

Aus der Klinik für Innere Medizin mit dem Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Der Einfluss des Flavonoids Phloretin auf die Thrombozytenaktivität  
und die Aggregationshemmung**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Carola Güther  
aus Spremberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Stangl  
2. Priv.-Doz. Dr. med. I. Ott  
3. Priv.-Doz. Dr. V. Böhm

Datum der Promotion: 21.11.2008

**Im Gedenken an meinen Vater  
und in Dankbarkeit meiner Mutter.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Flavonoide.....	3
1.1.1 Struktur, Klassifikation und Vorkommen .....	3
1.1.2 Resorption und Metabolismus.....	4
1.1.3 Flavonoide als Nahrungsbestandteile.....	5
1.1.4 Wirkungen von Flavonoiden im menschlichen Organismus.....	7
1.1.5 Phloretin.....	11
1.2 Struktur und Physiologie der Thrombozyten.....	15
1.2.1 Morphologie.....	15
1.2.2 Thrombozytäre Membranrezeptoren.....	16
1.2.2.1 Integrine.....	17
1.2.2.2 Leuzinreiche Glykoproteine.....	18
1.2.2.3 Selektine.....	19
1.2.2.4 Rezeptoren vom Immunglobulintyp.....	19
1.2.3 Stadien der Primären Hämostase.....	20
1.2.3.1 Adhäsion.....	20
1.2.3.2 Aktivierung.....	20
1.2.3.3 Aggregation.....	21
1.2.4 Bedeutung der Thrombozyten in der Atherogenese.....	22
<b>2. Fragestellung</b> .....	23
<b>3. Material und Methoden</b> .....	24
3.1 Durchflusszytometrie.....	24
3.1.1 Funktionsprinzip Durchflusszytometer.....	24
3.1.2 Monoklonale Antikörper.....	25
3.1.3 Studien.....	26
3.1.4 Probengewinnung und Aufbereitung.....	27
3.1.5 Durchflusszytometrische Messung.....	28
3.1.6 Auswertung.....	29
3.2 Aggregometrie.....	30
3.2.1 Funktionsprinzip Aggregometer.....	30
3.2.2 Studien.....	30

3.2.3	Probengewinnung und Aufbereitung.....	30
3.2.4	Aggregometrische Messung.....	31
3.2.5	Auswertung der Aggregationskurven.....	32
3.3	Statistik.....	33
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
4.1	Durchflusszytometrie.....	34
4.1.1	Glykoprotein IIb-IIIa.....	34
4.1.2	P-Selektin Freisetzung.....	37
4.2	Aggregometrie.....	40
4.2.1	Maximale Aggregation.....	40
4.2.2	Reversibilität.....	42
4.2.3	Slope- Werte.....	45
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>48</b>
5.1	Beurteilung der Messergebnisse.....	48
5.1.1	Veränderungen der thrombozytären Oberflächenrezeptoren .....	48
5.1.2	Aggregometrie.....	53
5.2	Absorption und Bioverfügbarkeit von Phloretin.....	54
5.3	Bedeutung und Beurteilung der Durchflusszytometrie.....	56
5.4	Methodenkritik.....	58
5.5	Relevanz und Ausblick.....	59
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>61</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>63</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>65</b>
<b>9.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>66</b>
<b>10.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>67</b>
<b>11.</b>	<b>Publikationsliste</b> .....	<b>74</b>
<b>12.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>75</b>
<b>13.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>76</b>
<b>14.</b>	<b>Erklärung</b> .....	<b>77</b>

## 1 Einleitung

Phloretin gehört zu den Flavonoiden, einer großen heterogenen Gruppe von sekundären Pflanzenstoffen mit polyphenolischer Struktur. Auf Grund ihrer weiten Verbreitung im Pflanzenreich werden Flavonoide dem menschlichen Organismus kontinuierlich mit der Nahrung zugeführt (50). Eine protektive Wirkung von Flavonoiden wird vor allem im Zusammenhang mit der Prävention bestimmter Krankheitsformen - den so genannten „free radical diseases“ - diskutiert, zu denen Atherosklerose und damit verbundene Herz-Kreislauf-Erkrankungen, bestimmte kanzerogene Tumorformen und chronische Entzündungen gerechnet werden (38,50,57). In mediterranen und asiatischen Ländern, die eine ausgewogene und fettarme Ernährung bevorzugen, konnte eine geringere Mortalität an Herz-Kreislauf-Erkrankungen beobachtet werden (42). Das so genannte „French Paradoxon“, das eine geringere Mortalitätsrate an koronarer Herzkrankheit (KHK) in Frankreich trotz höherer Serumcholesterinspiegel und Blutdruckwerten beschreibt, scheint ebenfalls nahrungsabhängig durch eine hohe Aufnahme an Polyphenolen über Rotwein, Obst und Gemüse hervorgerufen zu werden (22). Die Ernährung hat auf Grund dieser Erkenntnisse einen großen Stellenwert in der primären Prävention erhalten.

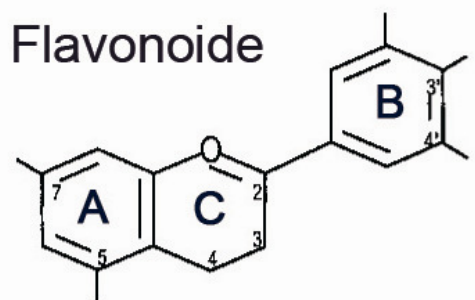
Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes starb im Jahr 2004 in Deutschland nahezu jeder Zweite an einer Erkrankung des Herz-Kreislaufsystems, insgesamt über 368.000 Menschen (78). Auch weltweit mit etwa 17,5 Millionen (30%) Verstorbenen im Jahr 2005 sind die kardiovaskulären Erkrankungen Todesursache Nummer 1. Prozentual stehen die KHK, einschließlich Myokardinfarkt und Erkrankungen der Hirngefäße, an vorderster Stelle. Nach Schätzungen der World Health Organisation (WHO) werden im Jahr 2020 etwa 25 Millionen Menschen weltweit an diesen Erkrankungen sterben. Ein stetig zunehmender Wandel der Lebensgewohnheiten mit ungesunder Ernährung, körperlicher Inaktivität und erhöhtem Tabakkonsum stellt die Grundlage dieser Annahme dar. Gegenüber anderen Risikofaktoren der KHK, wie beispielsweise Hypertonie, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus sind diese Gewohnheiten individuell vermeidbar (84). Aus diesem Grund wird sowohl von der WHO als auch den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie-, Herz- und Kreislaufforschung (DGK) eine konsequente Prävention der Risikofaktoren propagiert (23,84). Die nicht-medikamentösen Therapiemöglichkeiten bilden dabei die Grundlage des Risikofaktoren-Managements (23).

