeptoren reguliert. Durch sie werden die Aktivierung, die Adhäsion und die Aggregation vermittelt. Thrombozyten besitzen auf ihrer Oberfläche Membranglykoproteine, die anhand der Molekülstruktur in vier Gruppen unterteilt werden können: Dazu gehören die Integrine, die leuzinreichen Glykoproteine, die Selektine und die Rezeptoren vom Immunglobulin Typ.

### **1.5.1. Integrine**

Integrine sind nichtkovalent verbundene Heterodimere, bestehend aus einer  $\alpha$ -Kette und einer  $\beta$ -Kette. Wichtigster Vertreter dieser Gruppe ist das Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (Fibrinogenrezeptor), welches nach seiner elektrophoretischen Klassifizierung auch GPIIb-IIIa genannt wird.

#### **1.5.1.1. Der GPIIb-IIIa-Integrinrezeptor ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3)**

Das GPIIb-IIIa wird ausschließlich von Thrombozyten und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. Auf der Blutplättchenoberfläche befinden sich rund 60 000 - 100 000 dieser Rezeptoren, etwa 80 %. Die anderen 20% der GPIIb-IIIa-Komplexe sind in den  $\alpha$ -Granula und dem offenen kanalikulären System gespeichert, welche bei Aktivierung der Thrombozyten an die Zelloberfläche translozieren [37] und damit die Rezeptordichte erhöhen können. Die zentrale Funktion des GPIIb-IIIa besteht in der Bindung von löslichem Fibrinogen. Dies ermöglicht die Bildung von Fibrinogenbrücken zwischen den Thrombozyten und führt dadurch zu deren Aggregation.

Bezüglich des GPIIb-IIIa Rezeptors werden zwei verschiedene Funktionszustände unterschieden. Auf ruhenden zirkulierenden Thrombozyten befindet sich der GPIIb-IIIa-Rezeptor zunächst in einem niedrigaffinen Zustand. Nach Aktivierung von Thrombozyten kommt es zu einer Konformationsänderung des GPIIb-IIIa-Rezeptors in einen hochaffinen Funktionszustand [38]. Diese Konformationsänderung kann beispielsweise nach Bindung von Thrombin oder ADP

---

an ihren entsprechenden thrombozytären Membranrezeptoren über intrazelluläre Signalwege induziert werden, was als „Inside-Out signaling“ bezeichnet wird. Durch diese Affinitätsmodulation wird die effektive Bindung von löslichem Fibrinogen an die Thrombozytenoberfläche ermöglicht (ligandenbesetzter Funktionszustand).

Der GPIIb-IIIa Rezeptor erkennt eine im Fibrinogenmolekül enthaltene RGD-(Arg-Gly-Asp)Sequenz, welche eine Ligandenbindung an die  $\beta_3$  –Untereinheit des GPIIb-IIIa vermittelt [38] [39]. Eine weitere wichtige Signalsequenz ist die KQAGDV-Sequenz am aminoterminalen Ende der  $\gamma$ -Kette des Fibrinogenmoleküls.

Die Ligandenbindung führt zu einer Expression zuvor kryptischer Epitope, die als ligandeninduzierte Bindungsstellen (LIBS) bezeichnet werden [38]. Dieser ligandenbesetzte Funktionszustand ist an der irreversiblen Fibrinogenbindung beteiligt.

Die Bindung von Fibrinogen an den GPIIb-IIIa Rezeptor löst eine intrazelluläre Signalkaskade („Outside-In signaling“) aus, welche die Stabilisierung der Thrombozytenaggregate, die Degranulation intrazellulärer Speicherstoffe und die Formänderung der Plättchen reguliert [40] [41].

Darüber hinaus ist der GPIIb-IIIa Rezeptor in der Lage, die Adhäsion von Thrombozyten an die intakte Endothelzellschicht zu vermitteln [42] [43] [44]. Dies geschieht durch eine Brückenbildung zwischen verschiedenen adhäsiven Proteinen, wie GPIIb-IIIa, Fibrinogen und speziellen endothelialen Rezeptoren wie dem „intracellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) und dem  $\alpha\beta_3$ -Integrin (Vitronektinrezeptor) [42].

Nach Adhäsion von Blutplättchen an Endothelzellen konnte in vitro eine inflammatorische Reaktion nachgewiesen werden, die mit einer Zunahme der adhäsiven Eigenschaften und erhöhter proteolytischer Aktivität der Endothelzellen einhergehen [34].

Neben dem GPIIb-IIIa-Integrinrezeptor existieren eine Reihe spezieller Rezeptoren für Kollagen, Laminin und Fibronectin, die als thrombozytäre  $\beta_1$ -Integrine an der primären Adhäsion und Aktivierung der Blutplättchen beteiligt sind.

---

### 1.5.2. Leuzinreiche Glykoproteine

Zu den wichtigsten Vertretern dieser Gruppe gehört der Glykoprotein-Ib-V-IX-Komplex. Es handelt sich um den Adhäsionsrezeptor für den von-Willebrand-Faktor, der in der Kontaktphase die Bindung zirkulierender Thrombozyten an in Kollagen immobilisierten vWF herstellt. Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung des Thrombozyten. Der GPIb-V-IX-Komplex kann darüber hinaus ähnlich wie das GPIIb-IIIa eine Bindung an intakte Endothelzellen vermitteln, welche im dysfunktionellen Zustand vermehrt P-Selektin und vWF exprimieren [36]. Ein Defekt dieses Rezeptors führt beim Bernard-Soulier Syndrom zu einer erhöhten Blutungsneigung.

### 1.5.3. Selektine

Selektine weisen in ihrer Molekülstruktur eine extrazelluläre Lektindomäne mit einer benachbarten „Epidermal growth factor-like“-Domäne auf [45]. Diese vermitteln verschiedene Interaktionen zwischen Zellen, insbesondere die Adhäsion zirkulierender Zellen an Endothel. Wichtig ist hierbei E-Selektin, welches von zytokinaktivierten Endothelzellen exprimiert wird, L-Selektin, das konstitutiv auf Leukozyten vorkommt und schließlich P-Selektin. P-Selektin (PADGEM, CD62P) ist sowohl in den  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten als auch in den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen gespeichert und wird erst nach Aktivierung auf deren Zelloberfläche exprimiert. Es spielt unter physiologischen Bedingungen eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten und der Interaktion zwischen Thrombozyten, Endothelzellen und Leukozyten und ist sowohl an der Thrombusstabilisierung [31] als auch an vaskulären Reparaturvorgängen beteiligt. Zusätzlich werden inflammatorische Reaktionen induziert.

### 1.5.4. Immunglobulin-Typ

Zu dieser Gruppe gehört zum einen das PECAM-1 (Platelet-endothelial cell adhesion molecule), das eine Plättchenadhäsion an das Subendothel ermöglicht und zum anderen das ICAM-2 (intercellular adhesion molecule-2), welches eine Bedeutung für die thrombozytenvermittelte Inflammation und die Adhäsion von Thrombozyten an Leukozyten besitzt.

Ein weiterer Vertreter dieser Gruppe ist das GP53 (CD63), welches nur nach Aktivierung des Thrombozyten aus den Lysosomen sezerniert wird und strukturelle Ähnlichkeiten mit lysosomalen integralen Membranproteinen besitzt (LIMPs) [46].

Außer den genannten Membranglykoproteinen gibt es noch eine Anzahl weiterer Membranglykoproteine, die anderen Proteinfamilien als den bisher erwähnten angehören. Dazu gehört das CD40L-Protein, welches eine Rolle bei der Initiation inflammatorischer Reaktionen

---

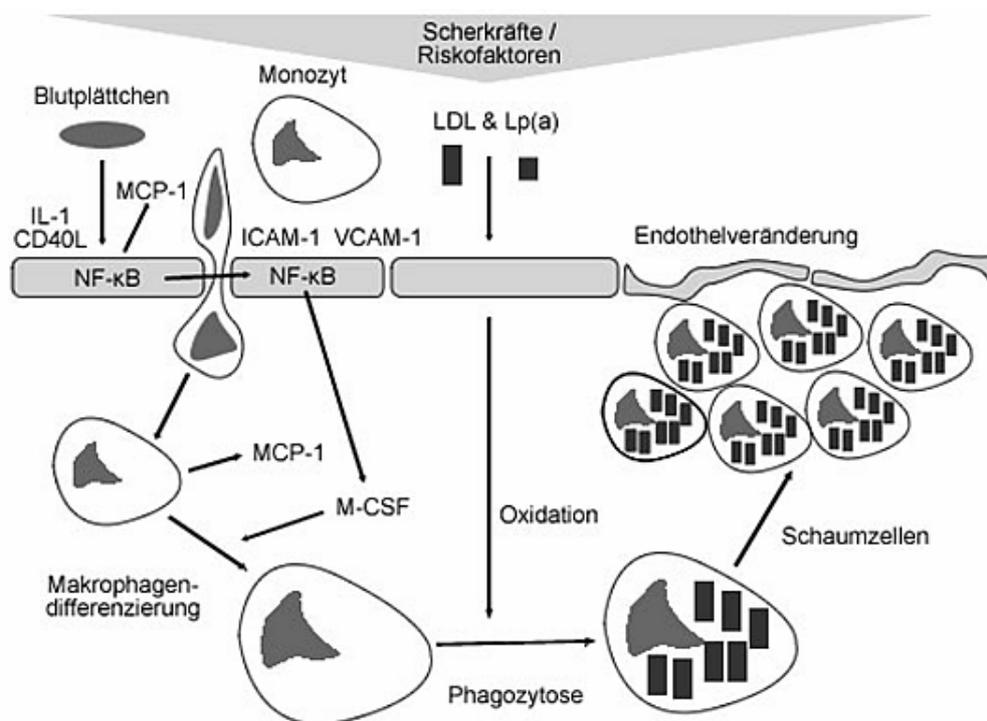
am Endothel spielt [33]. Es handelt sich um ein heterotrimeres Membranprotein aus der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie [47] und konnte zunächst auf verschiedenen Immunzellen nachgewiesen werden. Über 95% der CD40L Gesamtmenge befindet sich allerdings in Thrombozyten [47]. Erst nach Plättchenstimulation kommt es zu einer verstärkten Expression von CD40L an der Zelloberfläche [33] [48]. Es stimuliert die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 und moduliert somit die Leukozyten-Endothel-Interaktion. Darüber hinaus fördert es die Degranulation von Thrombozyten [34] und die Stabilisierung der Plättchenaggregation durch Beeinflussung des Fibrinogenrezeptors [49]. Lösliches CD40L stellt bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung einen Risikofaktor für das Auftreten eines akuten Koronarsyndroms dar [50].

### **1.6. Atherosklerose und Thrombozyten**

Atherosklerose ist eine systemische inflammatorische Erkrankung, die durch eine Akkumulation von Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten in die Intima großer Arterien mit Beteiligung von Thrombozyten charakterisiert ist [51]. Es kommt zu herdförmigen Ansammlungen von Kohlenhydraten, Lipiden und Kalziumablagerungen mit Veränderung der Arterienmedia. Zu den klinischen Manifestationen dieser chronisch-progredient verlaufenden Arterienerkrankung gehören die koronare Herzerkrankung, der Schlaganfall und die periphere arterielle Verschlusskrankheit. Die koronare Herzerkrankung als eine der wichtigsten Folgekomplikationen der Atherosklerose hat sich weltweit zur Haupttodesursache mit steigender Tendenz bezüglich Morbidität und Mortalität entwickelt [52].

Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle in der Atherogenese und der Entwicklung ischämischer Komplikationen [51] [53]. Diese sind an den pathophysiologischen Vorgängen, die zur Atherosklerose führen, auf unterschiedliche Weise beteiligt (Abb. 6). Während der Adhäsion werden Plättchen aktiviert und beginnen damit, zahlreiche bioaktive Substanzen wie proinflammatorische Zytokine, Chemokine (z.B. IL-1 $\beta$ , MCP-1) und CD40 Ligand zu sezernieren [36]. Dies führt unter anderem zu einer Rekrutierung zirkulierender Entzündungszellen, besonders von Lymphozyten und Monozyten in das endotheliale Läsionsgebiet im Bereich der arteriellen Intima [54]. Stimulierte Plättchen induzieren die Expression und Sekretion leukozytärer Zytokine und fördern den „oxidativen Burst“ (Ausstoßung oxidierender Substanzen) von neutrophilen Granulozyten [55]. Zusätzlich werden aus den  $\alpha$ -Granula der Blutplättchen verschiedene Wachstumsfaktoren ausgeschüttet, wie etwa platelet-derived growth factor (PDGF) und transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [56], wodurch das Wachstum und die Migration glatter Muskelzellen angeregt wird [54]. Das von aktivierten Thrombozyten exprimierte

CD40L trägt ebenfalls zur Progression der Atherosklerose bei [33]. Es bewirkt die Freisetzung von Chemokinen und die Expression der Adhäsionsfaktoren ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin durch Endothelzellen [33]. Lösliches CD40L sorgt neben der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus vaskulären Zellen [47] und der Stabilisierung plättchenreicher Thromben für eine Inhibition der Reendothelialisierung verletzter Gefäße [57]. Daraus resultiert eine vermehrte Intimaproliferation in Bereichen erhöhter Plättchenaktivität [51]. Die hier vorgestellten Aspekte sind ein Teil der bisherigen Erkenntnisse und Vorstellungen über das zelluläre Zusammenwirken bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose. Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen und die sich damit eröffnenden Therapiemöglichkeiten sind Gegenstand der derzeitigen Forschung.



IL-1= Interleukin-1

MCP-1 = Monocyte chemoattractant protein-1

M-CSF = Macrophage colony-stimulating factor

NF-κB = Nuclear factor kappa B

ICAM-1 = Intercellular adhesion molecule-1

VCAM-1 = Vascular cell adhesion molecule-1

LDL = Low-density lipoprotein

Lp(a) = Lipoprotein (a)

**Abb. 6 – Atherosklerose und Thrombozyten.** Die Interaktion von Thrombozyten und Endothelzellen führt über proinflammatorische Transkriptionsfaktoren wie NF-κB zu einer

---

*vermehrten Expression von endothelialen Adhäsionsrezeptoren und zur Freisetzung prothrombotischer Interleukine und Chemokine. Dies begünstigt unter anderem die Migration von Monozyten und damit die Atherogenese und die Progression der Atherosklerose (Quelle modifiziert nach Gawaz, Meinrad, „Das Blutplättchen“, Georg Thieme Verlag, 1999)*

## **1.7. Bildgebung der Atherosklerose mit Hilfe der B-Mode Sonografie**

### **1.7.1. Ultraschall**

Die Ultraschalluntersuchung ist ein nicht-invasives, kostengünstiges und hochauflösendes Bildgebungsverfahren, welches eine herausragende Bedeutung bei der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung atherosklerotischer Gefäßveränderungen besitzt. Über die Visualisierung atherosklerotischer Prozesse im Bereich der arteriellen Gefäßwand, angefangen von frühen Veränderungen bis zum vollständigen Verschluss einer Arterie, liefert sie Informationen in Bezug auf die Intima-Media-Dicke, die Plaquelast, den Plaquetyp, Kalzifikationen und den Gefäßdurchmesser [58] [59] [60] [61]. Neben der Detektion präsymptomatischer Läsionen kann auch eine direkte Quantifizierung atherosklerotischer Veränderungen wie Plaques, Stenosen und die Zunahme der Intima-Media Dicke vorgenommen werden [58] [62] [59].

Die Atherosklerose betrifft zunächst die Intima, jedoch kann aufgrund technischer Voraussetzungen die B-Mode Sonografie bei der Bildgebung nicht zwischen der Intima und der Media diskriminieren. Daher stellt die präzise Messung der Intima-Media Dicke mit Abstand den wichtigsten Ultraschallparameter zur Beurteilung der Atheroskleroseprogression dar, welche erstmals 1986 zur Erfassung atherosklerotischer Veränderungen der Aorta vorgestellt wurde [58]. Dabei konnte anhand histologischer Präparate der Aorta gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen der per Ultraschall gemessenen Intima-Media-Dicke und der lichtmikroskopisch gemessenen Wanddicke besteht [58]. Im Laufe der Zeit wurde dann die Carotisarterie das Standardgefäß zur Bestimmung der Intima-Media-Dicke. Diese ist nicht nur geeignet wegen ihrer Größe und relativ geringer Bewegung, sondern auch, weil sie oberflächlich liegt und dadurch mit hoher Auflösung (8 Mhz Schallkopf) dargestellt werden kann. Seitdem wird die Messung der Intima-Media Dicke in Studien genutzt, um sowohl Frühstadien atherosklerotischer Veränderungen als auch Progression und Regression der Atherosklerose zu untersuchen.

Auch die Koronarangiografie bietet die Möglichkeit, eine Progression der Atherosklerose festzustellen. Sie kommt jedoch in der Regel erst zum Einsatz, wenn bei Patienten bereits

---

Symptome einer kardiovaskulären Erkrankung aufgetreten sind. Im Gegensatz zur B-Mode-Sonografie kann bei der Angiografie ausschließlich das Gefäßlumen dargestellt werden, wobei ein enger Zusammenhang zwischen Veränderungen des koronaren Gefäßdurchmessers und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse besteht. Deshalb können meist nur weit fortgeschrittene atherosklerotische Veränderungen erkannt werden. Eine Abschätzung von Veränderungen der Gefäßwand ist nur indirekt möglich [63]. Die B-Mode Sonografie weist in dieser Hinsicht neben Non-Invasivität und Kostengünstigkeit einen wesentlichen Vorteil gegenüber der risikobehafteten Angiografie auf, da sie eine präzise Darstellung der kompletten arteriellen Gefäßwand erlaubt. Dadurch können bereits im Frühstadium atherosklerotische Wandveränderungen, ausgelöst durch Endothelläsionen und inflammatorische Prozesse, detektiert und genau quantifiziert werden. Aus diesem Grund wird die B-Mode Sonografie auch dazu eingesetzt, um in Studien Effekte einer therapeutischen Intervention zur Prävention von Atheroskleroseprogression und kardiovaskulärer Erkrankungen zu untersuchen [64].

## 2. Zielsetzung

Die koronare Herzerkrankung und die damit verbundenen Komplikationen wie stumme Ischämien und Myokardinfarkt sind die häufigste Todesursache bei Diabetikern. Dies ist unter anderem auf eine beschleunigte Atherosklerose und auf ein erhöhtes Risiko für thromboembolische Komplikationen zurückzuführen. In experimentellen Studien wurden bei Diabetespatienten sowohl auf plasmatischer als auch auf zellulärer Ebene pathophysiologische Veränderungen nachgewiesen, die zur Atherosklerose beitragen könnten [6] [54] [65] [10]. Dazu zählen eine Dysfunktion von Endothel- und glatten Muskelzellen, ein Ungleichgewicht des fibrinolytischen Systems und eine gesteigerte Thrombozytenaktivierung. Thrombozyten spielen eine wesentliche Rolle in der Genese der akzelerierten Atherosklerose. Zum einen werden nach Kontakt aktivierter Thrombozyten mit der Endotheloberfläche proinflammatorische Substanzen, wie Chemokine und Zytokine, freigesetzt. Diese führen zu einer Aktivierung von Endothelzellen und zur Rekrutierung von Entzündungszellen [36] [54]. Zum anderen sind aktivierte Thrombozyten in der Lage, die adhäsiven und chemotaktischen Eigenschaften des Endothels zu verändern und die Monozytenmigration zu begünstigen [36] [33]. Bisher ist jedoch unklar, ob auch bei Diabetespatienten aktivierte Thrombozyten zur Progression der Atherosklerose beitragen.

Daher ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, zur Klärung der folgenden Fragen beizutragen:

1. Welche Bedeutung hat die Thrombozytenaktivierung auf die Progression der Atherosklerose, gemessen als Zunahme der Intima-Media-Dicke innerhalb eines Jahres bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2?
2. Stellt die Thrombozytenaktivierung (Expression aktivierungsabhängiger Antikörper: CD62P, CD63, CD40L, PAC-1) einen unabhängigen prognostischen Prädiktor für die Zunahme der Intima-Media Dicke dar?
3. Welchen Einfluss hat die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion auf die Progression der Atherosklerose bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2?

### 3. Patienten und Methodik

#### 3.1. Patientenuntersuchung

##### 3.1.1. Beschreibung der Studienpopulation

In dieser prospektiven Studie wurden die Thrombozytenaktivierung und die Progression der Atherosklerose bei 172 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 untersucht, welche sich zwischen November 2001 und Februar 2003 im Rahmen regelmäßiger Kontrolluntersuchungen und zur Therapieoptimierung in der Diabetischen Tagesklinik der Charité- Campus Virchow Klinikum vorstellten. Es handelte sich dabei um eine Studienpopulation, die auf Grund des ausgeprägten Risikoprofils und des schnelleren Voranschreitens der Atherosklerose gut geeignet war, um mögliche Effekte einer vermehrten Thrombozytenaktivierung zu studieren.

Die Definition für Diabetes mellitus Typ 2 richtete sich nach den von der WHO 1985 aufgestellten und veröffentlichten Kriterien [66] (Tab. 3). Für die Messung des Nüchtern-Blutzuckers musste der Patient eine Nahrungskarenz von 8 Stunden einhalten. Anschließend wurde die Glukose im Plasma bestimmt. Bei einem Plasma-Glukose-Wert  $\geq 126$  mg/dl wurde die Messung wiederholt. Wenn die zweite Messung ebenfalls einen Plasma-Glukose-Wert  $\geq 126$  mg/dl ergab, wurde die Diagnose Diabetes mellitus gestellt. Für den oralen Glukosetoleranz-Test wurde dem Patienten eine Testlösung mit 75 g Glukose verabreicht und eine Blutzuckerbestimmung nach 2 Stunden durchgeführt. Bei einem Plasma-Glukose-Wert  $\geq 200$  mg/dl lag ein Diabetes mellitus vor.

**Tabelle 3 – Diagnosekriterien für Diabetes mellitus (WHO)**

Stadium	Nüchtern-Plasma-Glukose	Gelegenheits-Blutzucker*	Oraler-Glukose-Toleranztest [67]
Diabetes mellitus	$\geq 126$ mg/dl ( $\geq 7,0$ mmol/l)	$\geq 200$ mg/dl ( $\geq 11,1$ mmol/l) und Symptome eines Diabetes mellitus	2-h Wert $\geq 200$ mg/dl ( $\geq 11,1$ mmol/l)

\* Gemessen im Plasma zu jeder Tageszeit, ohne Beziehung zu Mahlzeiten; Diabetessymptome sind Polyurie, Polydipsie und Gewichtsabnahme

In der folgenden Tabelle 4 sind die Kriterien für die Risikofaktoren arterieller Hypertonus, Hypercholesterinämie, Adipositas, Rauchen und positive Familienanamnese aufgeführt.

**Tabelle 4 - Risikofaktoren und Definitionen**

<b>Risikofaktor</b>	<b>Definition</b>
Hypertonus	Systolischer Blutdruck $\geq$ 140 mmHg und diastolischer Blutdruck $\geq$ 90 mmHg und / oder antihypertensive Therapie
Hypercholesterinämie	Gesamtcholesterin im Blut $\geq$ 200 mg/dl (5,17 mmol/l) und / oder Behandlung mit Statinen
Adipositas	Body mass index $>$ 30 kg/m <sup>2</sup> (BMI=Gewicht geteilt durch das Quadrat der Körpergröße)
Rauchen	Raucher bei Studienbeginn (mindestens 10 Zigaretten pro Tag)
Positive Familienanamnese	koronare Herzerkrankung bei einem Verwandten (Männer $<$ 55 Jahre, Frauen $<$ 65 Jahre) ersten Grades

Eine Mikroangiopathie wurde definiert als Vorhandensein einer diabetischen Retinopathie und/ oder diabetischen Nephropathie.

Diabetische Retinopathie: Die Diagnose einer diabetischen Retinopathie erfolgte durch einen Ophthalmologen und setzte voraus, dass bei der Untersuchung des Patienten zu Studienbeginn mindestens eine milde nicht-proliferative Retinopathie mit beginnenden Mikroaneurysmen vorlag.

Diabetische Nephropathie: Bei allen Patienten wurde die Albuminausscheidung zu Studienbeginn gemessen. Die diabetische Nephropathie wurde definiert, als Vorliegen einer Mikroalbuminurie (Albuminausscheidung von 20 – 200 mg/l) oder Makroalbuminurie (Albuminausscheidung  $>$  200 mg/l). Werte, die oberhalb der Norm lagen, wurden durch eine zweite Messung kontrolliert.

Eine Makroangiopathie lag vor, wenn eine symptomatische periphere arterielle Verschlusskrankheit bestand und / oder wenn in einer Koronarangiographie eine mindestens 50 %ige Stenose einer großen epikardialen Koronararterie nachgewiesen wurde.

Die Güte der Blutzuckereinstellung wurde über die Messung des HbA1c-Wertes ermittelt. Gemäß den "Consensus Guidelines" der "European IDDM Policy Group", welche auch bei

---

Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 angewendet werden können, ergab sich folgende Einteilung [68]:

- |                      |                                   |
|----------------------|-----------------------------------|
| a) HbA1c < 6,5 %     | = gute Blutzuckereinstellung      |
| b) HbA1c 6,5 – 7,5 % | = mäßige Blutzuckereinstellung    |
| c) HbA1c > 7,5 %     | = schlechte Blutzuckereinstellung |

Einschlusskriterien:

- Diabetes mellitus Typ 2, diagnostiziert anhand der WHO-Kriterien [66],
- Alter über 18 Jahre,
- Regelmäßige Vorstellung in der diabetischen Tagesklinik

Ausschlusskriterien:

- Einnahme von Clopidogrel, Ticlopidin, Dipyridamol oder anderer nicht-steroidaler Antiphlogistika mit Ausnahme von Acetylsalicylsäure
- Applikation von Heparin innerhalb von 24 Stunden vor Studienbeginn
- große chirurgische Eingriffe eine Woche vor Studienbeginn
- positive Familien- oder Eigenanamnese für bestehende Blutungsstörungen
- Thrombozytenzahl <  $150 \times 10^9/\mu\text{l}$  oder >  $450 \times 10^9/\mu\text{l}$
- Hämoglobin < 8 g/dl
- Myeloproliferative Erkrankungen oder eine medikamenteninduzierte Thrombozytopenie in der Vorgeschichte
- konsumierende Erkrankungen
- Malignome
- Alkoholabusus
- Diabetes mellitus als Folge einer endokrinen Pankreasinsuffizienz bei chronischer Pankreatitis

Alle Studienpatienten wurden durch den behandelnden Arzt aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis bezüglich der Studienteilnahme. Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Charité - Campus Virchow genehmigt.

---

Primärer Endpunkt:

Der primäre Endpunkt war die Progression der Atherosklerose, gemessen als Zunahme der Intima-Media-Dicke anhand unten stehender Berechnung: s. Kapitel 3.1.2.3 „Definition der Atheroskleroseprogression“.

Sekundäre Endpunkte:

- Koronare Intervention (PTCA, Stentimplantation) innerhalb des Follow-Up Intervalls
- Vaskuläre Ereignisse (zerebral , kardial und / oder peripher)
- Myokardinfarkt
- Bypass-Operation
- Apoplexie
- kardialer und nicht kardialer Tod

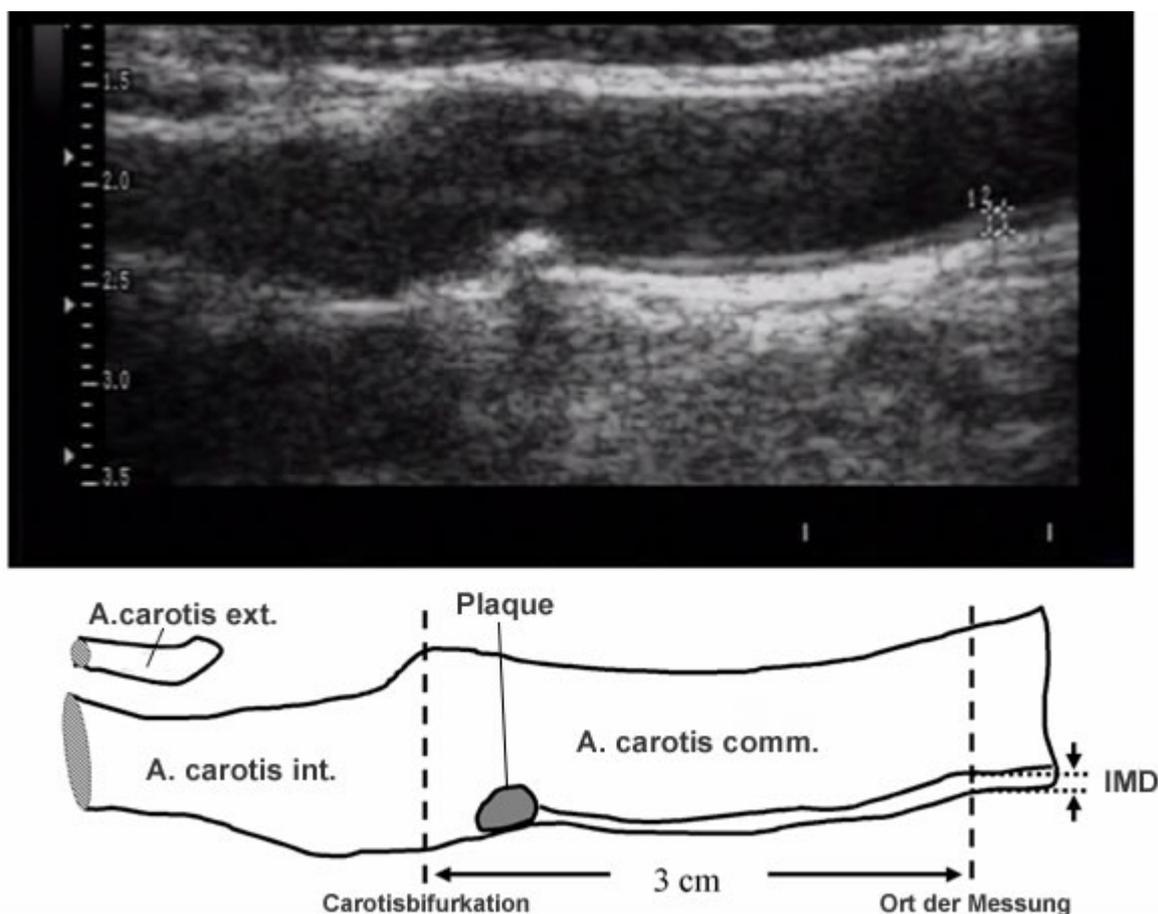
### **3.1.2. Carotis-B-Mode Sonografie**

#### **3.1.2.1. Bestimmung der Intima-Media-Dicke (IMD)**

Die Messung der Intima-Media-Dicke als eine geeignete Methode zur Erfassung atherosklerotischer Wandveränderungen der Gefäße wurde zuerst von Pignoli et al. vorgestellt [58]. Sie liefert in klinischen Studien reproduzierbare und valide Ergebnisse in Bezug auf Progression und Regression der Atherosklerose [69]. Ein Anstieg der IMD kann als ein frühes Zeichen der Atherogenese angesehen werden [70]. Sie stellt neben der Koronarangiografie einen anerkannten Surrogatmarker der Atheroskleroseprogression dar und ist darüber hinaus direkt mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert [71] [72] [73] [74]. Es besteht eine enge Korrelation zu anderen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Dyslipoproteinämie, Bluthochdruck, Diabetes und Rauchen [75] [76] [77] [78] [79]. Bei gesunden Erwachsenen liegt die Intima-Media Dicke etwa im Bereich von 0,25 bis 1,5 mm [80], wobei Werte >1,0 mm häufig schon als pathologisch betrachtet werden [69]. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die IMD altersabhängig eine lineare Zunahme aufweist [81] .

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 172 Patienten zweimal innerhalb eines Abstandes von 12 Monaten untersucht. Für die Messungen wurde ein Ultraschallgerät benutzt, das mit einem hochauflösenden 8-Mhz linear 2D Scanner ausgestattet war (System Five, GE-Vingmed, Solingen, Deutschland). Während der Untersuchung befanden sich die Patienten in Rückenlage. Zunächst wurde die Arteria carotis communis aufgesucht und dann die Intima-Media-Dicke an einem bestimmten Punkt, 30 mm proximal der Carotisbifurkation, unter der

Bedingung gemessen, dass dort keine kalzifizierten Plaques vorhanden waren. Bei Nachweis von kalzifizierten Plaques an dieser Stelle, wurde die Messung der IMD 25 mm proximal der Carotisbifurkation durchgeführt. Anschließend wurde aus drei Messwerten der Mittelwert für die IMD gebildet und die Bildaufnahmen digital gespeichert. Dem Untersucher, der die Ultraschallmessungen der IMD durchführte, waren die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung zur Thrombozytenfunktion unbekannt. Die Abbildung 7 soll die Messung der Intima-Media-Dicke veranschaulichen.



(IMD = Intima media Dicke)

**Abb. 7 – Ultraschallbild und schematische Darstellung zur Messung der Intima-Media Dicke.** Im Ultraschallbild erkennt man einen kalzifizierten Plaque (echoreiche Struktur mit Schallschatten) proximal der Carotisbifurkation. Intima und Media zusammen lassen sich als echodichte Struktur gut vom Gefäßlumen und den darunter liegenden Gewebeschichten abgrenzen. Der Messpunkt der Intima-Media Dicke liegt in der Arteria carotis communis und ist 30 mm von der Carotisbifurkation entfernt.

---

### **3.1.2.2. Intraobservervariabilität**

Für die Evaluation der Intraobservervariabilität eines Untersuchers wurde die Ultraschalluntersuchung bei den gleichen Patienten in einer Zeitspanne von maximal einem Monat zehnmal wiederholt. Hierbei ergab sich eine errechnete Intraobservervariabilität von  $0,03 \pm 0,02$  mm.

### **3.1.2.3. Definition der Atheroskleroseprogression**

Nach einem Jahr wurde bei den Patienten die IMD auf die gleiche Weise wie zu Beginn der Studie bestimmt. Um festzustellen, ob eine Progression der Atherosklerose vorlag oder nicht, wurde die  $\Delta$ IMD mit Hilfe folgender Berechnung ermittelt:

Die Messungen der IMD rechts und links zu Studienbeginn und die Messungen der IMD rechts und links nach einem Jahr wurden bei einem Patienten jeweils addiert. Die Summe der bilateralen IMD zu Studienbeginn wurde dann von der Summe der bilateralen IMD nach einem Jahr subtrahiert. Dies ergab die Differenz  $\Delta$ IMD. Eine  $\Delta$ IMD > 0 zeigte eine Progression der Atherosklerose innerhalb eines Jahres an.

## **3.2. Labormethoden**

### **3.2.1. Immunologische Marker**

Immunologische Marker sind monoklonale Antikörper, die gegen jeweils spezifische Epitope von Membranproteinen oder von bei Degranulation freigesetzten Glykoproteinen gerichtet sind. Die durchflusszytometrische Untersuchung von Thrombozyten mit Hilfe monoklonaler Antikörper wurde erstmals von Shattil et al. [82] beschrieben und ist die derzeitige Methode der Wahl, um verschiedene funktionelle Aspekte der Thrombozytenfunktion genauer zu studieren [83]. Darüber hinaus erlaubt der Einsatz monoklonaler Antikörper, aktivierungsabhängige Veränderungen der Thrombozytenoberfläche festzustellen [55]. Nachfolgend sollen die eingesetzten monoklonalen Antikörper und deren Funktion näher beschrieben werden.

#### **3.2.1.1. Marker für GPIb-V-IX**

Der GPIb-V-IX-Komplex ist ein thrombozytenspezifischer Rezeptor. Daher kommt dem gegen diesen Komplex gerichteten Antikörper CD42 eine wichtige Bedeutung bei der Identifikation von Thrombozyten zu. Anti-CD42 dient zur Abgrenzung der Thrombozytenpopulation von anderen Zellpopulationen. Die Oberflächenexpression von GPIb-V-IX hängt zusätzlich vom Aktivierungszustand ab. So kommt es z. B. durch Thrombinaktivierung zu einer vermehrten Internalisierung mit Abnahme der Rezeptordichte.

---

### **3.2.1.2. Marker für GPIIb-IIIa**

Für den Nachweis des GPIIb-IIIa-Komplexes stehen zunächst zwei Antikörper zur Verfügung. Zum einen anti-CD41, welches die Oberflächenexpression der  $\beta$ 3- Kette nachweist und zum anderen anti-CD61, welches die Oberflächenexpression der  $\alpha$ IIb-Kette nachweist. Diese Antikörper liefern Informationen zur Rezeptordichte von GPIIb-IIIa. Um herauszufinden, in welchem Funktionszustand sich der Fibrinogenrezeptor befindet, kann zusätzlich PAC-1 als Antikörper eingesetzt werden. Dieser bindet, durch Erkennung einer nach Konformationsänderung präsentierten Fibrinogenbindungsstelle (RGD-Erkennungssequenz), ausschließlich an den aktivierten hochaffinen GPIIb-IIIa-Rezeptor. Ist diese Bindungsstelle bereits durch Fibrinogen besetzt, findet aufgrund von Konkurrenz keine Bindung durch PAC-1 statt.

### **3.2.1.3. Degranulationsmarker**

Als Degranulationsmarker dienen anti-CD62P zum Nachweis von P-Selektin und anti-CD63 zum Nachweis von GP53. Sowohl P-Selektin als auch GP53 werden erst nach Aktivierung aus den  $\alpha$ -Granula (P-Selektin) bzw. Lysosomen (GP53) des Blutplättchens freigesetzt. Hierzu gehört auch CD40L. Eine erhöhte Bindung dieser Marker weist auf eine stattgehabte Degranulation und somit Aktivierung von Thrombozyten hin.

### **3.2.1.4. Marker für die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion**

Anti-CD14 dient zum Nachweis von Monozyten bzw. Monozyten-Thrombozyten Koaggregaten bei zusätzlicher Verwendung von anti-CD42b. Leukozyten lassen sich durch den Einsatz von anti-CD11b identifizieren. Bei Kombination mit anti-CD42b können somit Thrombozyten-Leukozyten Koaggregate nachgewiesen werden.

## **3.2.2. Verwendete monoklonale Antikörper**

Einen Überblick über die für die Messungen eingesetzten Antikörper, deren selektive Bindungsstelle und die mit ihnen konjugierten Fluorochrome gibt die folgende Tabelle 5 wieder:

**Tabelle 5 – Eingesetzte Antikörper und ihre Eigenschaften**

<b>Antikörper</b>	<b>Oberflächenantigen</b>	<b>Fluorochrom</b>
IgG1	Keine Spezifität	FITC
anti-CD42b	GPIb $\alpha$ Untereinheit des GPIb-V-IX (von Willebrand-Faktor-Rezeptor)	PE
anti-CD41	$\alpha$ IIb-Kette des GPIIb-IIIa (Fibrinogenrezeptor)	FITC
anti-CD61	$\beta$ 3-Kette des GPIIb-IIIa (Fibrinogenrezeptor)	FITC
anti-CD62P	P-Selektin	FITC
anti-CD62L	L-Selektin	FITC
anti-CD63	GP53 (lysosomales Membranprotein)	FITC
PAC-1	Bindung an den aktivierten GPIIb-IIIa Rezeptor	FITC
anti-CD40L	CD40L (Protein der TNF-Familie) unter anderem auch von Thrombozyten freigesetzt	FITC
anti-CD11b	$\alpha$ M Integrin Untereinheit des Mac-1 (Leukozytenadhäsionsrezeptor)	FITC, Cy-Chrome™
anti-CD14	Protein, das auf Monozyten, Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten vorkommt (Endotoxin-Rezeptor)	PC5

FITC = Fluorescein-Isothiocyanat

PE = Phycoerythrin

PC5 = Phycoerythrin-Cyanin 5

### **3.2.3. Durchflusszytometrische Bestimmung thrombozytärer Membranglykoproteine**

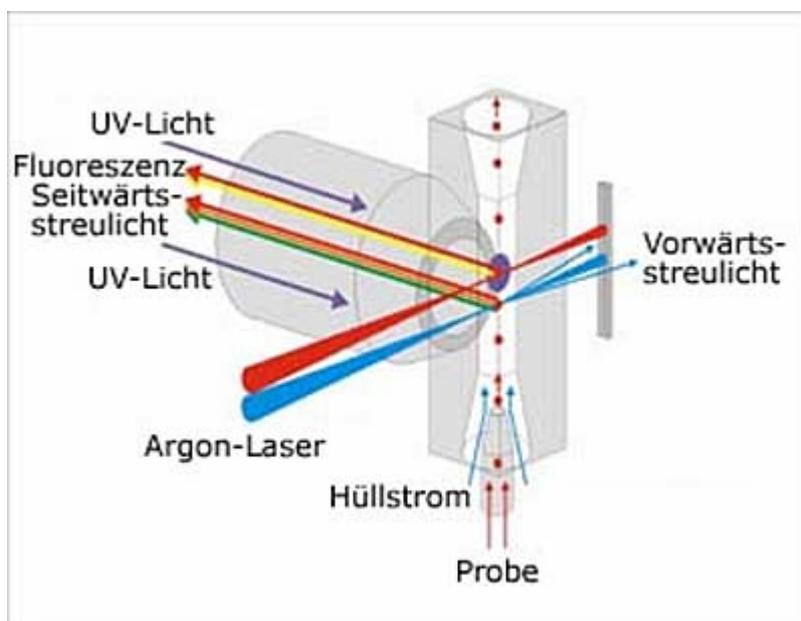
#### **3.2.3.1. Prinzip der Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, um Zellen bezüglich ihrer Größe, Granularität und spezifischer Fluoreszenzen zu analysieren. Hierbei werden die zu untersuchenden Zellen über eine Kapillare in eine Meßküvette angesaugt und durch eine zusätzliche Trägerflüssigkeit in einem Hüllstrom einzeln auf einem definierten Weg durch den Meßbereich geführt. Im

Meßbereich trifft ein Laserstrahl auf die vorbeiströmenden Zellen, wodurch charakteristische Lichtstreuophänomene in Abhängigkeit von der Zellmorphologie und den eingesetzten Immunfluoreszenzen entstehen. Diese werden von speziellen Photodioden detektiert. Das Vorwärtsstreulicht („forward scatter“, FSC), das in der Achse des einfallenden Lichts registriert wird, ist dabei proportional zur Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht („side scatter“, SSC), das im 90° Winkel zur Achse des einfallenden Lichts registriert wird, gibt Auskunft über die Granularität der Zellen. Wenn Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt wurden, können zusätzlich Fluoreszenzen (FL1, FL2, FL3) simultan gemessen werden. Diese an monoklonale Antikörper kovalent gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe emittieren nach Anregung durch den Laserstrahl Licht mit einer für sie charakteristischen Wellenlänge (Tab. 6).

**Tabelle 6 - Absorptions- und Emissionsspektren einiger verwendeter Fluorochrome**

Fluorochrom	Absorption (nm)	Emission (nm)
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	488	530 (grün)
Phycoerythrin (PE)	492	580 (rot)
Phycoerythrin-Cyanin 5 (PC 5)	488	670 (rot)



**Abb. 8 – Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers.** Die Probe wird angesaugt und in einen zusätzlichen Hüllstrom eingebettet. Dieser sorgt dafür, dass die Zellen möglichst einzeln an einem orthogonal eintreffenden Laserstrahl vorbeigeführt werden. Beim Passieren des Laserstrahls entstehen zellcharakteristische Lichtstreuophänomene, die als Vorwärts- und Seitwärtsstreuung registriert werden. Die Anregung mit UV-Licht erlaubt zusätzlich die

---

*Registrierung von Fluoreszenzen fluorochrommarkierter Antikörper auf der Zelloberfläche.  
(Quelle modifiziert nach: <http://www.partec.com/partec/flowcytometry.html>)*

Damit lassen sich weitere Informationen über besondere Zelleigenschaften gewinnen. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie und durch den Einsatz aktivierungsabhängiger Antikörper ist es möglich, den Aktivierungszustand zirkulierender Thrombozyten und die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten *ex vivo* zu untersuchen [84] [85] [86] [87] [82] [88]. Zudem können thrombozytopathische Krankheitsbilder wie die Glanzmann-Naegele Thrombasthenie oder das Bernard-Soulier Syndrom aufgedeckt werden [89].