Die Atherogenese umfasst spezifische zelluläre und molekulare Mechanismen, die im Sinne einer Inflammation als Antwort auf Funktionsstörungen unter anderem im Bereich der Endothelzellen verstanden werden. Bekannt ist die zentrale Rolle der Thrombozyten bei der Ausbildung akuter klinischer Ereignisse wie instabiler Angina pectoris, Myokardinfarkt oder plötzlichem Herztod. Physiologische Prozesse der Aktivierung, Adhäsion und Aggregation führen zu einer deutlichen Einengung bis hin zum Verschluss des Gefäßes (29,30,41). Neueren Erkenntnissen zu Folge adhären aktivierte Blutplättchen auch an strukturell und funktionell intakte Endothel (30,51,53). Aggregationshemmer sind ein wichtiger Bestandteil in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen. Sekundäre Pflanzenstoffe mit antithrombozytärer Wirkung könnten auch primärprophylaktisch von großer Bedeutung sein.

## 1.1 Flavonoide

### 1.1.1 Struktur, Klassifikation und Vorkommen

Flavonoide sind sekundäre Pflanzenstoffe, die gemeinsam mit den Phenolsäuren zur Gruppe der Polyphenole gehören. Diese auch als „Phytochemicals“ bezeichneten Verbindungen kommen in nahezu allen höheren Pflanzen in variierender Konzentration und Zusammensetzung vor. Sie dienen der Pflanze im Wesentlichen als Schutzmechanismus vor UV-Strahlung und anderen pathogenen Faktoren der Umwelt. Ihre Produktion kann durch eine Infektion oder extreme Witterungsverhältnisse gesteigert werden (50). Als Sekundärmetaboliten sind Flavonoide nicht essentiell für die Entwicklung des pflanzlichen Organismus und befinden sich überwiegend in den Randschichten, äußeren Blättern und Früchten der Pflanzen (83). Die Akkumulierung in peripheren Arealen lässt sich auch dadurch erklären, dass Flavonoide lichtabhängig - in Photosynthese betreibenden Zellen - synthetisiert werden (50).



**Abb.1: Grundstruktur der Flavonoide**  
modifiziert nach Manach et al. (50)

Allen Flavonoiden gemeinsam ist die typische Drei-Ring-Struktur. Sie besteht aus den zwei aromatischen Ringen A und B, sowie einem O-heterozyklischen Ring C, wie in *Abbildung 1* dargestellt (83). Die Hauptausgangssubstanz in der Synthese der natürlichen phenolischen Substanzen ist Phenylalanin (85). Die Flavonoide lassen sich anhand der strukturellen Unterschiede am C-Ring, sowie seiner Verbindung mit dem B-Ring in die folgenden sechs Hauptgruppen einteilen: Flavone, Flavonole, Isoflavonoide, Anthocyanidine, Flavanole und Flavanone (50,83,85). Daneben existieren weitere kleinere Gruppen, wie bspw. die Dihydrochalcone. In *Tabelle 1* sind die Verbindungsklassen der Flavonoide mit deren Hauptvertretern und Vorkommen in verschiedenen Lebensmitteln aufgeführt (50,83).



**Tabelle 1: Hauptklassen der Flavonoide**

Klassen	Beispiele	Vorkommen
Flavonole	Quercetin, Kämpferol	Zwiebeln, Tee, Äpfel
Flavone	Apigenin, Luteolin	Petersilie, Sellerie
Flavanole	Catechine	Tee, Rotwein, Schokolade
Flavanone	Naringenin, Hesperidin	Grapefruit, Orange
Anthocyanidine	Malvidin, Cyanidin	Brombeeren, Kirschen
Isoflavonoide	Genistein, Daidzein	Sojabohnen
Dihydrochalcone	Phloretin, Phloridzin	Äpfel, Erdbeeren, Tomaten

modifiziert nach Manach et al. (50) und Watzl et al. (83)

Flavonoide kommen in der Natur nur selten frei als Aglykon vor. Die überwiegenden Verbindungen sind Glykoside – an Zucker gebundene Flavonoide. Mehr als 80 verschiedene Zuckerreste sind in diesem Zusammenhang bereits identifiziert. Die unterschiedlichen Glykosidierungsmuster erklären die große Liste an Einzelverbindungen, die sich bei den Flavonoiden mittlerweile auf über 6500 identifizierte Verbindungen beläuft (83). Weit verbreitete Monosaccharide sind neben Glucose unter anderem Rhamnose, Galaktose, Xylose oder Arabinose, die in Form von Mono-, Di- und Oligosacchariden mit den Aglykonen verknüpft sind (50,83).

### 1.1.2 Resorption und Metabolismus

Die Aglykone der Flavonoide können auf Grund ihrer hydrophoben Eigenschaft durch passive Diffusion über die Zellmembran im Dünndarm absorbiert werden. In der Leber erfolgt die weitere Metabolisierung durch Sulfatierung, Glukoronidierung und Methylierung, sowie anschließender Ausscheidung über den Urin oder Gallensaft (50,83,85). Die unkonjugierte Form der Polyphenole ist daher nur selten im Plasma nachzuweisen (50). Nach einmaliger Fütterung von Ratten, mit einem Anteil von 0,157% Phloretin, konnten im Plasma lediglich 5% der aufgenommenen Menge als unkonjugierte Form detektiert werden (18). Wie bereits unter 1.1.1 erwähnt, liegt der überwiegende Teil der Flavonoide jedoch in glykosilierter Form vor. Dabei wurde zunächst angenommen, dass eine Spaltung von Glykosiden erst im Dickdarm durch Mikroorganismen erfolgt mit anschließender Absorption der Aglykone. Für Quercetinmonoglykoside beispielsweise wird eine schnellere und effizientere