### **3.2.3.2. Probengewinnung**

Bei den Patienten wurde bei mäßiger Stauung eine Oberarmvene mit einem 19 G - Butterfly punktiert und die ersten 2 ml Blut verworfen. Für die Durchflusszytometrie wurde dann 0,5 ml Blut entnommen. Diese 0,5 ml Blut wurden anschließend sofort zur Fixierung in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen (BD Falcon™, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit 1 ml Cyfix II gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Fixation durch Aufgießen mit 48,5 ml PBS (phosphate buffered saline, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gestoppt und die fixierte Blutprobe innerhalb von 2 Tagen weiterverarbeitet.

### **3.2.3.3. Cyfix-Konservierung**

Die Cyfix- Fixierlösung, eine Methacrolein enthaltende Lösung, ermöglicht es, Thrombozyten und insbesondere Interaktionen von Thrombozyten mit anderen Zellen für Messungen mit einem Durchflusszytometer zu konservieren, wobei eine artifizielle Aktivierung der Thrombozyten *in vitro* sehr gering ist. Diese Methode ist bereits in vorangegangenen Forschungsarbeiten belegt [90] [91]. Die hier verwendete Cyfix II Fixierlösung wurde freundlicherweise von Dr. Andreas Ruf, Karlsruhe, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

### **3.2.3.4. Probenweiterverarbeitung / Zweifachfärbung**

Bei der Zweifachfärbung wurden die Blutproben vor der durchflusszytometrischen Messung mit insgesamt 2 Antikörpern inkubiert. Der erste Antikörper war CD42b-PE (Immunotech, Marseille, Frankreich) und diente zur Identifikation von Thrombozyten, da er selektiv die Ib-Untereinheit des für Thrombozyten spezifischen GPIIb-V-IX (von Willebrand-Faktor-Rezeptor) erkennt. Diese Immunfluoreszenz ermöglichte somit die Abgrenzung der Thrombozytenpopulation von anderen Zellpopulationen. Der zweite Antikörper (CD62P, CD63, PAC-1, CD40L) konnte als spezifischer Aktivierungsmarker die Oberflächenexpression thrombozytärer Membranglykoproteine nachweisen und damit Auskunft über den Aktivierungszustand von Thrombozyten geben. IgG-FITC

wurde als unspezifische Immunfluoreszenz eingesetzt, um später im Histogramm die Grenze für die antikörperpositiven Zellen einstellen zu können. CD41-FITC und CD61-FITC dienten zur Bestimmung der Oberflächenexpression der  $\alpha$ IIb-Kette bzw. der  $\beta$ 3-Kette des GPIIb-IIIa.

### 3.2.3.5. Durchführung

Für alle Ansätze wurde CD42b-PE (Immunotech, Marseille, Frankreich) verwendet.

Als zweite Antikörper wurden eingesetzt:

IgG-FITC, CD41-FITC, CD62P-FITC, CD63-FITC, CD61-FITC, CD40L-FITC (Immunotech, Marseille, Frankreich) und PAC1-FITC (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

Über die Bedeutung der Antikörper und deren Eigenschaften siehe Kapitel 3.2.1 Immunologische Marker und Tabelle 5.

Die insgesamt 7 Messansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Ansatz	Erster Antikörper	Zweiter Antikörper
1	5 $\mu$ l CD42b-PE +	5 $\mu$ l IgG-FITC
2	5 $\mu$ l CD42b-PE +	5 $\mu$ l CD41-FITC
3	5 $\mu$ l CD42b-PE +	5 $\mu$ l CD62P-FITC
4	5 $\mu$ l CD42b-PE +	5 $\mu$ l CD63-FITC
5	5 $\mu$ l CD42b-PE +	5 $\mu$ l PAC-1-FITC
6	5 $\mu$ l CD42b-PE +	5 $\mu$ l CD61-FITC
7	5 $\mu$ l CD42b-PE +	1 $\mu$ l CD40L-FITC + 4 $\mu$ l PBS (Phosphate buffered saline, Sigma, Deisenhofen, Deutschland).

Die Antikörper wurden mit einer Eppendorf-Pipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in speziell für die Durchflusszytometrie geeignete FACS-Röhrchen (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) pipettiert.

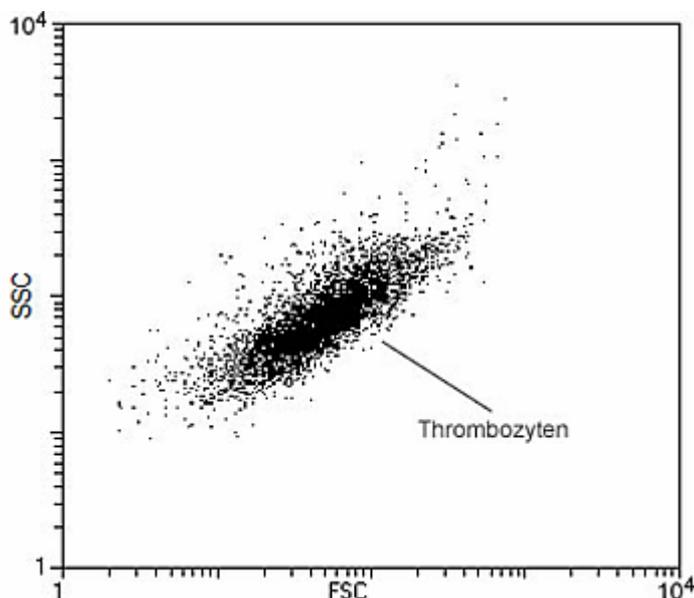
Pro Ansatz wurden dann jeweils 40  $\mu$ l Patientenvollblut hinzupipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 500  $\mu$ l 0,2 %iger Para-Formaldehydlösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gestoppt und die Messung der Proben am Durchflusszytometer durchgeführt. Zu jeder Messreihe wurde als Kontrolle eine Blutprobe eines gesunden Probanden zusammen mit den Patientenproben verarbeitet und gemessen. Die Messdaten der Kontrollen dienten als Referenzwerte bei der statistischen Auswertung.

### 3.2.3.6. Messung

Alle durchflusszytometrischen Messungen der vorliegenden Arbeit wurden an einem mit luftgekühlten 15 mW-Argonlaser ausgestatteten „FACScan“-Durchflusszytometer“ (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Das FACScan-Durchflusszytometer wurde mit im Handel erhältlichen Standard-Fluoreszenz-Mikrobeads (CaliBRITE®, Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) kalibriert. Die genaue Gerätekonfiguration befindet sich im Anhang. Vom Durchflusszytometer wurden die gemessenen Ereignisse (Zellsignale) registriert und die Daten parallel an einen angeschlossenen Computer übermittelt. Für die Verarbeitung und die Auswertung der Messdaten wurde das elektronische Datenverarbeitungsprogramm „FACScan“ (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Es wurden je Probe 5000 Ereignisse, bei einer Rate von 100-200 Ereignissen pro Sekunde, gezählt.

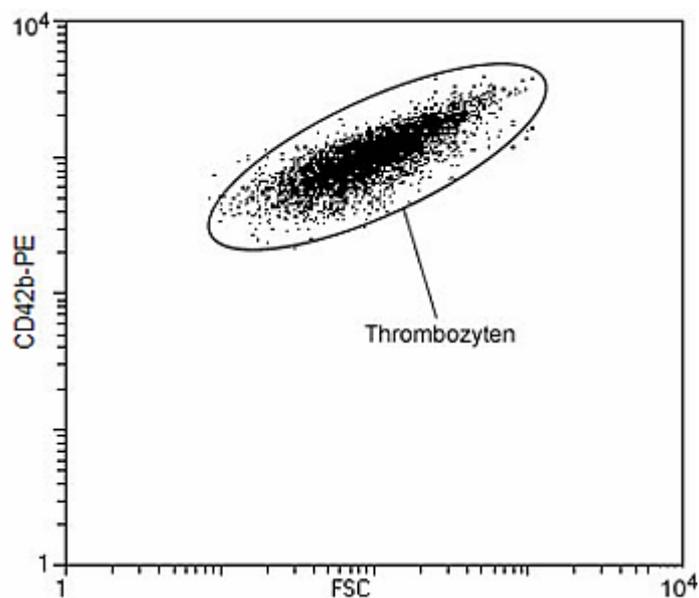
### 3.2.3.7. Darstellung der Messung

Thrombozyten zeigen in Bezug auf Größe (FSC) und Granularität (SSC) eine charakteristische Lichtstreuung, welche in einer Zweiparameter Darstellung, Dot-Plot genannt, angezeigt werden kann (Abb. 9).



**Abb. 9 – Dot-Plot Darstellung einer Thrombozytenpopulation.** Thrombozyten zeigen auf Grund ihrer Morphologie eine charakteristische Lichtstreuung.

Da andere Zellen und Zelldetritus stören, ist es notwendig, vor der eigentlichen Messung einen Auswahlrahmen zu erstellen, mit dessen Hilfe die Thrombozytenpopulation selektiert werden kann. Hierfür wurde die Zweiparameter Darstellung CD42b-PE, FSC benutzt (Abb. 10):

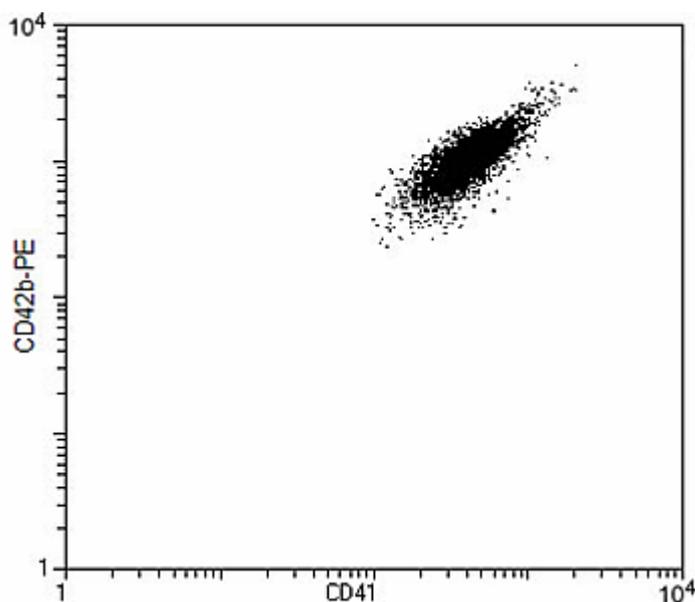


**Abb. 10 – Dot-Plot Darstellung einer Thrombozytenpopulation mit einer deutlich positiven CD42 Immunfluoreszenz. CD42b weist das für Thrombozyten spezifische Glykoprotein Ib-V-IX nach.**

Dieses Verfahren, auch „gaten“ genannt, erlaubt es, eine bestimmte Zellpopulation zu erfassen, und gezielt nur deren Eigenschaften bezüglich weiterer Fluoreszenzen zu messen.

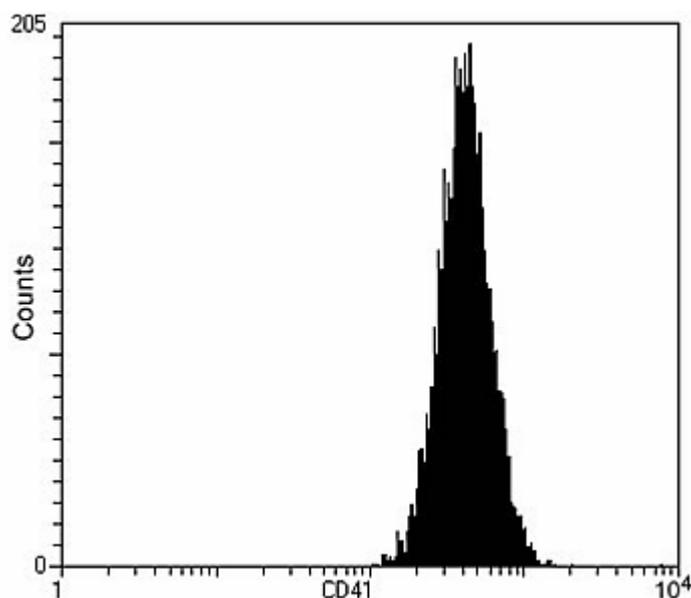
### **3.2.3.8. Quantitative Beschreibung der Antikörperbindung**

In einer weiteren Zweiparameter-Darstellung wurden anschließend zwei Fluoreszenzen gegeneinander aufgetragen, wobei nur Zellen, die sich im Auswahlrahmen befanden, berücksichtigt wurden. Dadurch konnte die Thrombozytenpopulation auf Exposition von Membranglykoproteinen und die Degranulation von Granulainhaltsstoffen untersucht werden. Das folgende Dot-Plot zeigt an einem Beispiel die CD41-Expression einer Thrombozytenpopulation (Abb. 11):



**Abb. 11 – Dot-Plot Darstellung einer Thrombozytenpopulation mit Nachweis der Expression von CD41.** Der Antikörper CD41 erkennt die  $\alpha$ IIb-Kette des thrombozytären Glykoproteins IIb-IIIa (Fibrinogenrezeptor).

Ein Histogramm (Einparameter-Darstellung) ermöglichte die quantitative Darstellung von Fluoreszenzstärke (x-Achse) und Häufigkeit der gemessenen Ereignisse (y-Achse) (Abb. 12):



**Abb. 12 – Histogramm zur CD41 Expression.** Auf der x-Achse ist die Immunfluoreszenz logarithmisch und auf der y-Achse die Ereignishäufigkeit aufgetragen. Dies ermöglicht eine quantitative Bestimmung der Antikörperexpression.

---

Die „FACScan“-Software berechnete aus den Daten der Histogramme die relative mittlere Immunfluoreszenz (MIF = mean intensity of fluorescence) sowie den Prozentsatz antikörperpositiver Thrombozyten (= % positive Thrombozyten). Für die statistische Analyse wurden die daraus resultierenden Zahlenwerte verwendet.

### **3.2.4. Durchflusszytometrische Untersuchung der Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion**

#### **3.2.4.1. Monoklonale Antikörper**

Die Bedeutung der für die Dreifachfärbung eingesetzten Antikörper CD14-PC5, CD42b-PE, CD11b/Mac-Cy-Chrome™, CD62P/L-FITC und CD11b-FITC wurde bereits in der Tabelle 5 näher erläutert.

#### **3.2.4.2. Probengewinnung**

Hier wurde das gleiche Verfahren, wie unter Punkt 3.2.3.2 angegeben, angewendet.

#### **3.2.4.3. Probenweiterverarbeitung / Dreifachfärbung**

Die Dreifachfärbung, bei der insgesamt 3 Antikörper eingesetzt werden, ermöglicht es, Thrombozyten-Monozyten und Thrombozyten-Leukozyten Koaggregate und deren Expression von Aktivierungsmarkern nachzuweisen. Der erste Antikörper CD42b dient wie bei der Zweifachfärbung auch der Identifikation von Thrombozyten. CD14 und CD11b sind Antikörper, die an spezifische Epitope auf Monozyten bzw. Leukozyten binden. Der dritte Antikörper (CD62P / CD62L) zeigt die Expression von Aktivierungsmarkern auf Thrombozyten oder Leukozyten an.

#### **3.2.4.4. Durchführung**

Zuerst wurden die 50 ml Falcon-Röhrchen (BD Falcon™, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit der Blutprobe bei 1000 U/min für 20 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der zellfreie, flüssige Überstand abgesaugt und das zurückbleibende Pellet (Bodensatz aus Zellen) mit 250 µl PBS (phosphate buffered saline, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) resuspendiert. Für die 5 Ansätze wurden die Antikörper, wie in dem folgenden Pipettierschema dargestellt, mit einer Eppendorf-Pipette (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in die FACS-Röhrchen (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) pipettiert.

---

Pipettierschema:

Ansatz	Erster Antikörper	Zweiter Antikörper	Dritter Antikörper
1	5 µl CD42b-PE +	5 µl CD14-PC5 +	5 µl CD62P-FITC
2	5 µl CD42b-PE +	5 µl CD14-PC5 +	5 µl CD62L-FITC
3	5 µl CD42b-PE +	5 µl CD11b / MAC1- Cy-Chrome™ +	5 µl CD62P-FITC
4	5 µl CD42b-PE +	5 µl CD11b / MAC1- Cy-Chrome™ +	5 µl CD62L-FITC
5	5 µl CD42b-PE +	5 µl CD14-PC5 +	5 µl CD11b-FITC

---

Bis auf CD11b/MAC1 Cy-Chrome™ konjugiert (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) stammten alle Antikörper von Immunotech, Marseille, Frankreich. Pro Ansatz wurden nun jeweils 35 µl der resuspendierten Blutprobe mit einer Eppendorf-Pipette (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) hinzupipettiert. Während der folgenden 30 minütigen Inkubation wurden die Proben unter Lichtabschluss im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Im Anschluss wurde ein spezielles Lyseverfahren durchgeführt, um die in den Proben enthaltenen Erythrozyten zu lysieren. Das dazu verwendete Lyseagens (Coulter Clone® Immuno-Lyse, Coulter, Miami, USA) wurde zuvor mit PBS im Verhältnis 1:25 verdünnt und in einem Wasserbad auf 37° C erwärmt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 500 µl des verdünnten Lyseagens pro Ansatz hinzugegeben und die Reaktion nach 75 sec. mit 125 µl einer Fixierlösung (Coulter Clone®, Fixative, Coulter, Miami, USA) gestoppt. Danach wurde zum Auswaschen in alle Ansätze 3 ml PBS pipettiert und diese für 10 Minuten bei 1600 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zu einer bestimmten Markierung auf dem FACS-Röhrchen abgesaugt und jede Probe mit jeweils 250 µl 0,2% PAF (Paraaminoformaldehyd, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) fixiert. Anschließend wurde die Messung am Durchflusszytometer begonnen.

### 3.2.4.5. Messung

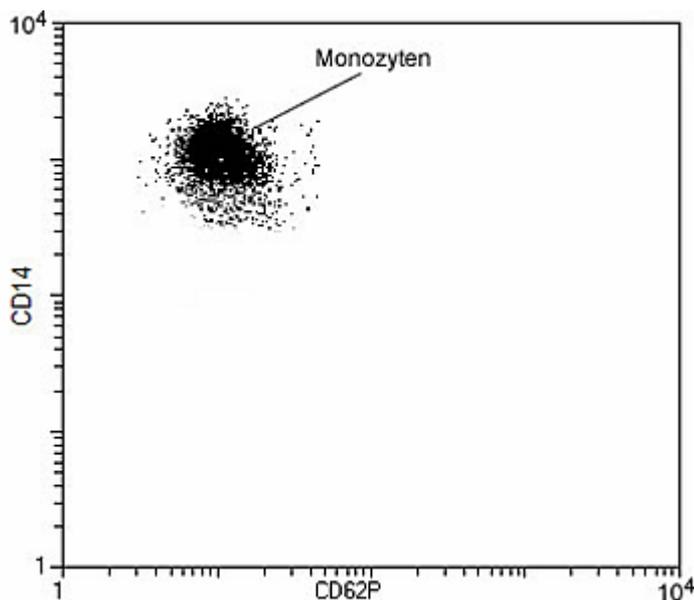
Siehe Kapitel 3.2.3.6

In den ersten beiden Ansätzen zur Messung der Monozyten wurden 5000 Ereignisse und in den letzten 3 Ansätzen zur Messung der Leukozyten 10 000 Ereignisse gemessen.

### 3.2.4.6. Darstellung der Messung

Die Färbung mit anti-CD14 (Monozytenmarker), anti-CD11b (Leukozytenmarker) und anti-CD42b (Thrombozytenmarker) diente der Bestimmung von Monozyten- bzw. Leukozyten-Thrombozyten-Koagregaten. Zusätzlich eingesetzte monoklonale Antikörper wie anti-CD62P und anti-CD62L konnten darüber hinaus Auskunft über deren Expression von CD62P und CD62L, und damit über den Aktivierungszustand, geben.

Die im Ansatz 1 und 2 interessierenden Monozyten ergaben im Dot-Plot als CD14 positive Zellen eine charakteristische Verteilung oberhalb einer Immunfluoreszenzstärke von  $10^2$ . Ein entsprechender Auswahlrahmen, um die CD14 positiven Zellen zu erfassen, wurde zuvor eingefügt. Nur die Zellen innerhalb dieses Auswahlrahmens (Gate) wurden für die Messung bezüglich der Immunfluoreszenzen für CD62P und CD62L erfasst. Im folgenden Beispiel ist eine Monozytenpopulation dargestellt, die keine Expression von CD62P aufweist (Abb. 13).



**Abb. 13 – Dot-Plot Darstellung einer Monozytenpopulation.** Diese kann gut anhand der positiven Expression von CD14 erkannt werden. CD62P wird von ihr nicht exprimiert.

Mit einer weiteren Zwei-Parameter Darstellung konnte für die Monozytenpopulation die CD42b Expression bestimmt und dadurch über das Vorhandensein und die Anzahl von Thrombozyten-Monozyten Koagregaten Aufschluss gewonnen werden. Histogramme dienten anschließend zur Berechnung der mittleren Immunfluoreszenzen bezüglich der Expression von CD62P und CD62L bei Thrombozyten-Monozyten Koagregaten.

In analoger Weise wurde bei der Messung der Leukozyten-Thrombozyten Koaggregate und deren Expression von CD62P und CD62L verfahren. Ereignisse oberhalb einer Immunfluoreszenzstärke von 10 für CD11b wurden als Leukozyten gewertet (Abb. 14).

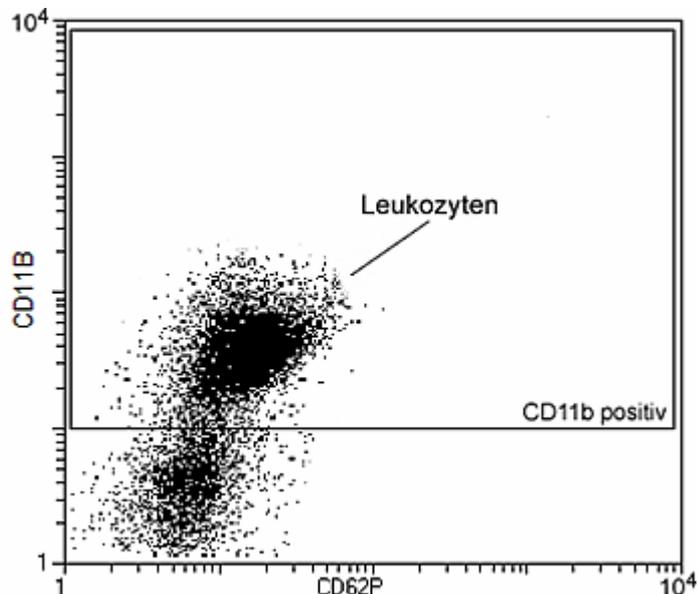


Abb. 14 – **Dot-Plot Darstellung von Leukozyten.** Diese weisen eine positive Expression von CD11b oberhalb von 10 auf und können somit von anderen Zellen abgegrenzt werden.