Absorption als für das Quercetinaglykon gezeigt, was auf eine Aufnahme im proximalen Darmtrakt zurückzuführen ist (50,83,85). Neuere Studien deuten darauf hin, dass bestimmte Flavonoidglykoside über einen aktiven Transport im Dünndarm absorbiert werden (83,85). Als mögliches Transportmedium wird der natriumabhängige D-Glukosecotransporter SGLT1 in Betracht gezogen (50). In Abhängigkeit von der Art des Zuckerrestes besteht für glykosilierte Flavonoide die Möglichkeit, intakt oder nach Abspaltung des Zuckers, über die Enterozyten aufgenommen zu werden. Die Hydrolyse der Glykoside wird durch  $\beta$ -Glukosidasen katalysiert. Dabei steht intrazellulär die zytosolische  $\beta$ -Glukosidase und an der apikalen Seite der Enterozyten die Lactat-Phloridzin-Hydrolase (LPH) zur Verfügung. Letztere vermittelt die Deglykosidierung von Phloridzin. Es existieren starke Unterschiede in der Affinität der einzelnen Flavonoidglykoside zu den beiden  $\beta$ -Glukosidasen (50). Flavonoide unterliegen zum Teil einem ausgeprägten intestinalen First-Pass-Effekt, was eine erhöhte Metabolisierung in der Leber noch vor Erreichen des Wirkortes bedeutet. Dies zeigt sich durch den Nachweis von entsprechenden konjugierten Formen der Flavonoide im Kreislauf kurz nach oraler Applikation (18,50). Nach einmaliger Fütterung von Ratten mit Phloretin und Phloridzin, wurden vier Stunden nach Aufnahme 95% als konjugierte Formen von Phloretin im Plasma nachgewiesen (18).

Die entstandenen Konjugate werden zum Teil über die Galle erneut in das Duodenum freigesetzt. Aglykone werden danach entweder erneut absorbiert oder weiter zu phenolischen Säuren abgebaut. Durch den enterohepatischen Kreislauf wird eine längere Präsenz der Flavonoide im Körper erreicht (50). Phloretin dagegen wird sehr schnell über den Urin eliminiert. 24 Stunden nach einmaliger Fütterung von Ratten mit Phloretin und Phloridzin kann keines der Flavonoide im Plasma mehr nachgewiesen werden (18). Anhand dieser komplexen Vorgänge wird deutlich, dass nur ein geringer Teil der zugeführten Polyphenole die systemische Zirkulation und damit periphere Gewebe erreicht. Es ist jedoch noch unklar, ob und wo Flavonoide in Körpergeweben gespeichert werden können und welche Konzentrationen bei kontinuierlicher Flavonoidzufuhr im Plasma entstehen.

### **1.1.3 Flavonoide als Nahrungsbestandteile**

Aufgrund der weiten Verbreitung von Polyphenolen im Pflanzenreich, werden die Flavonoide dem menschlichen Organismus kontinuierlich mit der Nahrung zugeführt.

Der heutige Stand der Forschung weist auf zahlreiche biologische Wirkungen der Flavonoide hin, die vor allem auf ihrem hohen antioxidativen Potential basieren (50). In den letzten Jahren wurde die Ernährung zum wichtigen Bestandteil primärpräventiver Strategien kardiovaskulärer Erkrankungen. Eine ausgewogene Aufnahme von Früchten, Gemüse, Fisch und mehrfach ungesättigten Fettsäuren, sowie gering an Lipiden und rotem Fleisch, sind kennzeichnend für die mediterrane und asiatische Küche. Gegenüber der westlichen Ernährung, die durch exzessive Aufnahme von hochkalorischem Essen geprägt ist, trägt sie signifikant zur Senkung von Mortalität und Ausbildung kardiovaskulärer Sekundärereignisse bei (48). In der Lyon Diet Heart Study untersuchte man etwa 600 Patienten, die einen ersten Herzinfarkt erlitten hatten. Diese wurden in zwei Gruppen mit gleichem Risikoprofil und medikamentöser Therapie randomisiert. Etwa 300 Patienten wurden auf eine mediterrane Ernährung umgestellt und diätetisch geschult. Nach einem Follow up von etwa 46 Monaten zeigten sich eine signifikante Reduktion (50-70%) der tödlichen und nicht tödlichen Herzinfarkte sowie eine verminderte Gesamtsterblichkeit der mediterran-ernährten Patienten (48). Im Vergleich der Todesursachen verschiedener Länder - zusammengefasst 2006 von der American Heart Association - kann das Ergebnis der Lyon Heart Studie indirekt nachvollzogen werden. In Frankreich wurden etwa 11% und in Japan etwa 8% weniger Verstorbene pro 100.000 Einwohner an kardiovaskulären Erkrankungen registriert, als vergleichsweise in Deutschland. In der Gesamtheit gesehen, wurden 30% der Todesfälle in Deutschland im betrachteten Jahr durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursacht. In Frankreich lag der Anteil kardiovaskulärer Todesursachen mit etwa 19% und in Japan mit etwa 24% deutlich darunter (2).

In welchen Konzentrationen Flavonoide im Endeffekt mit der Nahrung aufgenommen werden, hängt von verschiedenen Parametern ab. Die Zusammensetzung der Polyphenole, sowie ihrer Konzentrationen, variieren hinsichtlich Quantität und Qualität sowohl zwischen, als auch innerhalb der Pflanzenspezies zum Teil erheblich. Maßgebliche Faktoren, die den Gehalt an Flavonoiden beeinflussen, sind unter anderem die Sonnenlichtexposition, der Erntezeitpunkt, der Reifegrad sowie der Wachstumsstandort. Weitere, zum Teil beachtliche, Verluste an Polyphenolen entstehen während der Lagerung und Weiterverarbeitung. Durch ihre Akkumulation in den Randschichten geht ein großer Anteil der Flavonoide bereits durch einfaches Entfernen der Schale von Früchten und Gemüse verloren. Auch Erhitzen (Kochen,

Backen) oder längere Lagerung bei Raumtemperatur haben erhebliche Auswirkungen auf die Flavonoidkonzentration (50).

Die tatsächlich aufgenommene Menge an Flavonoiden pro Tag zu kalkulieren, ist daher sehr schwierig. Hinzu kommen regionale Unterschiede in Vegetation und Essgewohnheiten, die ebenfalls zu Differenzen führen. In der Literatur wird eine Aufnahme von Flavonoiden bis zu 1 g täglich beschrieben (50,70,85). Das würde eine 10-fach höhere Zufuhr als Vitamin C und 100-fach höher als Vitamin E und Carotinoide bedeuten (70). In einem bayrischen Teilkollektiv liegt der Verzehr von Flavonoiden dagegen nur bei 54 mg/Tag (83). Andere Studien, die lediglich einzelne Gruppen der Flavonoide einbeziehen, ermitteln wesentlich geringere Mengen. Die durchschnittliche Aufnahme von Flavonolen in den USA und Dänemark liegt zwischen 20 und 25 mg/Tag (50). Im Rahmen einer Studie in den Niederlanden wird eine tägliche Flavonol- und Flavonaufnahme von 26 mg errechnet (34) und in dem bayrischen Teilkollektiv werden nur 12 mg Flavonole täglich aufgenommen (83).

#### **1.1.4 Wirkungen von Flavonoiden im menschlichen Organismus**

Die Erforschung polyphenolischer Effekte auf die menschliche Gesundheit hat sich in den letzten zehn Jahren stark entwickelt. Das liegt zum einen an der großen Präsenz der Substanzen in unserer täglichen Nahrung und zum andern an ihrer vermuteten Rolle in der Prävention verschiedener Erkrankungen. Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse beruhen im Wesentlichen auf *in vitro* sowie tierexperimentellen Studien.

Zwischen oxidativem Stress und der Entstehung chronischer Erkrankungen, wie Atherosklerose, Tumorerkrankungen und Diabetes mellitus Typ 2, werden seit mehreren Jahren kausale Beziehungen vermutet (50). Die Annahme, dass Flavonoide in diesem Zusammenhang eine entscheidende Funktion übernehmen können, basiert auf ihrem nachweislich ausgeprägten antioxidativen Potential (50,54,62,77,83,85). Viele Flavonoide sind in der Lage, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen im menschlichen Organismus durch Abgabe von Wasserstoffatomen aus den phenolischen Hydroxylgruppen zu „neutralisieren“. Strukturbedingt gibt es deshalb große Unterschiede im antioxidativen Potential (83). Viele *in vitro* Studien zeigen eine klare Schutzwirkung der Flavonoide vor Lipidoxidation und Entstehung freier Radikale, die als initiale Ereignisse in der Entwicklung der Atherosklerose gelten (16,54,85). Für

Extrakte, reich an Procyanidin, wird ein direkter Einfluss auf die Entstehung früher atherosklerotischer Plaques dargestellt. Es zeigt sich eine verminderte Entwicklung von Plaques unter dem Einfluss von Procyanidin in Hamstern mit Hypercholesterinämie (5). Ähnliche Ergebnisse offenbart die Rotterdam Studie. In dieser prospektiven Studie wird der Einfluss von Tee - als Hauptquelle von Flavonoiden in der westlichen Nahrung - auf die Ausbildung atherosklerotischer Plaques der abdominalen Aorta untersucht. Nach einem Beobachtungszeitraum von zwei bis drei Jahren an insgesamt 3454 Frauen und Männern, kann eine signifikante Reduktion der Plaquegröße in der Gruppe mit schwerer Atherosklerose durch tägliches Trinken von Tee (> 4 Tassen/Tag) eruiert werden. Der Nachweis wird radiologisch anhand der kalzifizierten Areale in der *Aorta abdominalis* geführt (31).

Es gibt viele Hinweise, dass die endotheliale Dysfunktion ebenfalls zu initialen Schritten der Atherogenese zählt und mit dem Auftreten späterer kardiovaskulärer Ereignisse eng verbunden ist. Da die Dysfunktion des Endothels bereits vor sichtbaren strukturellen Veränderungen der Gefäßwand auftritt, haben Substanzen mit protektivem Einfluss auf die Endothelfunktion große klinische Bedeutung, wie z.B. die Statine (77). Duffy et al. untersuchen in einer Studie den Einfluss von Schwarztee - reich an Flavanolen und Flavonolen - auf die endotheliale Funktion anhand angiographisch ermittelter Vasodilatation der Arteria brachialis bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen. Sowohl die akute Wirkung, gemessen zwei Stunden nach Aufnahme von 450 ml Schwarztee, als auch die chronische Aufnahme von 900 ml Schwarztee täglich für vier Wochen, zeigen eine signifikante Zunahme der Dilatation. In der Kontrollgruppe wird kein Effekt nach Aufnahme von Wasser beobachtet (26).

In mehreren epidemiologischen Studien korreliert die Flavonidaufnahme invers mit dem Sterblichkeitsrisiko von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. In der niederländischen Zutphen Studie ist bei älteren Männern eine signifikante Senkung der Mortalität nach kontinuierlicher Aufnahme von Flavonoiden über Tee, Zwiebeln und Äpfel für etwa fünf Jahre nachweisbar. Eine Senkung der Inzidenz für Myokardinfarkte wird ebenfalls gezeigt, allerdings waren diese Effekte nicht signifikant (34). Ein Follow up dieser Studie über insgesamt 10 Jahre kann die signifikante Reduktion der Mortalität bestätigen (35). Eine finnische Studie registriert nach Aufnahme von Zwiebeln und Äpfeln eine Reduktion der Sterblichkeit an KHK von etwa 22% (43). Knekt et al. zeigen in einer

weiteren Studie mit insgesamt 10.054 Teilnehmern ebenfalls eine signifikante Senkung des Mortalitätsrisikos von ischämischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen nach Apfelkonsum (44).

Verschiedene Flavonoide weisen eine antiaggregatorische Wirkung auf. Für EGCG - ein Catechin mit hohem Anteil in grünem Tee - wird eine dosisabhängige Hemmung der Thrombin-, TRAP- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation in vitro nachgewiesen (21,69). Das antiaggregatorische Potential ist dem von Aspirin vergleichbar (69). Der inhibitorische Effekt der Tee-Flavonoide auf die Aggregation der Blutplättchen scheint zum Teil durch die Hemmung der zytosolischen Calciumfreisetzung bedingt zu sein (21,77). Die Flavonoid-induzierte Unterdrückung der Arachnoidensäurefreisetzung und Inhibition der Cyclooxygenase, mit verminderter Thromboxan-A<sub>2</sub>-Bildung, sind vermutlich die zu Grunde liegenden Mechanismen (45, 77,83). Die Hemmung der Cyclooxygenase wird unter anderem für Chrysin, Apigenin und Phloretin nachgewiesen (45).