Durch eine zusätzliche Zwei-Parameter-Darstellung konnte für diese CD11b positive Population die CD42b und eine weitere Immunfluoreszenz wie CD62P oder CD62L dargestellt werden (Abb. 15).

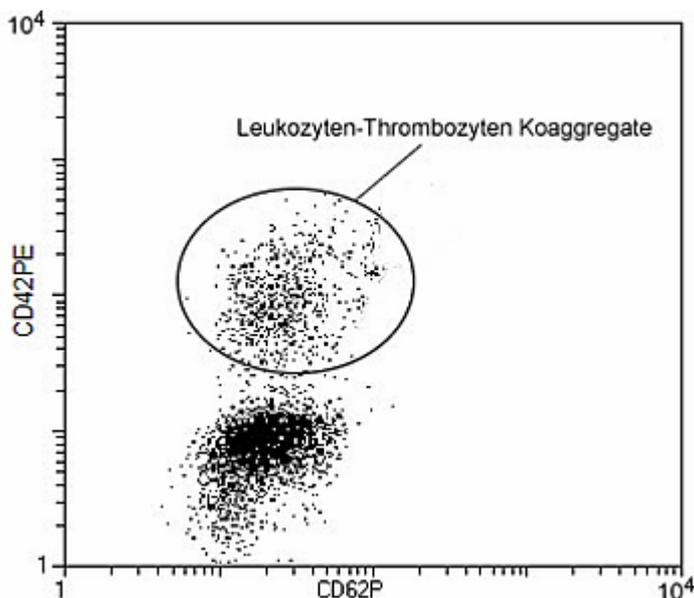


Abb. 15 – **Dot-Plot Darstellung von Leukozyten und deren Expression von CD42 und CD62P.** Anhand des CD42 Antikörpers können Leukozyten-Thrombozyten Koaggregate

---

*nachgewiesen werden. Die dritte Fluoreszenz erlaubt die Bestimmung der Expression von Aktivierungsmarkern wie z.B. CD62P.*

Mit Hilfe von Histogrammen wurden anschließend die Thrombozyten-Leukozyten Koaggregate und die Expression von CD62P und CD62L in Form der jeweiligen mittleren Immunfluoreszenz quantitativ bestimmt. Die aus den Messungen gewonnenen Daten zur Expression von CD62P und CD62L bei Monozyten, Leukozyten, Thrombozyten und den entsprechenden Koaggregaten wurden für die statistische Analyse verwendet.

### **3.3. Statistische Auswertung**

Bei der Analyse der durchflusszytometrischen Daten durch den Kolmogorov-Smirnov Test konnte keine Normalverteilung festgestellt werden, weshalb beim Vergleich dieser Daten die 25igste Perzentile, der Median und die 75igste Perzentile verwendet wurden. Die Ergebnisse der Intima-Media Dicke sind ebenfalls als 25igste Perzentile, Median und 75igste Perzentile wiedergegeben. Die Angabe der klinischen Daten erfolgte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Um Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne Progression der Atherosklerose festzustellen, wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U Test für unverbundene Stichproben eingesetzt.

Die Untersuchung, ob die Thrombozytenaktivierung einen unabhängigen Risikofaktor für die Progression der Erkrankung darstellt, erfolgte durch eine multivariate logistische Regressionsanalyse. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde generell als signifikant erachtet. Für die statistische Auswertung wurde die Software „SPSS 10.0 for Windows“ benutzt. Die statistische Beratung fand durch Herrn Prof. Dr. K.-D. Wernecke vom Institut für Medizinische Biometrie der Charité statt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Patientencharakteristik

Nach einer follow-up Phase von einem Jahr waren paarweise Daten aus Ultraschalluntersuchungen und Daten aus durchflusszytometrischen Messungen für insgesamt 172 Patienten vorhanden. Nachfolgend wird auf die demografischen Eigenschaften, unter Einbeziehung kardiovaskulärer Risikofaktoren, die Labordaten und die medikamentöse Therapie des Studienkollektivs eingegangen.

Das durchschnittliche Alter der Studienpopulation betrug  $63,7 \pm 8,2$  Jahre. Von den 172 Studienteilnehmern waren 79 (45,9%) weiblich und 93 (54,1%) männlich. Ein arterieller Hypertonus war bei 159 (92,4%) Patienten vorhanden. Der durchschnittliche systolische Blutdruck lag bei  $145 \pm 20,5$  mmHg und der diastolische Blutdruck bei  $82 \pm 10,3$  mmHg. Von 172 Patienten waren 39 (22,7%) Raucher. Der Body-Mass-Index betrug im Durchschnitt  $30,9 \pm 5,7$  und die Diabetesdauer  $11 \pm 8,7$  Jahre. Bei 64 (37,2%) Patienten bestand eine Mikroangiopathie und bei 83 (48,3%) eine Makroangiopathie. Insgesamt hatten 74 Patienten eine KHK und 26 Patienten eine pAVK. Die Studienpopulation wies einen Median der  $\Delta$ Intima-Media Dicke von 0,10 (-0,05; 0,30 [25igste; 75igste Perzentile]) auf. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 7:

**Tabelle 7 – Demografische Daten der gesamten Studienpopulation**

<b>Alle Patienten (n = 172)</b>	
Alter (Jahre),	63,7 ± 8,2
männlich, n (%)	93 (54,1)
weiblich, n (%)	79 (45,9)
<b>durchschnittliche <math>\Delta</math>IMD, [mm]*</b>	0,10 (-0,05; 0,30)
Arterieller Hypertonus, n (%)	159 (92,4)
Blutdruck systolisch, mmHg	145 ± 20,5
Blutdruck diastolisch, mmHg	82 ± 10,3
Raucher, n (%)	39 (22,7)
Body-mass index, kg/m <sup>2</sup>	30,9 ± 5,7
Diabetesdauer, (Jahre)	11 ± 8,7
Mikroangiopathie, n (%)	64 (37,2)
Makroangiopathie, n (%)	83 (48,3%)
KHK, n (%)	74 (43,0)
pAVK, n (%)	26 (15,1)

(Zahlenangaben als Mittelwert ± Standardabweichung oder als absolute Werte und in Prozent; \* Median [25igste; 75igste Perzentile])

Von insgesamt 172 Patienten hatten 96 (55,8%) Patienten eine Hypercholesterinämie. Das durchschnittliche Gesamtcholesterol der Studienpopulation lag bei  $4,8 \pm 1,2$  mmol/L, das LDL-Cholesterin bei  $2,6 \pm 0,9$  mmol/l und das HDL-Cholesterin bei  $1,4 \pm 0,4$  mmol/L. Der HbA1c betrug im Durchschnitt  $8,2 \pm 1,7$  %, was einer schlechten Blutzuckereinstellung entspricht. Die durchschnittliche Thrombozytenanzahl lag bei  $237\ 820 \pm 62\ 863$  /  $\mu$ l und die durchschnittliche Leukozytenanzahl bei  $7\ 599 \pm 1\ 936$  /  $\mu$ l.

Fibrinogen wies einen Durchschnittswert von  $11,7 \pm 2,2$   $\mu$ mol/L und Plasmakreatinin von  $83,2 \pm 23,1$   $\mu$ mol/L. Die Übersicht zu den Labordaten findet sich in Tabelle 8.

**Tabelle 8 – Labordaten der gesamten Studienpopulation****Alle Patienten (n = 172)**

Hypercholesterinämie, n (%)	96 (55,8%)
Gesamtcholesterin, mmol/L	4,8 ± 1,2
LDL, mmol/L	2,6 ± 0,9
HDL, mmol/L	1,4 ± 0,4
HbA1c (%)	8,2 ± 1,7
Thrombozyten / $\mu$ L	237 820 ± 62 863
Leukozyten / $\mu$ L	7 599 ± 1 936
Fibrinogen, $\mu$ mol/L	11,7 ± 2,2
Plasmakreatinin, $\mu$ mol/L	83,2 ± 23,1

(Zahlenangaben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung oder als absolute Werte und in Prozent)

Die medikamentöse Therapie innerhalb der Studienpopulation ist in Tabelle 9 wiedergegeben. Insgesamt nahmen 127 (73,8 %) Patienten ASS ein, 80 (46,5%) Patienten erhielten Betarezeptorenblocker, 102 (59,3%) Patienten bekamen ACE Hemmer, 112 (65,1%) Patienten nahmen Statine ein und 126 (73,3%) Patienten spritzten Insulin.

---

**Tabelle 9 – Medikamentöse Therapie innerhalb der gesamten Studienpopulation**

---

**Medikamente**

ASS, n (%)	127 (73,8)
Betarezeptorenblocker, n (%)	80 (46,5)
ACE-Hemmer, n (%)	102 (59,3)
Statin, n (%)	112 (65,1)
Insulin, n (%)	126 (73,3)

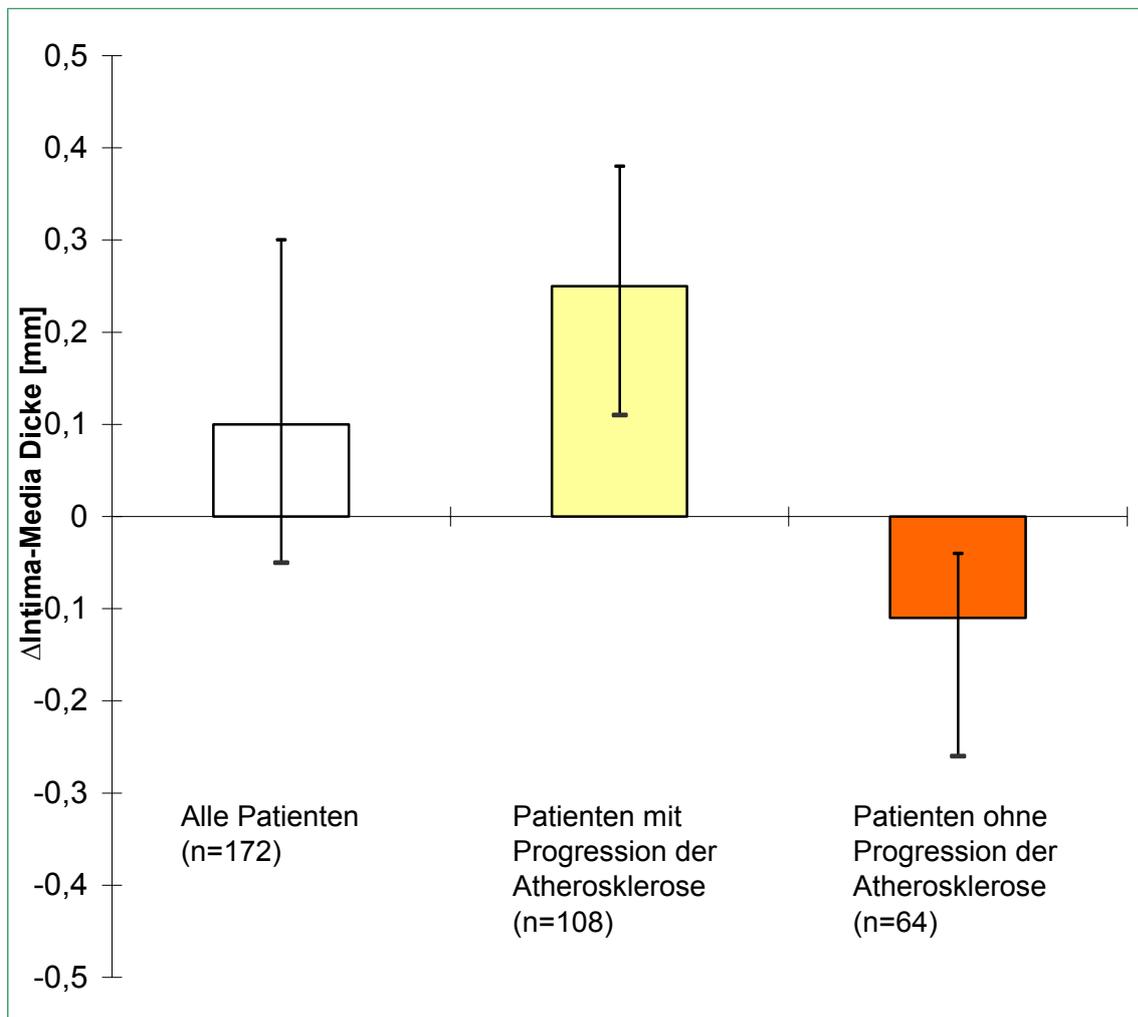
---

(Zahlenangaben als absolute Werte und in Prozent)

---

**4.1.1. Auswertung der Carotis B-Mode Sonografie**

Von insgesamt 172 Patienten wiesen 108 Patienten eine Zunahme der durchschnittlichen  $\Delta$ Intima-Media Dicke ( $\Delta$ IMD=0.250 mm) und somit eine Progression der Atherosklerose auf. Dies entspricht einer Prävalenz von 62.8%. Bei 64 (37.2%) Patienten zeigte sich eine Abnahme der durchschnittlichen  $\Delta$ IMD und damit keine Progression der Atherosklerose (s. Abb. 16).



**Abbildung 16 – Vergleich der  $\Delta$ Intima-Media Dicke.** In diesem Box-Plot Diagramm ist die  $\Delta$ Intima-Media Dicke [mm] der gesamten Studienpopulation, bei Patienten mit Progression und ohne Progression der Atherosklerose jeweils als Median, 25igste und 75igste Perzentile dargestellt.

#### 4.1.2. Ergebnisse zu Patienten mit und ohne Atheroskleroseprogression

Bei Vergleich der klinischen Parameter zwischen den beiden Gruppen fiel ein signifikanter Unterschied in der Geschlechtsverteilung auf. In der Gruppe mit Progression der Atherosklerose befanden sich mehr männliche Patienten. Ansonsten zeigten sich keine weiteren signifikanten Unterschiede in Bezug auf die übrigen demografischen Daten (Tab. 10).

**Tabelle 10 – Gegenüberstellung der demografischen Daten bei Patienten mit Progression und ohne Progression der Atherosklerose**

	<b>Progression der Atherosklerose n = 108 (62,8%)</b>	<b>Keine Progression der Atherosklerose n = 64 (37,2%)</b>	p-Wert
durchschnittliche $\Delta$ IMD [mm]*	0,250 (0,110; 0,380)	-0,110 (-0,260; -0,040)	
Alter (Jahre),	62,7 $\pm$ 8,45	65,4 $\pm$ 7,64	0,10
männlich, n (%)	65 (60,2)	28 (43,8)	0,04**
Arterieller Hypertonus, n (%)	99 (91,7)	60 (93,8)	0,76
Blutdruck systolisch, mmHg	146 $\pm$ 21,3	142 $\pm$ 19,1	0,35
Blutdruck diastolisch, mmHg	82 $\pm$ 1,1	82 $\pm$ 10,6	0,98
Raucher, n (%)	22 (20,4)	17 (26,6)	0,45
Body-mass index, kg/m <sup>2</sup>	30,50 $\pm$ 5,3	31,6 $\pm$ 6,4	0,26
Diabetesdauer, (Jahre)	12,0 $\pm$ 9,3	10,4 $\pm$ 7,8	0,44
Mikroangiopathie, n (%)	42 (38,9)	22 (34,4)	0,32
Makroangiopathie, n (%)	51 (47,2)	32 (50)	0,73
KHK, n (%)	45 (41,7)	29 (45,3)	0,18
pAVK, n (%)	17 (15,7)	9 (14,1)	0,43

(Zahlenangaben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung oder als absolute Werte und in Prozent, \* Median [25igste; 75igste Perzentile]); \*\* signifikant: p<0,05.

Auch die Labordaten der beiden Patientengruppen mit und ohne Progression der Atherosklerose wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (s. Tab .11).

**Tabelle 11 – Vergleich der Labordaten bei Patienten mit Progression und ohne Progression der Atherosklerose**

	<b>Progression der Atherosklerose n = 108 (62,8%)</b>	<b>Keine Progression der Atherosklerose n = 64 (37,2%)</b>	p-Wert
durchschnittliche $\Delta$ IMD [mm]*	0,250 (0,110; 0,380)	-0,110 (-0,260; -0,400)	
Hypercholesterinämie, n (%)	96 (88,8)	59 (92,2)	0,79
Gesamtcholesterin, mmol/L	4,9 $\pm$ 1,3	4,7 $\pm$ 1,1	0,25
LDL, mmol/L	2,6 $\pm$ 0,9	2,5 $\pm$ 0,8	0,27
HDL, mmol/L	1,4 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,3	0,71
HbA1c (%)	8,3 $\pm$ 1,8	8,1 $\pm$ 1,7	0,40
Thrombozyten / $\mu$ L	239 740 $\pm$ 68 578	234 780 $\pm$ 53 359	0,97
Leukozyten / $\mu$ L	7620 $\pm$ 1653	7570 $\pm$ 2305	0,99
Fibrinogen, $\mu$ mol/L	11,4 $\pm$ 2,3	11,9 $\pm$ 2,0	0,27
Plasmakreatinin, $\mu$ mol/L	83,7 $\pm$ 24,1	82,5 $\pm$ 21,5	0,79

(Zahlenangaben als absolute Werte und in Prozent, \* Median [25igste; 75igste Perzentile])

Bei der medikamentösen Therapie zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (s. Tab. 12).

**Tabelle 12 – Gegenüberstellung der medikamentösen Therapie bei Patienten mit Progression und ohne Progression der Atherosklerose**

<b>Medikamente</b>	<b>Progression der Atherosklerose n = 108 (62,8%)</b>	<b>Keine Progression der Atherosklerose n = 64 (37,2%)</b>	<b>p-Wert</b>
ASS, n (%)	74 (68,5)	53 (82,8)	0,46
Betarezeptorenblocker, n (%)	51 (47,2)	29 (45,3)	0,61
ACE-Hemmer, n (%)	66 (66,1)	36 (56,3)	0,28
Statin, n (%)	70 (64,8)	42 (65,6)	0,85
Insulin, n (%)	76 (70,4)	50 (78,1)	0,91

(Zahlenangaben als absolute Werte und in Prozent)

#### **4.1.3. Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse und koronare Intervention**

Innerhalb des Studienkollektivs wurden 44 kardiovaskuläre Ereignisse verzeichnet. In der Gruppe mit Progression der Atherosklerose waren 31 Patienten betroffen und 13 Patienten in der Gruppe ohne Progression. Dieser Unterschied war nicht signifikant. Insgesamt erhielten 32 Patienten eine PTCA und sechs Patienten eine Bypass-OP. Bei zwei Patienten trat eine instabile Angina pectoris auf, bei einem Patienten ein Myokardinfarkt, bei einem Patienten eine Apoplexie, bei einem Patienten ein PRIND und bei einem Patienten ein arterieller Beinverschluss (s. Tab 13).

**Tabelle 13 – Übersicht zu kardiovaskulären Ereignissen in der Studienpopulation****Alle Patienten (n = 172)**

Kardiovaskuläre Ereignisse, n (%)	44 (25,6)
PTCA, n (%)	32 (18,6)
Myokardinfarkt, n (%)	1 (0,6)
Instabile AP, n (%)	2 (1,2)
Bypass-OP, n (%)	6 (3,5)
Apoplexie, n (%)	1 (0,6)
PRIND, n (%)	1 (0,6)
Arterieller Beinverschluss, n (%)	1 (0,6)

(Zahlenangaben als absolute Werte und in Prozent)

**4.2. Durchflusszytometrische Untersuchung****4.2.1. Expression thrombozytärer Membranglykoproteine**

Patienten mit Progression der Atherosklerose zeigten (n=108), im Gegensatz zu Patienten ohne Progression (n=64), eine signifikant höhere Expression von P-Selektin (CD62P % positive Thrombozyten, Median, [25igste und 75igste Perzentile]: 4,6 (2,8; 8,1) vs. 3,6 (2,8; 5,4), [p=0.029]) (s. Abb. 17).

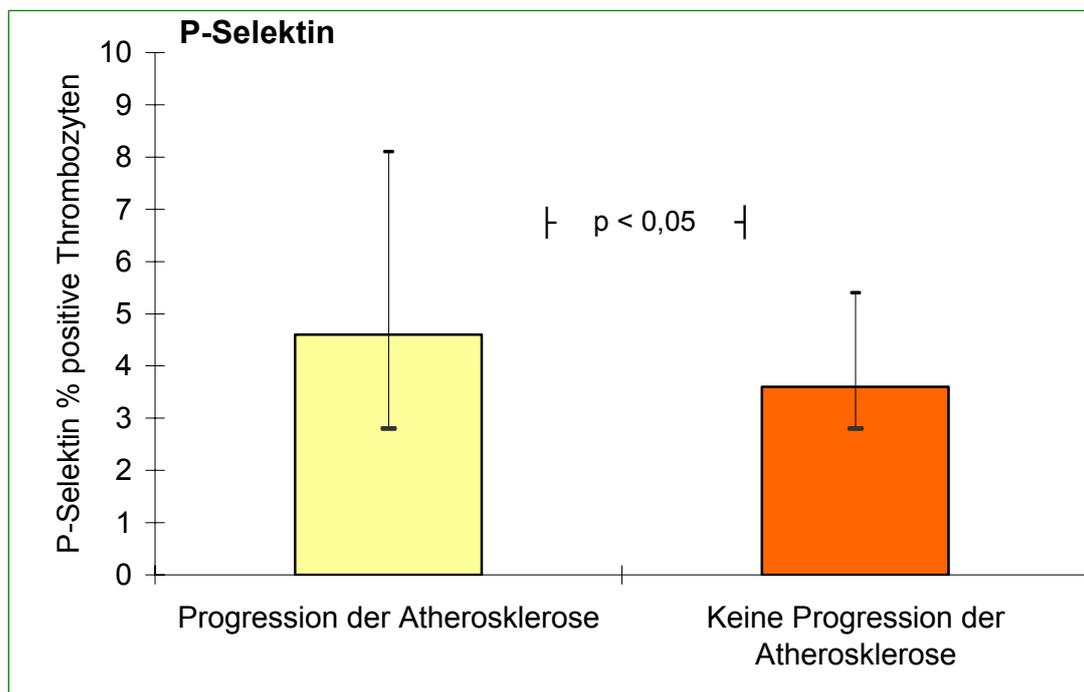


Abb. 17 – **Expression von P-Selektin.** Dargestellt in einem Box-Plot Diagramm ist die Expression von P-Selektin als P-Selektin % positive Thrombozyten (Median, [25igste und 75igste Perzentile]. Patienten mit Progression der Atherosklerose weisen eine signifikant höhere P-Selektin Expression auf.