Eine weitere Studie untersucht die Effekte von Rotwein, Traubensaft und Weißwein auf die Thrombozytenaktivität im Tierexperiment nach intravenöser und intragastraler Applikation. Für die Untersuchung wird eine Koronararterie zu 70% mechanisch stenotisiert und die, durch Thrombusformation resultierende, Verlangsamung des Blutflusses gemessen, welche als „Cyclic Flow Reduction“ (CFR) bezeichnet wird. Nach Verabreichung von Rotwein mit durchschnittlich 1,62 ml/kg intravenös und 4 ml/kg intragastral, wird die Verlangsamung des Blutflusses - also die CFR - vollständig aufgehoben. Im Gegensatz dazu zeigt Weißwein nur minimale Effekte, trotz Erreichen vergleichbarer Blutalkoholkonzentrationen. Traubensaft ist nicht so potent in der Wirkung wie Rotwein, bewirkt aber mit etwa 2,5-fach höherer Konzentration bei intragastraler Gabe ebenfalls eine vollständige Aufhebung der CFR. Des Weiteren ermitteln die Autoren die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation ex vivo vor und nach intragastraler Gabe von 10 ml/kg Traubensaft, mit einer nachweisbaren Reduktion von nahezu 68% nach Applikation. Somit ist der antithrombozytäre Effekt nicht auf den Alkoholgehalt, sondern wahrscheinlich auf den hohen Anteil polyphenolischer Komponenten in Trauben zurückzuführen. In den verwendeten Weinen und dem Traubensaft befinden sich hauptsächlich Quercetin und Rutin. Die enthaltenen Flavonoidkonzentrationen sind sehr unterschiedlich und korrelieren mit den

nachgewiesenen Effekten, wobei der Rotwein den größten Anteil an Flavonoiden besitzt (22).

Krebserkrankungen sind Todesursache Nummer 2 mit etwa 7,6 Millionen Verstorbenen weltweit im Jahr 2005 (84). In tierexperimentellen Studien werden antikanzerogene Wirkungen verschiedener Flavonoide nachgewiesen (25,83). Da der Krebsentstehung multifaktorielle Prozesse zu Grunde liegen, werden verschiedene Mechanismen diskutiert, wie Flavonoide protektiv eingreifen können. Einige Flavonoide sind starke Inhibitoren der Cytochrom-P450 abhängigen Monooxygenasen, wie z.B. Quercetin. Weiterhin können Phase-II-Enzyme und Apoptose durch Flavonoide induziert werden. Auch direkte Wechselwirkungen mit der DNA werden für Polyphenole nachgewiesen. Durch strukturelle Ähnlichkeiten mit den Nukleotiden ist eine Anlagerung möglich, was eine Maskierung der Bindungsstellen für Kanzerogene nach sich zieht und auf diese Weise die DNA schützt (83). Apfelextrakte führen zu einer signifikanten Hemmung der Tumorzellproliferation in Leberzellen (27) und der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-induzierten Nuclear-Factor- $\kappa$ -B (NF- $\kappa$ B) Aktivität in HUVEC Zellen als Kennzeichen maligner oder chronisch entzündlicher Erkrankungen (20). Des Weiteren wird durch kontinuierliche Aufnahme von Apfelextrakten bei Mäusen eine deutlich verminderte Papillomentstehung der Haut nach 20 Wochen beobachtet. Der hemmende Einfluss in dieser Gruppe erstreckt sich ebenfalls auf ein langsames Wachstum, weniger Vaskularisierung und fehlende Entartung der Tumoren. Darüber hinaus kann auch die Aktivator-Protein-1 (AP-1) Aktivität, die zur malignen Zellproliferation durch Aktivierung von Onkogenen führen kann, signifikant gehemmt werden (25). Flavonoid-reiche Ernährung, beispielsweise mit Äpfeln, könnte daher in Zukunft als Adjuvans in der Chemotherapie bedeutend sein, da Polyphenole selbst in hohen Dosen keinerlei Zytotoxizität gegenüber den Zellen zeigen (20,27).

Die bisher beschriebenen Effekte stellen nur einen Auszug aus den komplexen Wirkmechanismen der Flavonoide dar. Es gibt Hinweise für weitere verschiedenste Effekte der Polyphenole.

Eine kürzlich erschienene prospektive Studie mit 1836 Amerikanern japanischer Abstammung, untersucht über 10 Jahre das Auftreten von Alzheimer Demenz unter diätetischen Aspekten. Eine signifikante Reduktion dieses dementiellen Syndroms, trotz des vorhandenen Risikoallels ApoE- $\epsilon$ 4, wird nach Aufnahme von 3 und mehr Frucht-

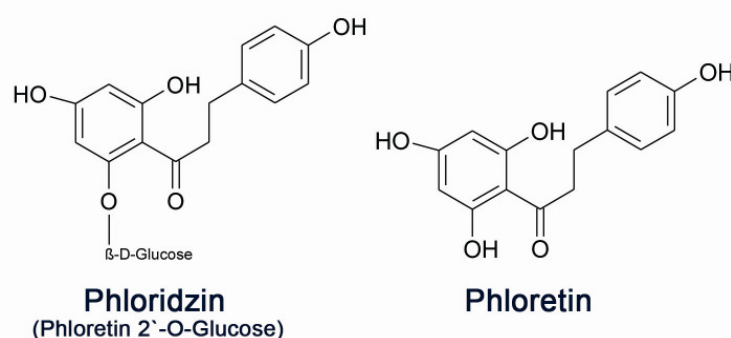
und Gemüsesäften pro Woche beobachtet. Sowohl Vitamin C und E als auch Tee Konsum haben keinen Effekt auf die Risikoentwicklung (19).

Eine andere Studie mit 2.512 Männern kann durch regelmäßige Apfelaufnahme eine signifikante Erhöhung der Lungenfunktion, gemessen an der FEV1 (forciertes endexpiratorisches Volumen in 1 Sekunde), nachweisen. Bei Aufnahme von 5 oder mehr Äpfeln pro Woche über 5 Jahre hinweg, erhöht sich die FEV1 um etwa 138 ml im Gegensatz zu der Gruppe ohne Apfelkonsum. Auch nach Anpassung der Risikofaktoren bleiben die Ergebnisse für Äpfel signifikant (13).

Die dargestellten Studien und vielfältigen Effekte der Flavonoide lassen ein extrem hohes Potenzial an Beeinflussung von Stoffwechselfvorgängen erkennen, das zum heutigen Zeitpunkt noch nicht überschaubar ist. Auch scheint die Einschätzung dieser Wirkungen durch die unzulängliche Übertragbarkeit von *in vitro* Studien auf die tatsächliche *in vivo* Situation schwierig.

### 1.1.5 Phloretin

Äpfel, als eine der Hauptressourcen von Flavonoiden in der westlichen Nahrung, sind auch die größte Quelle von Phloretin und seinem Glykosid Phloridzin (Phloretin 2'-O-Glucose). Diese, zur Gruppe der Dihydrochalcone gehörenden Flavonoide, sind viele Jahre als charakteristisch für Äpfel angesehen worden. Sie galten als einzige Quelle, bis zur Identifikation von Phloridzin in Erdbeeren 2003 (36) und Phloretin in Tomaten 2008 (76). Dihydrochalcone gehören zur Gruppe der bicyklischen Flavonoide. Ihre chemische Struktur ist in *Abbildung 2* dargestellt.



**Abb.2: Strukturformel von Phloridzin und Phloretin**  
 modifiziert nach Manach et al. (50)

Die Konzentration und Zusammensetzung der Phytochemikalien in den verschiedenen Ressourcen variiert sehr stark. Im Vergleich mit 10 anderen Früchten, weisen die untersuchten Äpfel in einer Studie die zweithöchste Konzentration an



Gesamtpolyphenolen auf. In den Äpfeln wird jedoch die größte Konzentration an freien Phenolen gemessen, was eine bessere Absorbierbarkeit der Substanzen vermuten lässt (11). Der durchschnittliche Phenolgehalt in Äpfeln beträgt 200 mg/100 g Frischgewicht (FG) und 400 mg/Apfel (49). Die Konzentrationen zwischen einzelnen Apfelsorten können stark voneinander abweichen. Der Polyphenolgehalt variiert je nach Wachstumsperiode, Saison, geographischer Lage und genetischer Vielfalt (81).

In zwei ähnlichen Bestimmungen von insgesamt 14 verschiedenen Apfelsorten aus Trentino, Italien und Ontario, Kanada reicht die Gesamtphenolkonzentration von 66,2 mg/100 g FG (Fuji) bis 300,6 mg/100 g FG (Northern Spy). Die von beiden getestete Sorte „Red Delicious“ variiert stark im Phenolgehalt mit 288,4 mg/100 g FG in Ontario und 131,1 mg/100 g FG in Trentino (80,82). Bei allen Untersuchungen wird festgestellt, dass sich der größte Anteil von Flavonoiden in der Schale befindet. Dihydrochalone gehören zu den Hauptflavonoiden in Äpfeln. In den verschiedenen Apfelsorten beider Studien werden Konzentrationen zwischen 1,99 mg (Royal Gala) und 28,04 mg/100 g FG (Red Delicious) ermittelt, was einem Anteil von 3% bis 11% an den Gesamtphenolen entspricht. Der höchste Gehalt an Dihydrochalconen ist in den Sorten Renetta, Red Delicious und Golden Delicious enthalten (80,82). In *Tabelle 2* ist der Gehalt an Dihydrochalconen ausgewählter Apfelsorten aus drei Studien dargestellt.

**Tabelle 2: Gehalt an Dihydrochalconen in verschiedenen Apfelsorten**

<b>Apfelsorten</b>	Ref.	Empire	Cortland	Golden Delicious	Red Delicious	Renetta
<b>Flavonoide</b>						
<b>Phloretin-Xyloglukoside</b>	80	4,12	3,25	9,46	5,45	
	46	1,72	3,20	1,92		
	82			1,26	0,85	6,14
<b>Phloretin-Glukoside</b>	80	1,60	-	0,64	2,93	
	46	2,80	1,44	1,8		
<b>Phloridzin</b>	80	8,26	4,56	8,54	19,66	
	82			1,53	3,61	9,34
<b>Gesamt Dihydrochalcone</b>	80	13,98	7,81	9,29	28,04	
	46	4,52	4,64	3,72		
	82			2,79	4,36	15,48

modifiziert nach Lee et al. (46), Tsao et al. (80) und Vrhovsek et al. (82)  
 alle Konzentrationen sind als mg/100g Frischgewicht dargestellt; Ref.= Referenz

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde Phloretin erstmals auch in Tomaten nachgewiesen. Mit einem Anteil von 5,0% bis 14,1% an den Gesamtflavonoiden gehört es nicht zu den Hauptvertretern in Tomaten (76). Sowohl Tomaten als auch Äpfel sind in der westlichen Nahrung weit verbreitet. Eine kontinuierliche Aufnahme an Phloretin ist dadurch sehr wahrscheinlich.

„ *An apple a day keeps the doctor away.* “ Dieses Sprichwort wird von verschiedenen Autoren immer wieder aufgegriffen und veranlasste zu vielen Studien über die Effekte von Äpfeln und deren Inhaltsstoffen. Einige Kohortenstudien zeigen eine deutliche Senkung der Mortalität an kardiovaskulären Erkrankungen nach Flavonoidaufnahme, speziell durch Äpfel (35,43). Weitere Ergebnisse weisen auf eine Risikoreduktion für Bronchialkarzinom, Diabetes mellitus Typ 2 und eine Senkung der Inzidenz für Asthma hin (44,83). Die zahlreichen biologischen Effekte basieren vor allem auf dem hohen antioxidativen Potential der Flavonoide.

Der Hauptanteil an Polyphenolen befindet sich in der Schale des Apfels und nur ein geringer Teil im Fruchtfleisch (14,79). Dementsprechend besteht eine positive Korrelation zwischen der Konzentration dieser sekundären Pflanzenstoffe und der totalen antioxidativen Kapazität, die in der Schale etwa 2,5-mal höher ist (14). Zu diesem Effekt tragen natürlich auch bekannte Antioxidantien wie Vitamin C bei. Es stellt sich daher die Frage, ob die antioxidative Wirkung nicht alleine auf dem Vorhandensein der Vitamine beruht. Eine Studie ging dieser Frage auf den Grund, indem sie die „Total Oxyradical Scavenging Capacity“ (TOSC) von Äpfeln ermittelt. Für 1 g Apfel (Schale und Fruchtfleisch) wird eine TOSC von 83,3  $\mu\text{mol}$  Vitamin C Äquivalent ermittelt, für Vitamin C allerdings nur 0,32. Die antioxidative Kapazität von 100 g Apfel ist demnach vergleichbar mit der von 1,5 g Vitamin C (27). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die protektive Wirkung durch das Vorhandensein von Flavonoiden zu erklären ist.