Auch bei der Expression von CD63 (mittlere Intensität der Immunfluoreszenz; Median, [25igste und 75igste Perzentile]: 15,7 (9,6; 24,9) vs. 13,2 (8,6; 19,9), [p=0,046]) ergab sich ein signifikanter Unterschied (s. Abb. 18).

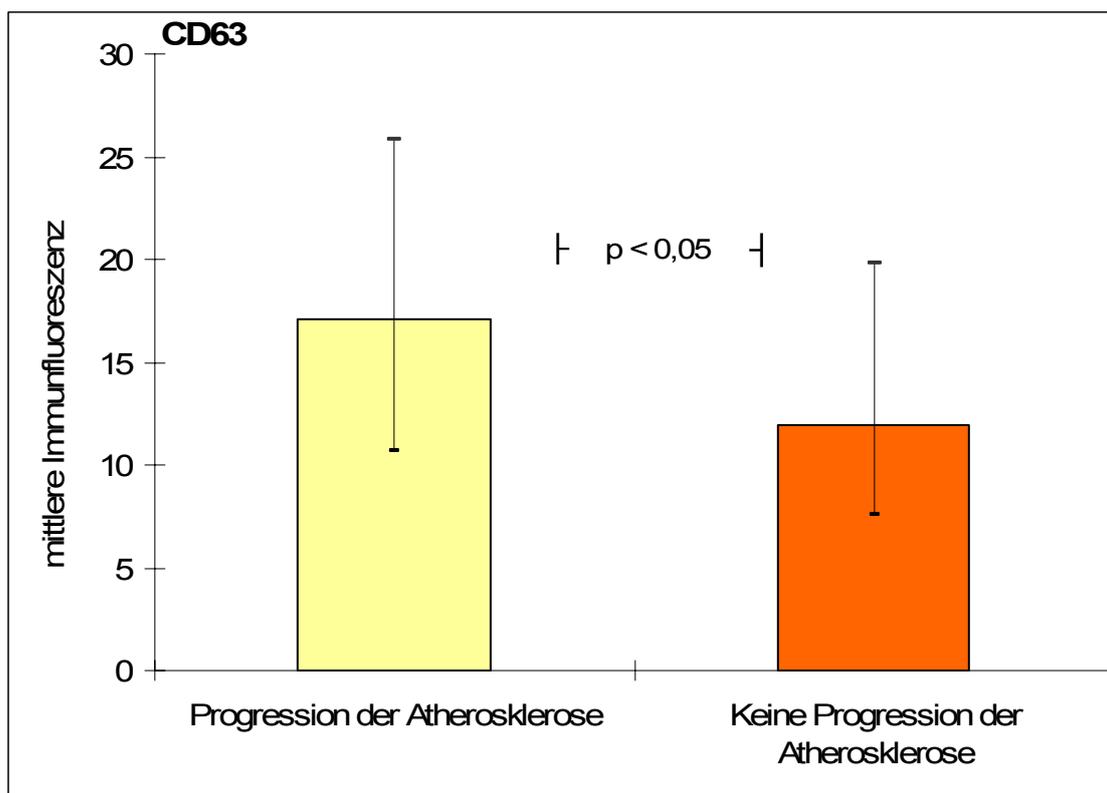
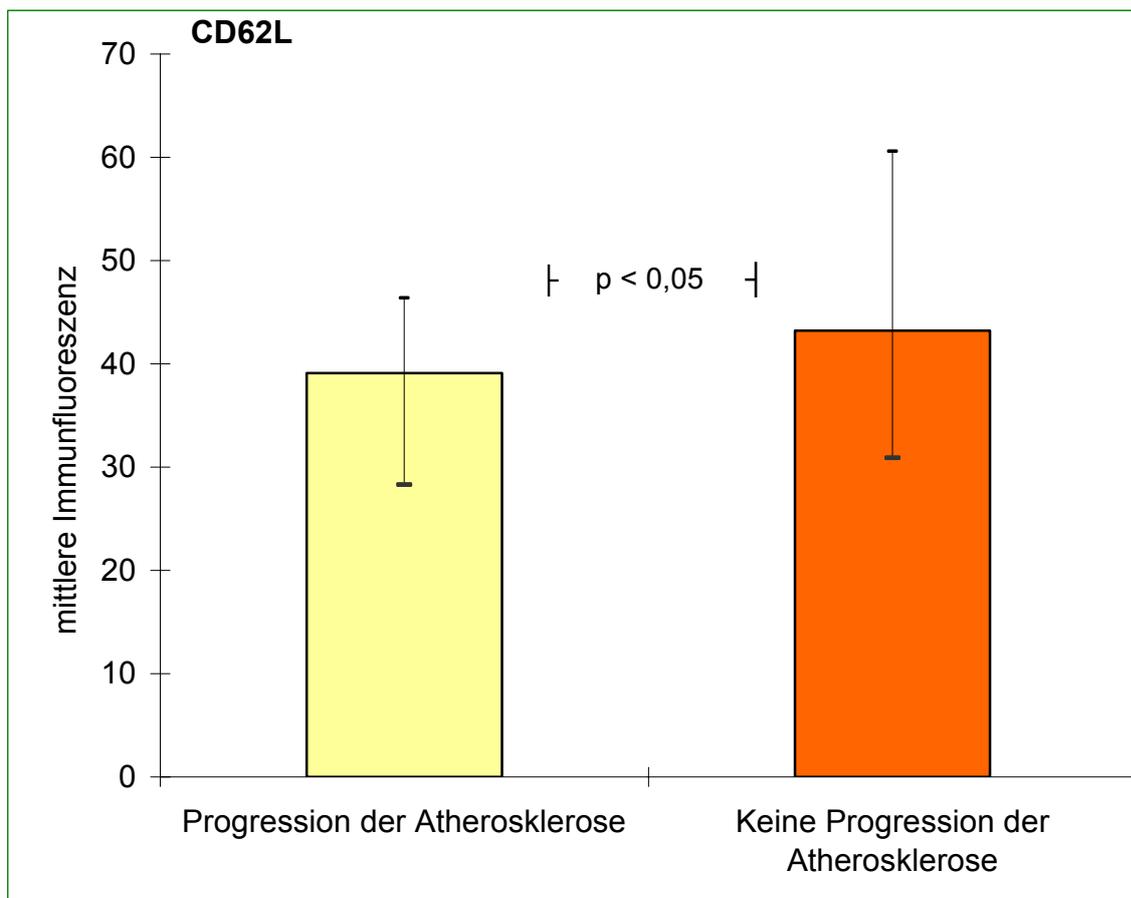


Abb. 18 – **Expression von CD63.** Dargestellt in einem Box-Plot Diagramm ist die Expression von CD63 als mittlere Immunfluoreszenz (Median, [25igste und 75igste Perzentile]. Patienten mit Progression der Atherosklerose zeigen eine signifikant höhere CD63 Expression.

#### 4.2.2. Thrombozyten-Leukozyten Interaktion

##### 4.2.2.1. Nachweis leukozytärer Aktivierungsmarker bei Thrombozyten-Leukozytenkoagregaten

Bei der Expression von CD62L zeigte sich ein signifikanter Unterschied (mittlere Intensität der Immunfluoreszenz; Median, [25igste und 75igste Perzentile]: 39,1 (28,3; 46,4) vs. 43,2 (30,9; 60,6), [ $p=0.026$ ]) zwischen den Patienten mit und ohne Progression der Atherosklerose (Tab. 17, Abb. 19). Die reduzierte CD62L Expression auf Seiten der Patienten mit Atheroskleroseprogression weist auf eine gesteigerte Leukozytenaktivierung hin. Dies hängt damit zusammen, dass nach Stimulation von Leukozyten eine rasche Freisetzung von CD62L von der Zelloberfläche stattfindet („shedding“) und somit CD62L auf den Leukozyten nur noch vermindert nachgewiesen werden kann [92].



**Abb. 19 – Expression von CD62L.** Dargestellt in einem Box-Plot Diagramm ist die Expression von CD62L anhand der mittleren Immunfluoreszenz (Median, [25igste und 75igste Perzentile]. Man erkennt, dass Patienten mit Progression der Atherosklerose eine signifikant geringere CD62L Expression aufweisen.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Expression von CD63 einen unabhängigen Prädiktor für die Progression der Atherosklerose darstellt. Dafür wurde eine multivariate logistische Regressionsanalyse durchgeführt, in die die folgenden Parameter eingeschlossen wurden: Alter, Geschlecht, HbA1c, BMI, Rauchen, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, familiäre Belastung, Diabetesdauer, P-Selektin (CD62P % pos. Thromobzyten), CD63 (MIF) und CD62L (MIF). Unter den getesteten Variablen zeigte die CD63-Immunfluoreszenz eine signifikante unabhängige Assoziation mit der Progression der Atherosklerose (s. Tab. 14).

Tabelle 14 – Ergebnisse der Regressionsanalyse

Getestete Parameter	Regressions- koeffizient b	p-Wert
<b>Prädiktiv</b>		
CD63	-0,034	0,044*
<b>Nicht prädiktiv</b>		
P-Selektin (CD62P%pos. Thr.)	-0,026	0,731
CD62L	0,017	0,085
HbA1c	0,082	0,078
Hypercholesterinämie	-0,219	0,752
Arterieller Hypertonus	0,296	0,683
Nikotinabusus	0,518	0,335
Positive Familienanamnese	-0,417	0,340
BMI	0,009	0,793
Diabetesdauer	-0,044	0,078
Alter	0,029	0,317
Geschlecht (männlich)	-0,392	0,354

\* signifikant:  $p < 0,05$

Für CD63 wurde zusätzlich eine ROC-Kurve bestimmt, um einen Vorhersagewert im Hinblick auf die Progression bei einem einzelnen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 zu berechnen. Die Fläche unter der ROC-Kurve betrug 0,593 und war damit grenzwertig signifikant. Der optimale Cut-Off Wert lag bei 12,3 mit einer Sensitivität von 69,0 % und einer Spezifität von 46,9 % (95% Konfidenzintervall: 50,5 – 68,0).

Aus den Berechnungen folgte, dass Patienten mit erhöhter CD63 Expression ( $>12,3$ ) ein 1,4 faches relatives Risiko (95% Konfidenzintervall: 1,0 - 1,7) hinsichtlich einer Atheroskleroseprogression hatten.

## 5. Diskussion

In dieser Studie wurde erstmalig prospektiv der Einfluß der Thrombozytenaktivierung auf die Zunahme der Intima-Media Dicke bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 untersucht. Dabei zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 eine erhöhte systemische Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung mit einer beschleunigten Progression der Atherosklerose assoziiert ist.

### 5.1. Studienpopulation

Um den Einfluss atherosklerotischer Veränderungen in einem möglichst kurzen Zeitintervall effektiv untersuchen zu können, wurde für diese Studie ein Studienkollektiv mit einem ausgeprägten kardiovaskulären Risikoprofil ausgewählt. Die Studienpopulation bestand ausschließlich aus Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, die sich in regelmäßigen Abständen in der Tagesklinik der Charité – Campus Virchow Klinikum zur Kontrolle und Therapieoptimierung vorstellten. Es handelte sich in der Mehrzahl um adipöse und trotz antidiabetischer Therapie schwer einstellbare Patienten. Der durchschnittliche HbA1c des Patientenkollektivs lag bei  $8,2 \pm 1,7$  %, was einer schlechten Blutzuckereinstellung entspricht. Der durchschnittliche Body-mass-index betrug  $30,9 \pm 5,7$ . Zu den weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren gehörten eine arterielle Hypertonie bei über 92 % der Patienten, Nikotinabusus bei 23 % der Patienten und Hypercholesterinämie, von der 55,8% der Patienten betroffen waren. 65,1% aller Patienten erhielten eine lipidsenkende Therapie mit Statinen. Auch die durchschnittliche Diabetesdauer von  $11 \pm 8,7$  Jahren verweist auf ein Hochrisikokollektiv, in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen. Über die Hälfte der Patienten litt an einer nachgewiesenen Makroangiopathie, wie KHK oder pAVK und etwas mehr als ein Drittel der Patienten an mikroangiopathischen Komplikationen, wie diabetische Nephro- oder Retinopathie. Nach einem Jahr follow-up zeigte sich bei deutlich über der Hälfte der Studienpopulation (Prävalenz von 62,8%) eine Zunahme der IMD. Bezüglich demografischer Daten fand sich nur bei der Geschlechtsverteilung zwischen den Patientengruppen mit und ohne Progression der Atherosklerose ein signifikanter Unterschied. Es ist bekannt, dass männliches Geschlecht ebenfalls einen Risikofaktor für Atherosklerose darstellt, was diesen signifikanten Unterschied erklären könnte. Bei den übrigen demografischen Daten, ebenso wie bei den Labordaten und den Daten zur medikamentösen Therapie ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen mit und ohne Progression der Atherosklerose feststellen. Dies könnte mit der Größe der Studienpopulation zusammenhängen. In unserer Studie traten bei 44 (25,6%) der insgesamt 172 Patienten kardiovaskuläre Ereignisse auf. Eine solch hohe Rate, bei vorwiegend asymptomatischen

---

Patienten (stumme Ischämien), zeigt sehr eindrücklich das ausgeprägte Risikoprofil des Studienkollektivs. Allerdings ist die Patientenanzahl zu klein, um valide Aussagen über die Assoziation zwischen kardiovaskulären Ereignissen und der Thrombozytenaktivierung machen zu können.

## **5.2. Einfluss der Thrombozytenaktivierung auf die Progression der Atherosklerose**

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 eine erhöhte systemische Thrombozytenaktivierung, mit einer beschleunigten Progression der Atherosklerose einhergeht. Sowohl der durch Thrombozyten sezernierte Degranulationsmarker P-Selektin ( $p=0,029$ ) als auch CD63 ( $p=0,046$ ) wurden von Patienten mit Progression der Atherosklerose stärker exprimiert als von Patienten ohne Progression. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass CD63 einen unabhängigen Prädiktor für die Progression der Atherosklerose darstellt.

Atherosklerose ist eine chronisch inflammatorische Erkrankung, welche durch zirkulierende Blutzellen beeinflusst wird, allen voran durch Thrombozyten [51]. Die im Anschluss von Adhäsion und Aktivierung sezernierten biologischen Substanzen sind vermutlich für die durch Thrombozyten vermittelten Effekte auf die Atheroskleroseprogression mitverantwortlich. Sowohl thrombozytäre Chemokine wie Plättchenfaktor 4 und  $\beta$ -TG als auch durch Thrombozyten freigesetzte Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF- $\beta$ , ECGF und VEGF, werden in Bereichen atherosklerotischer Plaques gefunden, wo sie über ihre biologische Aktivität zur Progression der Atherosklerose beitragen könnten [93] [94] [95]. Thrombozyten sind darüberhinaus in der Lage, proatherogene Eigenschaften von Endothelzellen durch Freisetzung von CD40L [33] [34] und Interleukin-1 $\beta$  zu stimulieren [35]. Die Adhäsion von Thrombozyten im Bereich einer Endothel-läsion taucht bereits in der Frühphase der Atherogenese auf, was wiederum über mehrere Schritte zur Entwicklung der Atherosklerose führen kann. Speziell das Adhäsionsmolekül P-Selektin, welches sowohl in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten als auch in den Weibel-Palade Körperchen der Endothelzellen gespeichert wird, spielt hierbei eine zentrale Rolle. Es wird durch Aktivierung von Thrombozyten ausgeschüttet und vermittelt die Rekrutierung zirkulierender Monozyten und die Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten an Endothelzellen. Über eine P-Selektin induzierte Tissue factor Expression auf Monozyten [96], wird dabei auch die Bildung von Thrombozyten-Monozyten und Thrombozyten-Neutrophilen-Koaggregaten gefördert. Die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion führt durch die Bindung von PSGL-1 an den Rezeptor P-Selektin zu einer Aktivierung der Leukozyten, welche daraufhin proinflammatorische

---

Zytokine sezernieren [22]. Zusätzlich ist P-Selektin an der Thrombozyten-Endothelzell- und Thrombozyten-Thrombozyten-Interaktion beteiligt und bewirkt eine Stabilisierung von Plättchenaggregaten durch Beeinflussung des Fibrinogenrezeptors [97]. Dies könnte neben der Aktivierung und Proliferation glatter Muskelzellen zur Entstehung und zum Voranschreiten atherosklerotischer Gefäßveränderungen beitragen [54].

Huo et al. konnten in einer tierexperimentellen Untersuchung zeigen, dass wiederholte Injektionen mit P-Selektin exprimierenden Thrombozyten bei Apo E defizienten Mäusen eine beschleunigte Atherosklerose hervorruft [98]. Dem gegenüber bildeten in einer anderen Studie Mäuse, deren Thrombozyten kein P-Selektin aufwiesen, geringere atherosklerotische Läsionen aus, als Kontrollmäuse mit thrombozytärer P-Selektin Expression [99].

Erhöhte P-Selektin Plasmawerte fanden sich bei Diabetespatienten [100] und bei Patienten mit pAVK, stabiler Angina pectoris und nach akutem Myokardinfarkt [101]. Mit der Höhe löslichen P-Selektins lässt sich anscheinend auch das potentielle Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse abschätzen [102]. Wir konnten nun zeigen, dass bei Diabetespatienten die P-Selektin Expression mit dem Fortschreiten der Atherosklerose korreliert.

CD63 bzw. Glykoprotein 53 wird in den Lysosomen von Thrombozyten gespeichert. Nach Aktivierung gelangt es durch Exozytose an die Zelloberfläche, wobei die genaue physiologische Funktion von CD63 noch unklar ist.

Was für die Expression von P-Selektin zutrifft, konnte in ähnlicher Weise auch für die Expression von CD63 belegt werden. Diabetespatienten und Patienten mit fortgeschrittener Atherosklerose, KHK und nach PTCA haben nachweislich erhöhte Werte für CD63 [103] [104]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen nun, dass auch ein Zusammenhang zwischen der CD63 Expression und der Progression der Atherosklerose bei Diabetespatienten bestehen könnte. Aus den Studienergebnissen geht zudem hervor, dass CD63, bezüglich der Atheroskleroseprogression bei Diabetespatienten, als ein unabhängiger Prädiktor neben anderen Risikofaktoren aufgefasst werden kann.

### **5.3. Bedeutung der Thrombozyten-Leukozyten Interaktion auf die Progression der Atherosklerose**

Neben dem Einfluss der Thrombozytenaktivierung auf die Progression der Atherosklerose konnten wir auch nachweisen, dass bei Diabetespatienten die Progression der Atherosklerose

---

mit einer gesteigerten Leukozytenaktivierung, anhand der reduzierten Expression von CD62L ( $p=0.026$ ), assoziiert ist.

Für die Atherogenese und Atheroskleroseprogression ist die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion, welche durch verschiedene Adhäsionsmoleküle und Chemokine gesteuert wird, von großer Bedeutung. Insbesondere das Membranglykoprotein P-Selektin ermöglicht die Adhäsion von Thrombozyten an entsprechend PSGL-1 exprimierende Immunzellen wie Monozyten, Neutrophilen und Lymphozyten. Diese Bindung führt zu einer Stimulation der Leukozyten, welche daraufhin proinflammatorische Zytokine und verschiedene biologisch aktive Substanzen freisetzen.

Dazu gehört unter anderem L-Selektin, welches von Leukozyten nach Aktivierung von der Zelloberfläche ins Plasma abgegeben wird (shedding) [92]. Dementsprechend findet sich auf der Zelloberfläche aktivierter Leukozyten eine geringere Konzentration von L-Selektin.

CD62L vermittelt die Adhäsion von Leukozyten am vaskulären Endothel und fördert die Rekrutierung zirkulierender Leukozyten [105]. Die damit einhergehende Inflammation, begünstigt die Atherogenese und Thrombusbildung. Eine vermehrte Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion ließ sich u.a. bei Patienten mit instabiler Angina pectoris nachweisen [106]. Neumann et al. untersuchten quantitativ die Anzahl von Leukozyten-Thrombozyten-Koaggregaten bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt, bei denen innerhalb von 3 bis 9 Stunden nach Symptombeginn eine PTCA durchgeführt wurde und verglich diese mit einer Gruppe (Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung), die eine elektive PTCA erhielt [107]. In beiden Kollektiven konnte bereits vor PTCA eine signifikant höhere Leukozyten-Thrombozyten-Adhäsion festgestellt werden als bei gesunden Probanden. Patienten mit akutem Myokardinfarkt wiesen darüber hinaus vor PTCA und über einen längeren Zeitraum nach PTCA, im Vergleich zu den anderen Gruppen, die höchste Anzahl von Leukozyten-Thrombozyten-Koaggregaten auf [108]. In Übereinstimmung dazu kommen Furmann et. al zu dem Ergebnis, dass erhöhte Monozyten-Thrombozyten-Koaggregate als frühe Marker eines akuten Myokardinfarktes angesehen werden können [109].

Auch bei Patienten mit zerebrovaskulärer Ischämie (TIA und Apoplexie) gibt es nachweislich eine erhöhte Thrombozytenaktivierung und Thrombozyten-Leukozyten Interaktion mit verminderter Expression von L-Selektin [110] [111].

---

#### 5.4. Klinische Bedeutung

In zahlreichen Studien konnte bereits eine erhöhte systemische Thrombozytenaktivierung bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen werden [112] [22] [10] [113] [17]. Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhter systemischer Thrombozytenaktivierung und einer Reihe unterschiedlicher atherosklerotischer Veränderungen beschrieben, unter anderem bei der koronaren Herzkrankheit, bei der Transplantat-Vaskulopathie und bei zerebrovaskulären Erkrankungen [114] [115] [116]. Bisher fehlte jedoch eine prospektive Analyse zur erhöhten systemischen Thrombozytendegranulation und dem Einfluss auf die Progression der Atherosklerose bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2. Mit dieser Studie liegen nun erstmalig Ergebnisse zum Einfluss der systemischen Thrombozytenaktivierung auf die Zunahme der IMD in einem bestimmten Zeitraum vor. Nach den vorliegenden Daten zu urteilen, könnte die Thrombozytendegranulation nicht nur mit der Wanddicke (IMD) der Carotisarterie zusammenhängen, sondern auch einen unabhängigen Risikofaktor für die Atheroskleroseprogression bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 darstellen.

Im Folgenden soll auf einige ausgewählte Arbeiten eingegangen werden, die sich ebenfalls mit der Thrombozytenaktivierung und Atherosklerose bei Diabetespatienten beschäftigt haben.

Koyama et al. untersuchten insgesamt 517 Probanden, darunter 187 Diabetespatienten, hinsichtlich der Expression von P-Selektin, der Intima-Media-Dicke und kardiovaskulärer Risikofaktoren [117]. Dabei fanden sie eine Assoziation zwischen der Thrombozytendegranulation und der arteriellen Wanddicke bei Menschen mit kardiovaskulären Risikofaktoren [117].

Im Gegensatz dazu, konnte in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation zwischen initialer IMD und der thrombozytären Degranulation von P-Selektin festgestellt werden [117]. Eine Erklärung dafür könnten möglicherweise Unterschiede in der Zusammensetzung der Studienpopulationen, methodologischen Abweichungen bei der Ultraschallmessung der IMD und der Messung der P-Selektin Expression liefern.

Unsere Studienpopulation bestand ausschließlich aus Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, während der Anteil an Diabetespatienten in der Studienpopulation von Koyama bei nur 36,1 % lag. Patienten in der Koyama Gruppe wiesen darüberhinaus einen niedrigeren mittleren body mass index von  $23,1 \pm 3,2$  kg/m<sup>2</sup> (vs.  $30,9 \pm 5,7$  kg/m<sup>2</sup>), einen niedrigeren HbA1c von  $5,7 \pm 1,4$  % (vs.  $8,2 \pm 1,7$  %), ein leicht geringeres Durchschnittsalter von  $56,8 \pm 12,0$  (vs.  $63,7 \pm 8,2$  Jahre) und einen geringen Anteil an Patienten mit arteriellem Hypertonus auf.

---

Bei der Durchführung der Ultraschallmessungen der IMD gab es nennenswerte Unterschiede. In der Studie von Koyama wurde immer im Bereich der am weitesten fortgeschrittenen atherosklerotischen Veränderung der ACC gemessen und daher die maximale IMD der ACC mit der Expression von P-Selektin korreliert. Uns interessierte jedoch vielmehr die Progression der Atherosklerose, so dass nicht die maximale IMD, sondern die IMD beidseits an definierten Stellen, 30 mm proximal der Carotisbifurkation, zu Studienbeginn und nach einem Jahr gemessen. Es blieb unberücksichtigt, ob an diesen Stellen die stärksten atherosklerotischen Veränderungen vorhanden waren oder nicht. Die bilaterale IMD wurde dann schliesslich aus der Summe der Messungen für die rechte und linke A. carotis communis berechnet:  $IMD = IMD^{rechts} + IMD^{links}$ . Die Differenz innerhalb eines Jahres ( $\Delta IMD$ ) wurde wie bereits beschrieben ermittelt und als Index für die Progression der IMD verwendet. Aus diesem Grund besteht für die gemessene IMD von Koyama und die gemessene IMD der vorliegenden Studie nur eine eingeschränkte Vergleichbarkeit. Eine weitere methodologische Abweichung betrifft die durchflusszytometrische Messung der thrombozytären P-Selektin Expression. Koyama et al. sammelten die Blutproben in 0,313 % igen Natrium-Citrat Röhrchen und fixierten anschließend mit 0,1% Formaldehyd/PBS Lösung. Wir verarbeiteten hingegen Vollblutproben und fixierten direkt mit der Methacrolein enthaltenen Lösung Cyfix II, wie bereits bei Ruf et. al beschrieben, um das Risiko einer artifiziellen Thrombozytenaktivierung zu minimieren [118]. Die wichtige Frage zum Einfluss der systemischen Thrombozytenaktivierung auf die Atheroskleroseprogression konnte von Koyama et al. jedoch auf Grund des gewählten Studiendesigns nicht beantwortet werden.

In einer Arbeit von Yamasaki et al. wurde beschrieben, dass sowohl die initiale IMD als auch der baseline HbA1c-Wert einen unabhängigen Prädiktor für die Progression der IMD darstellen könnten [119]. Dort wurden bei insgesamt 287 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 ohne bisherige KHK oder zerebrovaskulärer Erkrankungen die Intima-Media Dicke und kardiovaskuläre Risikofaktoren zu Studienbeginn und nach 3,1 Jahren untersucht [119]. Anhand der vorliegenden Daten findet sich keine Bestätigung für die von Yamasaki gefundenen Ergebnisse, wofür vermutlich ebenfalls ein anderes Studiendesign und Unterschiede zwischen den Studienkollektiven ursächlich sind. Die Studienpopulation von Yamasaki wies, ähnlich wie die von Koyama, einen signifikant geringeren mittleren body mass index von  $22.6 \pm 0.17 \text{ kg/m}^2$  (vs.  $30.9 \pm 5.7 \text{ kg/m}^2$ ) auf. Darüber hinaus wurden bei Yamasaki alle Patienten mit einer vorhandenen Mikro- und Makroangiopathie ausgeschlossen.

---

## 5.5. Limitationen der Studie

Zur Feststellung und Quantifizierung atherosklerotischer Veränderungen wurde in dieser prospektiven Studie die Carotis-B-Mode Sonografie zur Bestimmung der Intima-Media Dicke eingesetzt. Sämtliche sonografischen Messungen wurden von ein und demselben erfahrenen Ultraschalluntersucher vorgenommen, wodurch die Störgröße der Interobservervariabilität vermieden werden konnte. Die Messung wurde direkt am Patienten und nicht erst im Anschluss, anhand aufgenommener Videosequenzen, vorgenommen. Dem Untersucher waren die Ergebnisse der Messungen zur Thrombozytenaktivierung unbekannt. Da die Durchführung der Ultraschalluntersuchungen zudem seriell erfolgte, konnten in einem relativ kurzen Zeitintervall paarweise Messdaten für eine große Anzahl von Patienten gewonnen werden. Ein großer Vorteil der B-Mode Sonografie bestand darin, über die Messung der Intima-Media Dicke nicht-invasiv und hochauflösend frühzeitig atherosklerotische Gefäßwandveränderungen darstellen und quantifizieren zu können. Somit werden sämtliche Stadien von beginnender Atherogenese bis zu weit fortgeschrittener Atherosklerose erfasst [120]. Limitierend für die Messung der IMD ist, dass es sich hierbei um eine punktuelle Messung handelt. Atherosklerotische Veränderungen im Gefäßbett weisen jedoch keine gleichmäßige Verteilung und keinen einheitlichen Ausprägungsgrad auf. Demgegenüber konnte belegt werden, dass die mittels Ultraschall gemessene Intima-Media Dicke nicht nur eine starke Korrelation mit kardiovaskulären Risikofaktoren aufweist, sondern auch als ein Surrogatmarker der Atherosklerose angesehen werden kann [121] [71] [72] [73] [75]. Hulthe et al. konnten auch zeigen, dass die Intima-Media Dicke eine enge Beziehung zum Grad der Koronarsklerose aufweist [122]. Ausserdem besteht ein Zusammenhang zwischen erhöhter Intima-Media Dicke und einem signifikant erhöhten Risiko für Myokardinfarkt und Schlaganfall [74].

In dieser Studie wurde die Intima-Media Dicke in einem zeitlichen Verlauf, bilateral an genau definierten Stellen in der Arteria carotis communis, gemessen. Bei vorhandenen Plaques wurden weder Volumina noch die genaue Plaquezusammensetzung zur Unterscheidung fibrotischer „stabiler“ und lipidreicher/hämorrhagischer „instabiler“ Plaques bestimmt, da auf Grund der Fragestellung die Intima-Media Dicke zur Verlaufsbeurteilung der Atheroskleroseprogression von primärem Interesse war. Im Gegensatz zu der in anderen Studien gebräuchlichen durchschnittlichen IMD, verwendeten wir zur Bestimmung der Atheroskleroseprogression nach Analyse der vorliegenden Daten, die aus unserer Sicht sensitivere  $\Delta$ IMD.

Der Beobachtungszeitraum von 1 Jahr follow-up zur Untersuchung des Einflusses einer systemischen Thrombozytenaktivierung auf die Progression der Atherosklerose orientierte sich

---

an vorangegangenen Studien. Zu berücksichtigen ist, dass ein solcher Beobachtungszeitraum ein sehr kurzes Zeitintervall darstellt, wodurch nur ein Ausschnitt einer über Jahrzehnte verlaufende Atherosklerose erfasst wird. Dennoch waren bereits innerhalb dieses Zeitraums signifikante Unterschiede in den Populationen mit und ohne Atheroskleroseprogression, bezüglich der Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung nachweisbar.

Der von uns verwendete durchflusszytometrische Test zur Aktivitätsbestimmung von Thrombozyten hat sich bei einer Reihe unterschiedlichster Fragestellungen bewährt [55] [87] [82].

Bei der Probengewinnung und/oder –weiterverarbeitung besteht potentiell das Risiko einer artifiziellen Aktivierung von Thrombozyten *in vitro*. Daher wurde die Blutabnahme zur Probengewinnung möglichst schonend durchgeführt und der erste gewonnene Milliliter Blut verworfen. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte in speziellen Kunststoffröhrchen (Falcon-Röhrchen). Dieses Material führt im Gegensatz zu Glasoberflächen zu keiner Aktivierung der Thrombozyten. Zusätzlich wurden ausschließlich mit Cyfix II konservierte Vollblutproben verarbeitet und auf eine schnelle Weiterverarbeitung der Proben geachtet. Die Vollblut Durchflusszytometrie ermöglicht eine direkte Analyse von Thrombozyten in ihrem nativen Milieu mit einer hohen Sensitivität und nur minimaler Thrombozytenaktivierung [83]. Vor den Messungen erfolgte eine exakte Kalibrierung des FACS – Gerätes mittels Fluoreszenz-Mikrobeads. Parallel zu allen Patientenproben wurden Kontrollproben gesunder Probanden verarbeitet und simultan gemessen.

Abschließend muss noch eingeräumt werden, dass in der vorliegenden Studie eine Evidenz für den Zusammenhang Atherosklerose und Thrombozytenaktivierung fehlt. Es lässt sich nicht ausschließen, dass eine möglicherweise zufällige Korrelation von Atheroskleroseprogression und Thrombozytenaktivierung sekundären Einflussgrößen unterliegen. Mehrere klinische Interventionsstudien weisen allerdings auf einen unmittelbaren Zusammenhang hin [123] [124].

## **5.6. Ausblick**

Da eine vermehrte systemische Thrombozytenaktivierung bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 das Risiko für die Atheroskleroseprogression erhöht, lässt sich vermuten, dass eine intensivierete antithrombozytäre Therapie die Atheroskleroseprogression verringern kann. Es existiert eine Reihe von Medikamenten, die die Thrombozytenfunktion auf unterschiedliche Weise beeinflussen können und denen bei Behandlung und Prävention der Atherosklerose eine zentrale Bedeutung zukommt. Hierzu gehören die Acetylsalicylsäure, die Thienopyridine und

---

die selektiven GPIIb-IIIa Rezeptorantagonisten. ASS vermittelt seine Wirkung über die Hemmung der Zyklooxygenase-1. Thienopyridine, wie Clopidogrel und Ticlopidin bzw. deren Metabolite, blockieren ADP-Rezeptoren (P2Y<sub>12</sub>) auf der Thrombozytenoberfläche und somit die Thrombozytenaktivierung. Selektive GPIIb-IIIa Rezeptorantagonisten, wie Abciximab, einem humanisierten chimären Fab-Fragment sowie Eptifibatid, Tirofiban und Lamifiban, verhindern die Bindung von Fibrinogen an thrombozytäre Fibrinogenrezeptoren. Es existieren bereits sowohl tierexperimentelle Studien als auch klinische Studien, die den vorteilhaften Aspekt einer antithrombozytären Therapie, hinsichtlich der Progression der Atherosklerose belegen.

In tierexperimentellen Untersuchungen konnte beispielweise gezeigt werden, dass eine dauerhafte Inhibition der systemischen Thrombozytenaktivierung bei Apolipoprotein E-defizienten Mäusen zu einer Reduktion der Leukozyten Akkumulation und einer verminderten Atheroskleroseprogression führt [36]. Eine klinische Studie von Ranke et al. untersuchte Patienten, bezüglich einer Plaquezunahme in den Carotisarterien innerhalb eines Jahres, unter Therapie mit niedrig- (50 mg) oder hochdosiertem (900 mg) Aspirin [124]. Dabei zeigte sich ebenfalls, dass eine Thrombozyteninhibition mittels Aspirin in dosisabhängiger Weise zu einer Verlangsamung der Plaquezunahme führt [124]. Die Effektivität einer antithrombozytären Langzeit -Therapie zur Verringerung der IMD Progression bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 wurde auch von Kodama et al. untersucht [123]. Er verglich dabei Patienten mit unterschiedlichen antithrombozytären Therapiestrategien (Ticlopidin vs. ASS) und eine Kontrollgruppe, die ein Placebo erhielt. Nach einer Follow-up Phase von  $3,0 \pm 0,06$  Jahren zeigte sich in der Kontrollgruppe ohne medikamentöse Therapie eine signifikant höhere Progression der IMD ( $0,067 \pm 0,009$  mm/Jahr) als in der Gruppe mit Ticlopidin ( $0,034 \pm 0,013$  mm/Jahr) oder ASS ( $0,033 \pm 0,010$  mm/Jahr). Diese Daten sprechen dafür, dass antithrombozytäre Substanzen, unberücksichtigt ihrer pharmakologischen Wirkungsmechanismen, zu einer Abschwächung der Progression der IMD der Carotisarterie bei asymptomatischen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 führen könnten. Des weiteren existieren mehrere große Studien, in denen auch ein möglicher Nutzen einer kombinierten Therapie von Clopidogrel und Aspirin versus Aspirin-Monotherapie, im Hinblick auf die primäre und sekundäre Prävention kardiovaskulärer Ereignisse, untersucht wurde. Bei Patienten nach Apoplexie konnte bei der Kombinationstherapie von Clopidogrel und Aspirin eine stärkere Inhibition der Plättchenaggregation nachgewiesen werden [125].

Eine vermehrte Thrombozytenaktivierung könnte auch erklären, warum insbesondere Diabetespatienten von einer Sekundärprophylaxe in Form einer dualen Thrombozyten-

---

aggregationshemmung bezüglich des Auftretens kardiovaskulärer Ereignisse profitieren. In der MATCH Studie wurde eine Monotherapie mit Clopidogrel mit einer dualen Therapie mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel zur Sekundärprevention bei Patienten nach ischämischem Schlaganfall oder TIA verglichen. Dabei traten in der Gruppe, welche eine duale Plättchenhemmung erhielt, weniger vaskuläre Ereignisse auf als in der Gruppe mit Clopidogrel und Placebo, allerdings war dies nicht signifikant [126]. Analysiert man die Subgruppen dieser Studie, so fällt speziell für Diabetespatienten die Risikoreduktion durch eine Kombinationstherapie noch deutlicher aus [127].

Eine weitere große klinische Studie, die einen möglichen Vorteil einer langfristigen Kombinationstherapie aus ASS und Clopidogrel gegenüber einer ASS Monotherapie zur Primär- und Sekundärprophylaxe atherothrombotischer Ereignisse untersuchte, war die CHARISMA Studie [128]. Dabei konnte zwar im Ergebnis keine Überlegenheit der dualen Plättchenaggregationshemmung festgestellt werden. In der Subgruppe der „symptomatischen“ Patienten kam es dennoch zu einer marginal signifikanten Risikoreduktion, bezüglich primärer Endpunkte, wie Myokardinfarkt oder Apoplexie. Als symptomatische Patienten wurden jene Patienten bezeichnet, bei denen bereits eine kardiovaskuläre Erkrankung dokumentiert war.

Es läßt sich vermuten, dass der Effekt einer thrombozyteninhibierenden Therapie letztendlich u.a. mit dem Ausmaß der bestehenden Thrombozytenaktivierung zusammenhängt. Und es zeichnet sich darüberhinaus ab, dass langfristig eine individuelle antithrombozytäre Therapie vor allem für Hochrisikopatienten wie Diabetiker favorisiert werden sollte. An dieser Stelle sei noch die erst kürzlich veröffentlichte OPTIMUS Studie erwähnt, die Diabetespatienten mit nachweislich suboptimalem Ansprechen auf die Standarddosis Clopidogrel von 75 mg, hinsichtlich antithrombozytärer Effekte, untersuchte [129]. Dabei ließ sich in einer der Subgruppen, die eine doppelte Dosis Clopidogrel von 150 mg erhielt, eine signifikant stärkere Thrombozyteninhibition (ADP-induzierte Plättchenaggregation) feststellen. Nach Rückkehr zur Standarddosis war dieser Effekt wieder auf dem messbar niedrigeren Ausgangsniveau.

Den Vorteilen einer verbesserten Thrombozyteninhibition mittels dualer antithrombozytärer Therapie, steht jedoch auf der anderen Seite ein erhöhtes Risiko für intrakranielle und gastrointestinale Blutungen gegenüber. Um zu zeigen, ob eine duale antithrombozytäre Therapie einer Monotherapie, hinsichtlich einer Reduktion der Atheroskleroseproduktion überlegen ist, bedarf es noch weiterer Studien. Hierzu ist eine Studie vorstellbar, die bei Diabetespatienten die Zunahme der Intima-Media Dicke unter konventioneller antithrombozy-

---

tärer und intensivierter antithrombozytärer Therapie in einem definierten Zeitraum miteinander vergleicht.

## 6. Zusammenfassung

Weltweit sind schätzungsweise 100 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt [3] mit steigender Inzidenz in den westlichen Industrienationen. Auf Grund einer akzelerierten Atherosklerose und der im Verlauf der Erkrankung auftretenden mikro- und makroangiopathischen Komplikationen, zählt Diabetes mellitus zu den Hauptursachen sowohl der koronaren Herzerkrankung, der ischämischen Apoplexie, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit als auch der diabetischen Retinopathie und der chronischen Niereninsuffizienz [1] [2]. Die Prädisposition für Atherosklerose bei Diabetespatienten ist auf zahlreiche Funktionsveränderungen verschiedener Zellen zurückzuführen, besonders von Thrombozyten, welche bei der Atherogenese eine herausragende Rolle spielen. Es wurden bereits eine erhöhte primäre und sekundäre Thrombozytenaggregation [11] [13], eine gesteigerte Thrombozytendegranulation, mit Freisetzung von  $\beta$ -Thromboglobulin und Plättchenfaktor 4 aus den  $\alpha$ -Granula [16] [17] und eine vermehrte Oberflächenexpression und Aktivierung des thrombozytären Glykoproteins GPIIb-IIIa [21] bei Diabetespatienten beschrieben. Bisher konnte jedoch noch kein klinischer Zusammenhang zwischen Progression der Atherosklerose und einer systemischen Thrombozytenaktivierung nachgewiesen werden. Mit der vorliegenden Studie wollten wir zu dieser Fragestellung beitragen und herausfinden, ob eine systemische Thrombozytenaktivierung mit einer Progression der Atherosklerose, gemessen als Zunahme der IMD, bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert ist. Dazu wurden prospektiv insgesamt 172 Typ 2 Diabetespatienten zu Studienbeginn und nach einer follow-up Phase von einem Jahr, bezüglich der Expression thrombozytärer und leukozytärer Antigene und der Zunahme der Intima-Media Dicke der Carotisarterie untersucht. Die Intima-Media Dicke der Arteria carotis communis wurde beidseits zu Studienbeginn und nach einem Jahr gemessen. Die Thrombozytenaktivierung wurde durch den Einsatz immunologischer Marker (CD62P, CD63, CD62L) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Prävalenz der Atheroskleroseprogression ( $\Delta$ IMD>0) betrug in dieser Studienpopulation 62,8%. Wir fanden heraus, dass Diabetespatienten mit Progression der IMD eine signifikant höhere Expression von P-Selektin und CD63 und eine verminderte Expression von CD62L (Leukozytenaktivierung), im Vergleich zu Patienten mit stabiler Atherosklerose aufwiesen. Darüber hinaus ergab eine multivariate logistische Regressionanalyse, dass die Thrombozytendegranulation von CD63 einen Prädiktor für die Progression der IMD, unabhängig von klassischen Risikofaktoren und HbA1c, bei Diabetespatienten darstellt. Unsere Untersuchungsergebnisse unterstützen die Annahme, dass Patienten mit Diabetes mellitus möglicherweise von einer intensivierten antithrombozytären Therapie, hinsichtlich der Progression

---

der Atherosklerose, profitieren könnten. Die Evaluation solch einer optimalen anti-thrombozytären Behandlung bleibt zukünftigen Studien vorbehalten.

## Summary

Approximately 100 million people worldwide are diagnosed for having diabetes mellitus, most of them type 2 diabetes, with increasing incidence in western society [3]. Accelerated atherosclerosis and micro- and macrovascular complications make diabetes a leading cause of coronary artery disease, ischemic stroke, retinopathy and chronic renal failure [1] [2]. It increases the risk of cardiovascular morbidity and mortality independently from other risk factors [4]. The predisposition for atherosclerosis results potentially from different cell dysfunctions including thrombocytes, which play a pivotal role in atherogenesis. An altered platelet function like enhanced primary and secondary platelet aggregation [13] [11], platelet activation with release of cytokines and chemokines, such as  $\beta$ -thromboglobulin and platelet factor 4 [16] [17], and surface expression and activation of platelet glycoprotein IIb-IIIa complex [21] has been described in patients with diabetes. However, a clinical association between progression of atherosclerosis and systemic platelet activation has not been proven so far. With the present study we wanted to contribute to this question and to investigate whether systemic platelet activation is associated with progression of carotid artery disease in type 2 diabetes patients using intima-media thickness (IMT). We prospectively examined the relation between systemic platelet activation and progression of carotid wall thickness in 172 patients with type 2 diabetes within one year. The IMT of the common carotid artery was measured bilaterally at study entry and after one year. Platelet activation was assessed with the use of immunological markers of platelet activation (CD62P, CD63, CD62L) and flow cytometry. The prevalence for progression of atherosclerotic carotid disease in this population was 62.8%. We found that diabetic patients with progression of the IMT had a significantly increased expression of P-Selectin and CD63 and reduced expression of L-Selectin (leukocyte activation) compared to patients with stable carotid disease. Moreover a multivariate logistic regression analysis revealed that degranulation of platelet CD63 is a predictor for progression of IMT independently of classical risk factors and HbA1c in diabetic patients. Our findings support that patients with diabetes could possibly benefit from an intensified antiplatelet therapy. The evaluation of such optimal antiplatelet treatment is reserved to future studies.