Zu den Hauptantioxidantien in Äpfeln gehören Dihydrochalcone, mit dem Hauptvertreter Phloretin. Signifikante antioxidative Effekte werden für das Aglykon und sein Glykosid Phloridzin beschrieben (43,57,71). Mit einer relativen TAC (Total antioxidant capacity) von 1,63 ist Phloretin ein potenteres Antioxidans als Vitamin C mit einer relativen TAC von 1,00 (46). Es wird mehrfach eine stärkere Radikalbindung und Hemmung der Lipidperoxidation für das Aglykon beschrieben (43,63,66). Sein Glykosid Phloridzin hingegen zeigt deutlich schwächere Wirkungen (57,63,71).

Ein sehr häufig beschriebener Effekt von Phloridzin und Phloretin bezieht sich auf die kompetitive Hemmung des Natrium-Glucose-Cotransporters 1 (SGLT1). Der inhibitorische Effekt des Glykosids ist dabei stärker ausgeprägt als beim Aglykon (63). In einem Modell mit diabetischen Ratten führt die Verabreichung von Phloridzin zu einer Reduktion der Plasmaglukosekonzentration, ohne eine Änderung der Insulinsekretion zu bewirken. Bei den mit Phloridzin behandelten Ratten wird durch die Hemmung des Glucose Transportes in der Niere eine 10-fach höhere Glucoseausscheidung im Urin nachgewiesen (68). Diesen Erkenntnissen zu Folge besitzen Phloretin und insbesondere Phloridzin eine antidiabetische Wirkung. Einer neueren Studie zufolge kann Phloretin auch über eine erhöhte Adipozytendifferenzierung die Insulinwirkung beeinträchtigen. In den Versuchen bewirkt Phloretin eine erhöhte Expression und Sekretion von Adiponektin, was zu einer Verminderung der peripheren Insulinresistenz führt. Dadurch kann die Wirkung von Insulin verstärkt werden mit niedrigeren Blutzuckerspiegeln im Verlauf (33).

Studien, die sich mit dem Einfluss von Phloretin auf die Thrombozytenfunktion beschäftigen, deuten darauf hin, dass dieses Flavonoid einen antiaggregatorischen Effekt besitzen könnte. Eine Hemmung der Aggregation in der Aggregometrie wird für die Stimulierung mit Arachnoidonsäure, Thrombin, ADP und Kollagen nachgewiesen. Das Ausmaß der Aggregationshemmung ist dabei abhängig vom gewählten Agonisten (45,59). In beiden Studien wird die Unterdrückung der Cyclooxygenaseaktivität - nachgewiesen durch Hemmung der Abbauprodukte - als verantwortlicher Mechanismus der anti-thrombozytären Wirkung angenommen (45,59).

Eine kürzlich erschienene Studie deutet auch auf einen kardioprotektiven Effekt durch Phloretin hin. Anhand kardialer Myozyten werden eine 4-fach erhöhte Kontraktilität sowie eine Verlängerung des Aktionspotentials durch den Einfluss des Flavonoids beschrieben. Als Mechanismus ist die Hemmung der sarkoendoplasmatischen Retikulum-ATPase und dem damit erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten ermittelt worden. Ein Effekt von Phloridzin kann nicht nachgewiesen werden. Als Ursache wurde eine verminderte intrazelluläre Aufnahme des Glykosids vermutet, da es nicht wie Phloretin über die Membran diffundieren kann sondern wahrscheinlich aktiv über den SGLT1 transportiert wird (58).

## 1.2 Struktur und Physiologie der Thrombozyten

### 1.2.1 Morphologie

Die Thrombozyten als kleinste korpuskuläre Bestandteile des zirkulierenden Blutes, mit einem Durchmesser von 2-4  $\mu\text{m}$ , sind erstmals 1880 als „äußerst dünne Plättchen in Gestalt von Scheiben“ beschrieben worden (10). Diese Beobachtung entspricht ihrer diskoiden Form im ruhenden Zustand. Die Aktivierung durch Agonisten bedingt eine Formveränderung zu sternförmigen Echinosphärozyten mit charakteristischen Ausstülpungen der Plasmamembran - den Pseudopodien (29).

Thrombozyten sind anukleäre Zellen, deren Ursprung im Knochenmark liegt, wo diese aus Megakaryozyten gebildet werden. Physiologisch zirkulieren etwa 150.000 bis 300.000/ $\mu\text{l}$  im peripheren Blut mit einer Überlebenszeit von etwa 7 Tagen. In der Milz werden ein Drittel der Blutplättchen gespeichert, wobei ein ständiger Austausch mit den zirkulierenden Thrombozyten besteht. Der Abbau erfolgt im retikuloendothelialen System der Leber und der Milz. Thrombozyten besitzen eine komplexe Struktur, die morphologisch in vier Bereiche mit jeweils spezifischer Funktion unterteilt werden können (29).

Die **periphere Zone** wird durch eine trilaminäre Zellmembran gebildet, bestehend aus der außen gelegenen Glykokalyx, reich an verschiedenen Proteinen und Mucopolysacchariden, sowie der Zytoplasmamembran mit typischer Phospholipidschicht (Bilayer) (29). In die Membran ist eine Vielzahl verschiedener Glykoproteine eingebaut, die Rezeptor-, Adhäsions- und Transportfunktionen besitzen (8).