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] Beckman, J. A.; Creager, M. A. und Libby, P. (2002): Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management, *JAMA* (Band 287), Nr. 19, Seite 2570-2581. URL: PM:12020339
- [2] Feher, M. D. (2004): Diabetes: preventing coronary heart disease in a high risk group, *Heart* (Band 90 Suppl 4), Seite iv18-iv21. URL: PM:15145907
- [3] Amos, A. F.; McCarty, D. J. und Zimmet, P. (1997): The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010, *Diabet.Med.* (Band 14 Suppl 5), Seite S1-85. URL: PM:9450510
- [4] Resnick, H. E.; Shorr, R. I.; Kuller, L.; Franse, L. und Harris, T. B. (2001): Prevalence and clinical implications of American Diabetes Association-defined diabetes and other categories of glucose dysregulation in older adults: the health, aging and body composition study, *J.Clin.Epidemiol.* (Band 54), Nr. 9, Seite 869-876. URL: PM:11520645
- [5] Jacoby, R. M. und Nesto, R. W. (1992): Acute myocardial infarction in the diabetic patient: pathophysiology, clinical course and prognosis, *J.Am.Coll.Cardiol.* (Band 20), Nr. 3, Seite 736-744. URL: PM:1512357
- [6] De Vriese, A. S.; Verbeuren, T. J.; Van, de, V; Lameire, N. H. und Vanhoutte, P. M. (2000): Endothelial dysfunction in diabetes, *Br.J.Pharmacol.* (Band 130), Nr. 5, Seite 963-974. URL: PM:10882379
- [7] Zou, M.; Yesilkaya, A. und Ullrich, V. (1999): Peroxynitrite inactivates prostacyclin synthase by heme-thiolate-catalyzed tyrosine nitration, *Drug Metab Rev.* (Band 31), Nr. 2, Seite 343-349. URL: PM:10335439
- [8] Inoguchi, T.; Li, P.; Umeda, F.; Yu, H. Y.; Kakimoto, M.; Imamura, M.; Aoki, T.; Etoh, T.; Hashimoto, T.; Naruse, M.; Sano, H.; Utsumi, H. und Nawata, H. (2000): High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells, *Diabetes* (Band 49), Nr. 11, Seite 1939-1945. URL: PM:11078463
- [9] Suzuki, L. A.; Poot, M.; Gerrity, R. G. und Bornfeldt, K. E. (2001): Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels, *Diabetes* (Band 50), Nr. 4, Seite 851-860. URL: PM:11289052
- [10] Tschoepe, D.; Roesen, P.; Schwippert, B. und Gries, F. A. (1993): Platelets in diabetes: the role in the hemostatic regulation in atherosclerosis, *Semin.Thromb.Hemost.* (Band 19), Nr. 2, Seite 122-128. URL: PM:8356457
- [11] Colwell, J. A. und Nesto, R. W. (2003): The platelet in diabetes: focus on prevention of ischemic events, *Diabetes Care* (Band 26), Nr. 7, Seite 2181-2188. URL: PM:12832332
- [12] Winocour, P. D.; Laimins, M. und Colwell, J. A. (1984): Platelet survival in streptozotocin-induced diabetic rats, *Thromb.Haemost.* (Band 51), Nr. 3, Seite 307-312. URL: PM:6495251
- [13] Sagel, J.; Colwell, J. A.; Crook, L. und Laimins, M. (1975): Increased platelet aggregation in early diabetes mellitus, *Ann.Intern.Med.* (Band 82), Nr. 6, Seite 733-738. URL: PM:1138583
- [14] Watala, C.; Boncer, M.; Golanski, J.; Koziolkiewicz, W.; Trojanowski, Z. und Walkowiak, B. (1998): Platelet membrane lipid fluidity and intraplatelet calcium mobilization in type 2 diabetes mellitus, *Eur.J.Haematol.* (Band 61), Nr. 5, Seite 319-326. URL: PM:9855247
- [15] Li, Y.; Woo, V. und Bose, R. (2001): Platelet hyperactivity and abnormal Ca(2+) homeostasis in diabetes mellitus, *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* (Band 280), Nr. 4, Seite H1480-H1489. URL: PM:11247757

- [16] Tschoepe, D.; Driesch, E.; Schwippert, B. und Lampeter, E. F. (1997): Activated platelets in subjects at increased risk of IDDM. DENIS Study Group. Deutsche Nikotinamid Interventionsstudie, *Diabetologia* (Band 40), Nr. 5, Seite 573-577. URL: PM:9165226
- [17] Yazbek, N.; Bapat, A. und Kleiman, N. (2003): Platelet abnormalities in diabetes mellitus, *Coron.Artery Dis.* (Band 14), Nr. 5, Seite 365-371. URL: PM:12878901
- [18] Martina, V.; Bruno, G. A.; Trucco, F.; Zumpano, E.; Tagliabue, M.; Di, Bisceglie C. und Pescarmona, G. (1998): Platelet cNOS activity is reduced in patients with IDDM and NIDDM, *Thromb.Haemost.* (Band 79), Nr. 3, Seite 520-522. URL: PM:9531033
- [19] Vinik, A. I.; Erbas, T.; Park, T. S.; Nolan, R. und Pittenger, G. L. (2001): Platelet dysfunction in type 2 diabetes, *Diabetes Care* (Band 24), Nr. 8, Seite 1476-1485. URL: PM:11473089
- [20] Halushka, P. V.; Rogers, R. C.; Loadholt, C. B. und Colwell, J. A. (1981): Increased platelet thromboxane synthesis in diabetes mellitus, *J.Lab Clin.Med.* (Band 97), Nr. 1, Seite 87-96. URL: PM:7452084
- [21] Tschoepe, D.; Roesen, P.; Kaufmann, L.; Schauseil, S.; Kehrel, B.; Ostermann, H. und Gries, F. A. (1990): Evidence for abnormal platelet glycoprotein expression in diabetes mellitus, *Eur.J.Clin.Invest* (Band 20), Nr. 2, Seite 166-170. URL: PM:2112481
- [22] Tschoepe, D.; Rauch, U. und Schwippert, B. (1997): Platelet-leukocyte-cross-talk in diabetes mellitus, *Horm.Metab Res.* (Band 29), Nr. 12, Seite 631-635. URL: PM:9497901
- [23] Calverley, D. C.; Brass, E.; Hacker, M. R.; Tsao-Wei, D. D.; Espina, B. M.; Pullarkat, V. A.; Hodis, H. N. und Groshen, S. (2002): Potential role of platelet FcγRIIA in collagen-mediated platelet activation associated with atherothrombosis, *Atherosclerosis* (Band 164), Nr. 2, Seite 261-267. URL: PM:12204796
- [24] Mackie, I. J. und Bull, H. A. (1989): Normal haemostasis and its regulation, *Blood Rev.* (Band 3), Nr. 4, Seite 237-250. URL: PM:2692745
- [25] Siess, W. (1989): Molecular mechanisms of platelet activation, *Physiol Rev.* (Band 69), Nr. 1, Seite 58-178. URL: PM:2536184
- [26] Willerson, J. T.; Golino, P.; Eidt, J.; Campbell, W. B. und Buja, L. M. (1989): Specific platelet mediators and unstable coronary artery lesions. Experimental evidence and potential clinical implications, *Circulation* (Band 80), Nr. 1, Seite 198-205. URL: PM:2661053
- [27] Siess, W. (1989): Molecular mechanisms of platelet activation, *Physiol Rev.* (Band 69), Nr. 1, Seite 58-178. URL: PM:2536184
- [28] Kameyoshi, Y.; Dorschner, A.; Mallet, A. I.; Christophers, E. und Schroder, J. M. (1992): Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils, *J.Exp.Med.* (Band 176), Nr. 2, Seite 587-592. URL: PM:1380064
- [29] Klinger, M. H.; Wilhelm, D.; Bubel, S.; Sticherling, M.; Schroder, J. M. und Kuhnel, W. (1995): Immunocytochemical localization of the chemokines RANTES and MIP-1 alpha within human platelets and their release during storage, *Int.Arch.Allergy Immunol.* (Band 107), Nr. 4, Seite 541-546. URL: PM:7542516
- [30] Yan, Z.; Zhang, J.; Holt, J. C.; Stewart, G. J.; Niewiarowski, S. und Poncz, M. (1994): Structural requirements of platelet chemokines for neutrophil activation, *Blood* (Band 84), Nr. 7, Seite 2329-2339. URL: PM:7919350
- [31] Palabrica, T.; Lobb, R.; Furie, B. C.; Aronovitz, M.; Benjamin, C.; Hsu, Y. M.; Sajer, S. A. und Furie, B. (1992): Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets, *Nature* (Band 359), Nr. 6398, Seite 848-851. URL: PM:1279433
- [32] Hartwell, D. W. und Wagner, D. D. (1999): New discoveries with mice mutant in endothelial and platelet selectins, *Thromb.Haemost.* (Band 82), Nr. 2, Seite 850-857. URL: PM:10605793
- [33] Henn, V.; Slupsky, J. R.; Grafe, M.; Anagnostopoulos, I.; Forster, R.; Muller-Berghaus, G. und Kroczeck, R. A. (1998): CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells, *Nature* (Band 391), Nr. 6667, Seite 591-594. URL: PM:9468137
- [34] May, A. E.; Kalsch, T.; Massberg, S.; Herouy, Y.; Schmidt, R. und Gawaz, M. (2002): Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alphaIIb)beta3 on platelets upregulates CD40L and

- triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells, *Circulation* (Band 106), Nr. 16, Seite 2111-2117. URL: PM:12379582
- [35] Gawaz, M.; Brand, K.; Dickfeld, T.; Pogatsa-Murray, G.; Page, S.; Bogner, C.; Koch, W.; Schomig, A. und Neumann, F. (2000): Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis, *Atherosclerosis* (Band 148), Nr. 1, Seite 75-85. URL: PM:10580173
- [36] Massberg, S.; Brand, K.; Gruner, S.; Page, S.; Muller, E.; Muller, I.; Bergmeier, W.; Richter, T.; Lorenz, M.; Konrad, I.; Nieswandt, B. und Gawaz, M. (2002): A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation, *J.Exp.Med.* (Band 196), Nr. 7, Seite 887-896. URL: PM:12370251
- [37] Woods, V. L., Jr.; Wolff, L. E. und Keller, D. M. (1986): Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins, *J.Biol.Chem.* (Band 261), Nr. 32, Seite 15242-15251. URL: PM:2429967
- [38] Plow, E. F.; D'Souza, S. E. und Ginsberg, M. H. (1992): Ligand binding to GPIIb-IIIa: a status report, *Semin.Thromb.Hemost.* (Band 18), Nr. 3, Seite 324-332. URL: PM:1455250
- [39] D'Souza, S. E.; Ginsberg, M. H.; Matsueda, G. R. und Plow, E. F. (1991): A discrete sequence in a platelet integrin is involved in ligand recognition, *Nature* (Band 350), Nr. 6313, Seite 66-68. URL: PM:2002847
- [40] Miyamoto, S.; Teramoto, H.; Gutkind, J. S. und Yamada, K. M. (1996): Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors, *J.Cell Biol.* (Band 135), Nr. 6 Pt 1, Seite 1633-1642. URL: PM:8978828
- [41] Shattil, S. J.; Kashiwagi, H. und Pampori, N. (1998): Integrin signaling: the platelet paradigm, *Blood* (Band 91), Nr. 8, Seite 2645-2657. URL: PM:9531572
- [42] Bombeli, T.; Schwartz, B. R. und Harlan, J. M. (1998): Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1),  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin, and GPIIb/IIIa, *J.Exp.Med.* (Band 187), Nr. 3, Seite 329-339. URL: PM:9449713
- [43] Tanahashi, N.; Fukuuchi, Y.; Tomita, M.; Tomita, Y.; Inoue, K.; Satoh, H. und Abe, T. (2001): Adhesion of adenosine diphosphate-activated platelets to human brain microvascular endothelial cells under flow in vitro is mediated via GPIIb/IIIa, *Neurosci.Lett.* (Band 301), Nr. 1, Seite 33-36. URL: PM:11239710
- [44] Tomita, Y.; Tanahashi, N.; Tomita, M.; Itoh, Y.; Yokoyama, M.; Takeda, H.; Schiszler, I. und Fukuuchi, Y. (2001): Role of platelet glycoprotein IIb/IIIa in ADP-activated platelet adhesion to aortic endothelial cells in vitro: observation with video-enhanced contrast microscopy, *Clin.Hemorheol.Microcirc.* (Band 24), Nr. 1, Seite 1-9. URL: PM:11345228
- [45] McEver, R. P. (2002): Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow, *Curr.Opin.Cell Biol.* (Band 14), Nr. 5, Seite 581-586. URL: PM:12231353
- [46] Nurden, A. T.; Macchi, L.; Bihour, C.; Durrieu, C.; Besse, P. und Nurden, P. (1994): Markers of platelet activation in coronary heart disease patients, *Eur.J.Clin.Invest* (Band 24 Suppl 1), Seite 42-45. URL: PM:7516880
- [47] Andre, P.; Nannizzi-Alaimo, L.; Prasad, S. K. und Phillips, D. R. (2002): Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease, *Circulation* (Band 106), Nr. 8, Seite 896-899. URL: PM:12186789
- [48] Henn, V.; Steinbach, S.; Buchner, K.; Presek, P. und Kroczeck, R. A. (2001): The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40, *Blood* (Band 98), Nr. 4, Seite 1047-1054. URL: PM:11493450
- [49] Andre, P.; Prasad, K. S.; Denis, C. V.; He, M.; Papalia, J. M.; Hynes, R. O.; Phillips, D. R. und Wagner, D. D. (2002): CD40L stabilizes arterial thrombi by a  $\beta$ 3 integrin--dependent mechanism, *Nat.Med.* (Band 8), Nr. 3, Seite 247-252. URL: PM:11875495

- [50] Heeschen, C.; Dimmeler, S.; Hamm, C. W.; van den Brand, M. J.; Boersma, E.; Zeiher, A. M. und Simoons, M. L. (2003): Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes, *N.Engl.J.Med.* (Band 348), Nr. 12, Seite 1104-1111. URL: PM:12646667
- [51] Ross, R. (1999): Atherosclerosis--an inflammatory disease, *N.Engl.J.Med.* (Band 340), Nr. 2, Seite 115-126. URL: PM:9887164
- [52] Murray, C. J. und Lopez, A. D. (1997): Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study, *Lancet* (Band 349), Nr. 9063, Seite 1436-1442. URL: PM:9164317
- [53] Fuster, V.; Badimon, L.; Badimon, J. J. und Chesebro, J. H. (1992): The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1), *N.Engl.J.Med.* (Band 326), Nr. 4, Seite 242-250. URL: PM:1727977
- [54] Massberg, S.; Vogt, F.; Dickfeld, T.; Brand, K.; Page, S. und Gawaz, M. (2003): Activated platelets trigger an inflammatory response and enhance migration of aortic smooth muscle cells, *Thromb.Res.* (Band 110), Nr. 4, Seite 187-194. URL: PM:14512080
- [55] Gawaz, M.; Neumann, F. J. und Schomig, A. (1999): Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy, *Circulation* (Band 99), Nr. 1, Seite E1-E11. URL: PM:0009884400
- [56] Siess, W. (1989): Molecular mechanisms of platelet activation, *Physiol Rev.* (Band 69), Nr. 1, Seite 58-178. URL: PM:2536184
- [57] Urbich, C.; Dernbach, E.; Aicher, A.; Zeiher, A. M. und Dimmeler, S. (2002): CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species, *Circulation* (Band 106), Nr. 8, Seite 981-986. URL: PM:12186804
- [58] Pignoli, P.; Tremoli, E.; Poli, A.; Oreste, P. und Paoletti, R. (1986): Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging, *Circulation* (Band 74), Nr. 6, Seite 1399-1406. URL: PM:3536154
- [59] O'Leary, D. H. und Polak, J. F. (2002): Intima-media thickness: a tool for atherosclerosis imaging and event prediction, *Am.J.Cardiol.* (Band 90), Nr. 10C, Seite 18L-21L. URL: PM:12459422
- [60] Ebrahim, S.; Papacosta, O.; Whincup, P.; Wannamethee, G.; Walker, M.; Nicolaidis, A. N.; Dhanjil, S.; Griffin, M.; Belcaro, G.; Rumley, A. und Lowe, G. D. (1999): Carotid plaque, intima media thickness, cardiovascular risk factors, and prevalent cardiovascular disease in men and women: the British Regional Heart Study, *Stroke* (Band 30), Nr. 4, Seite 841-850. URL: PM:10187889
- [61] Homma, S.; Hirose, N.; Ishida, H.; Ishii, T. und Araki, G. (2001): Carotid plaque and intima-media thickness assessed by b-mode ultrasonography in subjects ranging from young adults to centenarians, *Stroke* (Band 32), Nr. 4, Seite 830-835. URL: PM:11283378
- [62] Ebrahim, S.; Papacosta, O.; Whincup, P.; Wannamethee, G.; Walker, M.; Nicolaidis, A. N.; Dhanjil, S.; Griffin, M.; Belcaro, G.; Rumley, A. und Lowe, G. D. (1999): Carotid plaque, intima media thickness, cardiovascular risk factors, and prevalent cardiovascular disease in men and women: the British Regional Heart Study, *Stroke* (Band 30), Nr. 4, Seite 841-850. URL: PM:10187889
- [63] Blankenhorn, D. H. und Hodis, H. N. (1994): George Lyman Duff Memorial Lecture. Arterial imaging and atherosclerosis reversal, *Arterioscler.Thromb.* (Band 14), Nr. 2, Seite 177-192. URL: PM:8305407
- [64] Hodis, H. N. und Mack, W. J. (2002): Atherosclerosis imaging methods: assessing cardiovascular disease and evaluating the role of estrogen in the prevention of atherosclerosis, *Am.J.Cardiol.* (Band 89), Nr. 12A, Seite 19E-27E. URL: PM:12084399
- [65] Carr, M. E. (2001): Diabetes mellitus: a hypercoagulable state, *J.Diabetes Complications* (Band 15), Nr. 1, Seite 44-54. URL: PM:11259926
- [66] (1985): Diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group, *World Health Organ Tech.Rep.Ser.* (Band 727), Seite 1-113. URL: PM:3934850
- [67] Carpenter, M. W. und Coustan, D. R. (1982): Criteria for screening tests for gestational diabetes, *Am.J.Obstet.Gynecol.* (Band 144), Nr. 7, Seite 768-773. URL: PM:7148898

- [68] (1993): Consensus guidelines for the management of insulin-dependent (type 1) diabetes. European IDDM Policy Group 1993, *Diabet.Med.* (Band 10), Nr. 10, Seite 990-1005. URL: PM:8306599
- [69] Salonen, J. T. und Salonen, R. (1993): Ultrasound B-mode imaging in observational studies of atherosclerotic progression, *Circulation* (Band 87), Nr. 3 Suppl, Seite II56-II65. URL: PM:8443925
- [70] Bots, M. L. und Grobbee, D. E. (2002): Intima media thickness as a surrogate marker for generalised atherosclerosis, *Cardiovasc.Drugs Ther.* (Band 16), Nr. 4, Seite 341-351. URL: PM:12652104
- [71] Chambless, L. E.; Heiss, G.; Folsom, A. R.; Rosamond, W.; Szklo, M.; Sharrett, A. R. und Clegg, L. X. (1997): Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993, *Am.J.Epidemiol.* (Band 146), Nr. 6, Seite 483-494. URL: PM:9290509
- [72] Geroulakos, G.; O'Gorman, D.; Nicolaidis, A.; Sheridan, D.; Elkeles, R. und Shaper, A. G. (1994): Carotid intima-media thickness: correlation with the British Regional Heart Study risk score, *J.Intern.Med.* (Band 235), Nr. 5, Seite 431-433. URL: PM:8182398
- [73] Hodis, H. N.; Mack, W. J.; LaBree, L.; Selzer, R. H.; Liu, C. R.; Liu, C. H. und Azen, S. P. (1998): The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events, *Ann.Intern.Med.* (Band 128), Nr. 4, Seite 262-269. URL: PM:9471928
- [74] O'Leary, D. H.; Polak, J. F.; Kronmal, R. A.; Manolio, T. A.; Burke, G. L. und Wolfson, S. K., Jr. (1999): Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group, *N.Engl.J.Med.* (Band 340), Nr. 1, Seite 14-22. URL: PM:9878640
- [75] Salonen, R. und Salonen, J. T. (1990): Progression of carotid atherosclerosis and its determinants: a population-based ultrasonography study, *Atherosclerosis* (Band 81), Nr. 1, Seite 33-40. URL: PM:2407252
- [76] Wendelhag, I.; Wiklund, O. und Wikstrand, J. (1992): Arterial wall thickness in familial hypercholesterolemia. Ultrasound measurement of intima-media thickness in the common carotid artery, *Arterioscler.Thromb.* (Band 12), Nr. 1, Seite 70-77. URL: PM:1731860
- [77] Wendelhag, I.; Wiklund, O. und Wikstrand, J. (1993): Atherosclerotic changes in the femoral and carotid arteries in familial hypercholesterolemia. Ultrasonographic assessment of intima-media thickness and plaque occurrence, *Arterioscler.Thromb.* (Band 13), Nr. 10, Seite 1404-1411. URL: PM:8399076
- [78] Davis, P. H.; Dawson, J. D.; Mahoney, L. T. und Lauer, R. M. (1999): Increased carotid intimal-medial thickness and coronary calcification are related in young and middle-aged adults. The Muscatine study, *Circulation* (Band 100), Nr. 8, Seite 838-842. URL: PM:10458720
- [79] Urbina, E. M.; Srinivasan, S. R.; Tang, R.; Bond, M. G.; Kieltyka, L. und Berenson, G. S. (2002): Impact of multiple coronary risk factors on the intima-media thickness of different segments of carotid artery in healthy young adults (The Bogalusa Heart Study), *Am.J.Cardiol.* (Band 90), Nr. 9, Seite 953-958. URL: PM:12398961
- [80] Veller, M. G.; Fisher, C. M.; Nicolaidis, A. N.; Renton, S.; Geroulakos, G.; Stafford, N. J.; Sarker, A.; Szendro, G. und Belcaro, G. (1993): Measurement of the ultrasonic intima-media complex thickness in normal subjects, *J.Vasc.Surg.* (Band 17), Nr. 4, Seite 719-725. URL: PM:8464091
- [81] Homma, S.; Hirose, N.; Ishida, H.; Ishii, T. und Araki, G. (2001): Carotid plaque and intima-media thickness assessed by b-mode ultrasonography in subjects ranging from young adults to centenarians, *Stroke* (Band 32), Nr. 4, Seite 830-835. URL: PM:11283378
- [82] Shattil, S. J.; Cunningham, M. und Hoxie, J. A. (1987): Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry, *Blood* (Band 70), Nr. 1, Seite 307-315. URL: PM:3297204
- [83] Michelson, A. D. (1996): Flow cytometry: a clinical test of platelet function, *Blood* (Band 87), Nr. 12, Seite 4925-4936. URL: PM:8652804

- [84] Becker, R. C.; Tracy, R. P.; Bovill, E. G.; Mann, K. G. und Ault, K. (1994): The clinical use of flow cytometry for assessing platelet activation in acute coronary syndromes. TIMI-III Thrombosis and Anticoagulation Group, *Coron.Artery Dis.* (Band 5), Nr. 4, Seite 339-345. URL: PM:7519107
- [85] Faraday, N.; Goldschmidt-Clermont, P.; Dize, K. und Bray, P. F. (1994): Quantitation of soluble fibrinogen binding to platelets by fluorescence-activated flow cytometry, *J.Lab Clin.Med.* (Band 123), Nr. 5, Seite 728-740. URL: PM:7515093
- [86] Rinder, H. M. (1998): Platelet function testing by flow cytometry, *Clin.Lab Sci.* (Band 11), Nr. 6, Seite 365-372. URL: PM:10345505
- [87] Ruf, A. und Patscheke, H. (1995): Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression, *Semin.Thromb.Hemost.* (Band 21), Nr. 2, Seite 146-151. URL: PM:7544916
- [88] Spangenberg, P. (1994): Adhesion of activated platelets to polymorphonuclear leukocytes, *Thromb.Res.* (Band 74 Suppl 1), Seite S35-S44. URL: PM:7521070
- [89] Ginsberg, M. H.; Frelinger, A. L.; Lam, S. C.; Forsyth, J.; McMillan, R.; Plow, E. F. und Shattil, S. J. (1990): Analysis of platelet aggregation disorders based on flow cytometric analysis of membrane glycoprotein IIb-IIIa with conformation-specific monoclonal antibodies, *Blood* (Band 76), Nr. 10, Seite 2017-2023. URL: PM:2242424
- [90] Gawaz, M.; Ruf, A.; Neumann, F. J.; Pogatsa-Murray, G.; Dickfeld, T.; Zohlnhofer, D. und Schomig, A. (1998): Effect of glycoprotein IIb-IIIa receptor antagonism on platelet membrane glycoproteins after coronary stent placement, *Thromb.Haemost.* (Band 80), Nr. 6, Seite 994-1001. URL: PM:9869173
- [91] Neumann, F. J.; Zohlnhofer, D.; Fakhoury, L.; Ott, I.; Gawaz, M. und Schomig, A. (1999): Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on platelet-leukocyte interaction and surface expression of the leukocyte integrin Mac-1 in acute myocardial infarction, *J.Am.Coll.Cardiol.* (Band 34), Nr. 5, Seite 1420-1426. URL: PM:10551687
- [92] Kishimoto, T. K.; Jutila, M. A.; Berg, E. L. und Butcher, E. C. (1989): Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors, *Science* (Band 245), Nr. 4923, Seite 1238-1241. URL: PM:2551036
- [93] Pitsilos, S.; Hunt, J.; Mohler, E. R.; Prabhakar, A. M.; Poncz, M.; Dawicki, J.; Khalapyan, T. Z.; Wolfe, M. L.; Fairman, R.; Mitchell, M.; Carpenter, J.; Golden, M. A.; Cines, D. B. und Sachais, B. S. (2003): Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters, *Thromb.Haemost.* (Band 90), Nr. 6, Seite 1112-1120. URL: PM:14652645
- [94] Maguire, P. B.; Wynne, K. J.; Harney, D. F.; O'Donoghue, N. M.; Stephens, G. und Fitzgerald, D. J. (2002): Identification of the phosphotyrosine proteome from thrombin activated platelets, *Proteomics.* (Band 2), Nr. 6, Seite 642-648. URL: PM:12112843
- [95] Gawaz, M. (2004): Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium, *Cardiovasc.Res.* (Band 61), Nr. 3, Seite 498-511. URL: PM:14962480
- [96] Celi, A.; Pellegrini, G.; Lorenzet, R.; De, Blasi A.; Ready, N.; Furie, B. C. und Furie, B. (1994): P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 91), Nr. 19, Seite 8767-8771. URL: PM:7522321
- [97] Merten, M. und Thiagarajan, P. (2000): P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates, *Circulation* (Band 102), Nr. 16, Seite 1931-1936. URL: PM:11034941
- [98] Huo, Y.; Schober, A.; Forlow, S. B.; Smith, D. F.; Hyman, M. C.; Jung, S.; Littman, D. R.; Weber, C. und Ley, K. (2003): Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E, *Nat.Med.* (Band 9), Nr. 1, Seite 61-67. URL: PM:12483207
- [99] Burger, P. C. und Wagner, D. D. (2003): Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development, *Blood* (Band 101), Nr. 7, Seite 2661-2666. URL: PM:12480714
- [100] Jilma, B.; Fasching, P.; Ruthner, C.; Rumplmayr, A.; Ruzicka, S.; Kapiotis, S.; Wagner, O. F. und Eichler, H. G. (1996): Elevated circulating P-selectin in insulin dependent diabetes mellitus, *Thromb.Haemost.* (Band 76), Nr. 3, Seite 328-332. URL: PM:8883265

- [101] Blann, A. D.; Nadar, S. K. und Lip, G. Y. (2003): The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease, *Eur.Heart J.* (Band 24), Nr. 24, Seite 2166-2179. URL: PM:14659768
- [102] Ridker, P. M.; Buring, J. E. und Rifai, N. (2001): Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events, *Circulation* (Band 103), Nr. 4, Seite 491-495. URL: PM:11157711
- [103] Murakami, T.; Komiyama, Y.; Masuda, M.; Kido, H.; Nomura, S.; Fukuhara, S.; Karakawa, M.; Iwasaka, T. und Takahashi, H. (1996): Flow cytometric analysis of platelet activation markers CD62P and CD63 in patients with coronary artery disease, *Eur.J.Clin.Invest* (Band 26), Nr. 11, Seite 996-1003. URL: PM:8957206
- [104] Inoue, T.; Hoshi, K.; Fujito, T.; Sakai, Y.; Morooka, S. und Sohma, R. (1996): Early detection of platelet activation after coronary angioplasty, *Coron.Artery Dis.* (Band 7), Nr. 7, Seite 529-534. URL: PM:8913671
- [105] Hafezi-Moghadam, A.; Thomas, K. L.; Prorock, A. J.; Huo, Y. und Ley, K. (2001): L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment, *J.Exp.Med.* (Band 193), Nr. 7, Seite 863-872. URL: PM:11283159
- [106] Ott, I.; Neumann, F. J.; Gawaz, M.; Schmitt, M. und Schomig, A. (1996): Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina, *Circulation* (Band 94), Nr. 6, Seite 1239-1246. URL: PM:8822975
- [107] Neumann, F. J.; Marx, N.; Gawaz, M.; Brand, K.; Ott, I.; Rokitta, C.; Sticherling, C.; Meinel, C.; May, A. und Schomig, A. (1997): Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets, *Circulation* (Band 95), Nr. 10, Seite 2387-2394. URL: PM:9170401
- [108] Neumann, F. J.; Marx, N.; Gawaz, M.; Brand, K.; Ott, I.; Rokitta, C.; Sticherling, C.; Meinel, C.; May, A. und Schomig, A. (1997): Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets, *Circulation* (Band 95), Nr. 10, Seite 2387-2394. URL: PM:9170401
- [109] Furman, M. I.; Barnard, M. R.; Krueger, L. A.; Fox, M. L.; Shilale, E. A.; Lessard, D. M.; Marchese, P.; Frelinger, A. L., III; Goldberg, R. J. und Michelson, A. D. (2001): Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction, *J.Am.Coll.Cardiol.* (Band 38), Nr. 4, Seite 1002-1006. URL: PM:11583872
- [110] Htun, P.; Fateh-Moghadam, S.; Tomandl, B.; Handschu, R.; Klinger, K.; Stellos, K.; Garlichs, C.; Daniel, W. und Gawaz, M. (2006): Course of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in cerebrovascular ischemia, *Stroke* (Band 37), Nr. 9, Seite 2283-2287. URL: PM:16888273
- [111] Marquardt, L.; Ruf, A.; Mansmann, U.; Winter, R.; Schuler, M.; Buggle, F.; Mayer, H. und Grau, A. J. (2002): Course of platelet activation markers after ischemic stroke, *Stroke* (Band 33), Nr. 11, Seite 2570-2574. URL: PM:12411644
- [112] Kawamori, R.; Imano, E.; Watarai, T.; Nishizawa, H.; Matsushima, H.; Kodama, M.; Yamasaki, Y. und Kamada, T. (1994): Platelet activation in diabetic patients with asymptomatic atherosclerosis, *Diabetes Res.Clin.Pract.* (Band 24), Nr. 2, Seite 89-95. URL: PM:7956714
- [113] Winocour, P. D. (1992): Platelet abnormalities in diabetes mellitus, *Diabetes* (Band 41 Suppl 2), Seite 26-31. URL: PM:1526332
- [114] Willoughby, S.; Holmes, A. und Loscalzo, J. (2002): Platelets and cardiovascular disease, *Eur.J.Cardiovasc.Nurs.* (Band 1), Nr. 4, Seite 273-288. URL: PM:14622657
- [115] Fateh-Moghadam, S.; Bocksch, W.; Ruf, A.; Dickfeld, T.; Scharf, M.; Pogatsa-Murray, G.; Hetzer, R.; Fleck, E. und Gawaz, M. (2000): Changes in surface expression of platelet membrane glycoproteins and progression of heart transplant vasculopathy, *Circulation* (Band 102), Nr. 8, Seite 890-897. URL: PM:10952958
- [116] Smith, N. M.; Pathansali, R. und Bath, P. M. (1999): Platelets and stroke, *Vasc.Med.* (Band 4), Nr. 3, Seite 165-172. URL: PM:10512596
- [117] Koyama, H.; Maeno, T.; Fukumoto, S.; Shoji, T.; Yamane, T.; Yokoyama, H.; Emoto, M.; Shoji, T.; Tahara, H.; Inaba, M.; Hino, M.; Shioi, A.; Miki, T. und Nishizawa, Y. (2003): Platelet P-selectin expression is associated with atherosclerotic wall thickness in carotid artery in humans, *Circulation* (Band 108), Nr. 5, Seite 524-529. URL: PM:12860908

- [118] Ruf, A.; Pick, M.; Deutsch, V.; Patscheke, H.; Goldfarb, A.; Rachmilewitz, E. A.; Guillin, M. C. und Eldor, A. (1997): In-vivo platelet activation correlates with red cell anionic phospholipid exposure in patients with beta-thalassaemia major, *Br.J.Haematol.* (Band 98), Nr. 1, Seite 51-56. URL: PM:9233563
- [119] Yamasaki, Y.; Kodama, M.; Nishizawa, H.; Sakamoto, K.; Matsuhisa, M.; Kajimoto, Y.; Kosugi, K.; Shimizu, Y.; Kawamori, R. und Hori, M. (2000): Carotid intima-media thickness in Japanese type 2 diabetic subjects: predictors of progression and relationship with incident coronary heart disease, *Diabetes Care* (Band 23), Nr. 9, Seite 1310-1315. URL: PM:10977024
- [120] Kastelein, J. J.; De, Groot E. und Sankatsing, R. (2004): Atherosclerosis measured by B-mode ultrasonography: effect of statin therapy on disease progression, *Am.J.Med.* (Band 116 Suppl 6A), Seite 31S-36S. URL: PM:15050190
- [121] Burke, G. L.; Evans, G. W.; Riley, W. A.; Sharrett, A. R.; Howard, G.; Barnes, R. W.; Rosamond, W.; Crow, R. S.; Rautaharju, P. M. und Heiss, G. (1995): Arterial wall thickness is associated with prevalent cardiovascular disease in middle-aged adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, *Stroke* (Band 26), Nr. 3, Seite 386-391. URL: PM:7886711
- [122] Hulthe, J.; Wikstrand, J.; Emanuelsson, H.; Wiklund, O.; de Feyter, P. J. und Wendelhag, I. (1997): Atherosclerotic changes in the carotid artery bulb as measured by B-mode ultrasound are associated with the extent of coronary atherosclerosis, *Stroke* (Band 28), Nr. 6, Seite 1189-1194. URL: PM:9183349
- [123] Kodama, M.; Yamasaki, Y.; Sakamoto, K.; Yoshioka, R.; Matsuhisa, M.; Kajimoto, Y.; Kosugi, K.; Ueda, N. und Hori, M. (2000): Antiplatelet drugs attenuate progression of carotid intima-media thickness in subjects with type 2 diabetes, *Thromb.Res.* (Band 97), Nr. 4, Seite 239-245. URL: PM:10674411
- [124] Ranke, C.; Hecker, H.; Creutzig, A. und Alexander, K. (1993): Dose-dependent effect of aspirin on carotid atherosclerosis, *Circulation* (Band 87), Nr. 6, Seite 1873-1879. URL: PM:8504499
- [125] Serebruany, V. L.; Malinin, A. I.; Ziai, W.; Pokov, A. N.; Bhatt, D. L.; Alberts, M. J. und Hanley, D. F. (2005): Effects of clopidogrel and aspirin in combination versus aspirin alone on platelet activation and major receptor expression in patients after recent ischemic stroke: for the Plavix Use for Treatment of Stroke (PLUTO-Stroke) trial, *Stroke* (Band 36), Nr. 10, Seite 2289-2292. URL: PM:16151033
- [126] Diener, H. C.; Bogousslavsky, J.; Brass, L. M.; Cimminiello, C.; Csiba, L.; Kaste, M.; Leys, D.; Matias-Guiu, J. und Rupprecht, H. J. (2004): Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet* (Band 364), Nr. 9431, Seite 331-337. URL: PM:15276392
- [127] Piechowski-Jozwiak, B.; Maulaz, A. und Bogousslavsky, J. (2005): Secondary prevention of stroke with antiplatelet agents in patients with diabetes mellitus, *Cerebrovasc.Dis.* (Band 20 Suppl 1), Seite 15-23. URL: PM:16276081
- [128] Bhatt, D. L.; Fox, K. A.; Hacke, W.; Berger, P. B.; Black, H. R.; Boden, W. E.; Cacoub, P.; Cohen, E. A.; Creager, M. A.; Easton, J. D.; Flather, M. D.; Haffner, S. M.; Hamm, C. W.; Hankey, G. J.; Johnston, S. C.; Mak, K. H.; Mas, J. L.; Montalescot, G.; Pearson, T. A.; Steg, P. G.; Steinhubl, S. R.; Weber, M. A.; Brennan, D. M.; Fabry-Ribaud, L.; Booth, J. und Topol, E. J. (2006): Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events, *N.Engl.J.Med.* (Band 354), Nr. 16, Seite 1706-1717. URL: PM:16531616
- [129] Angiolillo, D. J.; Shoemaker, S. B.; Desai, B.; Yuan, H.; Charlton, R. K.; Bernardo, E.; Zenni, M. M.; Guzman, L. A.; Bass, T. A. und Costa, M. A. (2007): Randomized comparison of a high clopidogrel maintenance dose in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease: results of the Optimizing Antiplatelet Therapy in Diabetes Mellitus (OPTIMUS) study, *Circulation* (Band 115), Nr. 6, Seite 708-716. URL: PM:17261652

## 8. Anhang

### I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACC	Arteria carotis communis
ACE	Angiotensin converting enzyme
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Angina pectoris
ASS	Acetylsalicylsäure
BMI	Body mass index
B-Mode	Brightness mode
β-TG	β-Thromboglobulin
CD	Cluster of Differentiation
ECGF	Endothelial cell growth factor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward Light Scatter
HDL	High density lipoprotein
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IL- β	Interleukin β
IMD	Intima-Media Dicke
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low density lipoprotein
LIBS	Liganden-induzierte Bindungsstelle
LIMP	Lysosomale integrale Membranproteine
Lp(a)	Lipoprotein a
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MI	Myokardinfarkt
MIF	Mittlere Immunfluoreszenz
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Paraaminoformaldehyd
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate buffered saline
PC5	Phycoerythrin-Cyanin 5
PDGF	Platelet derived growth factor

---

PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule precursor 1
PF4	Plättchen-Faktor 4
PGI2	Prostaglandin I2
PRIND	Prolongiertes reversibles ischämisches neurologisches Defizit
PSGL- 1	P-selectin glycoprotein ligand-1
PTCA	Percutaneous transluminal coronary angioplasty
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted
RGD	Arginin-Glyzin-Aspartat
ROC	Receiver Operating Characteristic
SCS	Surface connected system
SSC	Sideward Light Scatter
Tab.	Tabelle
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TXA 2	Thromboxan A2
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWF	von-Willebrand Faktor

---

**II. Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 1 – Kontaktphase und Adhäsion von Thrombozyten als Teil der primären Hämostase
- Abbildung 2 – Bindung zirkulierender Thrombozyten über das Glykoprotein Ib-V-IX an den freiliegenden von-Willebrand Faktor
- Abbildung 3 – Schematische Darstellung zum Aufbau des Fibrinogenmoleküls
- Abbildung 4 – Ausbildung von Plättchenaggregaten durch Bindung von Fibrinogen an GPIIb-IIIa
- Abbildung 5 – Zusammenfassende Darstellung von Adhäsion und Aggregation mit anschließender Thrombusbildung
- Abbildung 6 – Atherosklerose und Thrombozyten
- Abbildung 7 – Ultraschallbild und schematische Darstellung zur Messung der Intima-Media Dicke
- Abbildung 8 – Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers
- Abbildung 9 – Dot-Plot Darstellung einer Thrombozytenpopulation
- Abbildung 10 – Dot-Plot Darstellung einer Thrombozytenpopulation mit einer deutlich positiven CD42 Immunfluoreszenz
- Abbildung 11 – Dot-Plot Darstellung einer Thrombozytenpopulation mit Nachweis der Expression von CD41
- Abbildung 12 – Histogramm zur CD41 Expression
- Abbildung 13 – Dot-Plot Darstellung einer Monozytenpopulation
- Abbildung 14 – Dot-Plot Darstellung von Leukozyten
- Abbildung 15 – Dot-Plot Darstellung von Leukozyten und deren Expression von CD42 und CD62P
- Abbildung 16 – Vergleich der Intima-Media Dicke
- Abbildung 17 – Expression von P-Selektin
- Abbildung 18 – Expression von CD63
- Abbildung 19 – Expression von CD62L

---

**III. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 –	Inhaltsstoffe thrombozytärer Speichergranula
Tabelle 2 –	Biologische Substanzen und ihre hämostaseologische Bedeutung
Tabelle 3 –	Diagnosekriterien für Diabetes mellitus (WHO)
Tabelle 4 –	Risikofaktoren und Definitionen
Tabelle 5 –	Eingesetzte Antikörper und ihre Eigenschaften
Tabelle 6 –	Absorptions- und Emissionsspektren einiger verwendeter Fluorochrome
Tabelle 7 –	Demografische Daten der gesamten Studienpopulation
Tabelle 8 –	Labordaten der gesamten Studienpopulation
Tabelle 9 –	Medikamentöse Therapie innerhalb der gesamten Studienpopulation
Tabelle 10 –	Gegenüberstellung der demografischen Daten bei Patienten mit und ohne Progression der Atherosklerose
Tabelle 11 –	Vergleich der Labordaten bei Patienten mit und ohne Progression der Atherosklerose
Tabelle 12 –	Gegenüberstellung der medikamentösen Therapie bei Patienten mit und ohne Progression der Atherosklerose
Tabelle 13 –	Übersicht zu kardiovaskulären Ereignissen in der Studienpopulation
Tabelle 14 –	Ergebnisse der Regressionsanalyse

---

#### **IV. Danksagung**

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn PD Dr. W. Bocksch für die Überlassung dieses Themas, seinem fachlichen Rat, seiner Geduld und Unterstützung in allen Belangen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. S. Fateh-Moghadam für die ständige Diskussionsbereitschaft, Beratung und Unterstützung, einschließlich der Einarbeitung in die Durchflusszytometrie und die statistische Auswertung sowie die zahlreichen wertvollen Hinweise, die den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit ermöglichten.

Herrn Prof. Dr. Riess und Mitarbeitern danke ich für die Bereitstellung der Laborräumlichkeiten und Überlassen der notwendigen Geräte und Materialien.

## **V. Lebenslauf**

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“

---

**VI. Erklärung an Eides statt**

„Ich, Simon Ersel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Bedeutung der Thrombozytenaktivierung für die Progression der Atherosklerose bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

## VII. Instrument Settings

### Instrument setting – flow cytometry

Thrombozytenmessung:

<b>Detectors/Amps:</b>				
<b>Parameter</b>	<b>Detector</b>	<b>Voltage</b>	<b>AmpGain</b>	<b>Mode</b>
P1	FSC	E00	1.00	Log
P2	SSC	330	1.00	Log
P3	FL1	600	1.00	Log
P4	FL2	570	1.00	Log
P5	FL3	150	1.00	Lin

Threshold:

Parameter: FSC; Value: 50; Compensation: FL1 – 0,1% FL2; FL2 – 45% FL1; FL2 – 0,0% FL;  
FL3 – 0,0% FL2

Thrombozyten-/Leukozytenmessung:

<b>Detectors/Amps:</b>				
<b>Parameter</b>	<b>Detector</b>	<b>Voltage</b>	<b>AmpGain</b>	<b>Mode</b>
P1	FSC	E00	1.00	Lin
P2	SSC	329	1.00	Lin
P3	FL1	575	1.00	Log
P4	FL2	500	1.00	Log
P5	FL3	581	1.00	Log

Threshold:

Parameter: FSC; Value: 72; Compensation: FL1 – 1,3% FL2; FL2 – 20% FL1; FL2 – 1,1% FL3;  
FL3 – 16,6% FL2