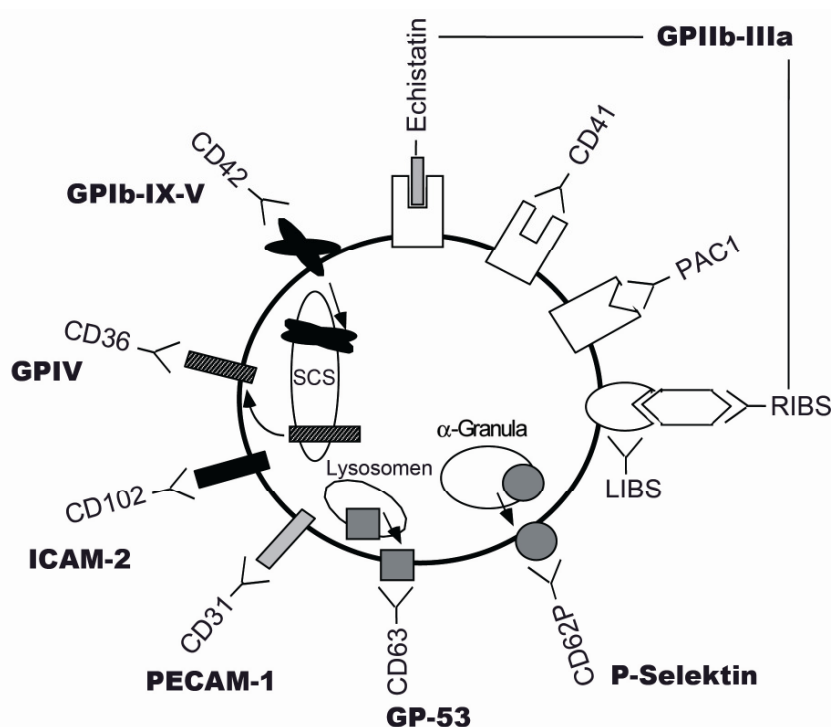
Die **strukturelle Zone** besteht aus den submembranös gelegenen Mikrotubuli und verschiedenen Strukturproteinen, die das Zytoskelett bilden. Dieses besteht hauptsächlich aus Aktin und Myosin, die ebenso für die Formveränderungen der Thrombozyten verantwortlich sind (29).

Die **Zone der Organellen** liegt im Zytoplasma und beinhaltet überwiegend Mitochondrien und drei verschiedene Arten thrombozytärer Speichergranula. Die *dichte Granula* - benannt nach ihrer charakteristischen elektronenmikroskopischen Dichte - enthalten ADP, ATP, Calciumionen und Serotonin, welche die Aggregation beeinflussen. *Lysosomen* speichern hydrolytische Enzyme, die denen anderer Zellen ähneln. In den zahlenmäßig überwiegenden  $\alpha$ -*Granula* befinden sich verschiedene

Proteine die Einfluss auf vielfältige biologische Funktionen wie Adhäsion, Aggregation, Inflammation, Chemotaxis und Koagulation ausüben können (29).

Das **Membransystem** besteht aus dem offenen kanalikulären System und dem dichten tubulären System, welches als Hauptspeicherort der freien Calciumionen maßgeblich an Aktivierung und Regulation des Plättchenmetabolismus beteiligt ist. Das offene kanalikuläre System ist charakterisiert durch seine weit ins Zellinnere reichenden Kanäle, die gleichzeitig mit der Plasmamembran verbunden sind. Daraus resultiert eine enorme Oberflächenvergrößerung der Thrombozyten (29).

### 1.2.2 Thrombozytäre Membranrezeptoren



**Abb.3: Immunologische Marker**  
modifiziert nach Gawaz et al. (29)

Rezeptoren sind definiert als an der Oberfläche intakter Zellen nach außen orientierte Membranglykoproteine, die einen Liganden oder Agonisten reversibel, spezifisch und einer Sättigungskinetik folgend, binden und dadurch eine (intra)zelluläre Reaktion auslösen (8). Diese Glykoproteine (GP) vermitteln die Interaktion der Thrombozyten untereinander, mit dem Endothel, mit anderen zirkulierenden Zellen und mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren. Nach ihrer charakteristischen molekularen Struktur

werden die Adhäsionsrezeptoren in vier unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Eine Übersicht stellt die *Tabelle 3* dar (29). In *Abbildung 3* erfolgt zudem eine graphische Darstellung der immunologischen Marker (29).

**Tabelle 3: Übersicht der thrombozytären Membranrezeptoren**

Elektrophoretische Klassifizierung	Klassifizierung	Rezeptorzahl Pro Plättchen	Ligandenspezifität
<b>Integrine</b>			
GPIa-IIa	$\alpha_2\beta_1$	1.000	Kollagen, Laminin
GPIc-IIa	$\alpha_5\beta_1$	1.000	Fibronektin
GPIc-IIa	$\alpha_6\beta_1$	1.000	Laminin
GPIIb-IIIa	$\alpha_{IIb}\beta_3$	60.000-100.000	Fibrinogen, vWF, Fibronektin, Vitronektin
GP $\alpha_v$ -IIIa	$\alpha_v\beta_3$	100	Vitronektin, Fibrinogen, Fibronektin, vWF
<b>Leuzinreiche Glykoproteine</b>			
GPIb-V-IX		25.000	vWF
GPIV		15.000-25.000	Kollagen
<b>Selektine</b>			
P-Selektin		12.000	PSGL-1, GPIb
<b>Immunglobulintyp- Rezeptoren</b>			
ICAM-2		5.000	Fibrinogen
PECAM-1		3.000	PECAM-1
GPVI			Kollagen

GP = glykoprotein, ICAM = „intercellular adhesion molecule“, PECAM = „platelet-endothelial cell adhesion molecule“, vWF = von Willebrand Faktor, PSGL = P-selektin glykoprotein ligand

### 1.2.2.1 Integrine

Diese Gruppe der Rezeptoren ist so benannt worden, da sie Liganden der extrazellulären Matrix mit dem Zytoplasma verbindet. Es sind nicht-kovalent verbundene Heterodimere, bestehend aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit. Letztere ist maßgeblich für die Einteilung in drei Gruppen (8,29). Die Integrine kommen ubiquitär vor und finden sich auf fast allen Zellen des Körpers. Neben der Plättchenadhäsion und

-aggregation sind sie auch an der Gewebeentwicklung, dem Krebszellwachstum und deren Metastasierung beteiligt (9,29).

GPIIb-IIIa ist der Hauptvertreter dieser Familie und gehört zu den  $\beta_3$ -Integrinen. Als mengenmäßig am häufigsten vorkommender Rezeptor der Plättchen, ist er Bestandteil der Plasmamembran, des offenen kanalikulären Systems und der  $\alpha$ -Granula (29). Durch die Bindung von Fibrinogen nach Aktivierung des Thrombozyten kommt dem GPIIb-IIIa Komplex eine zentrale Bedeutung in der Plättchenaggregation zu. Im Bereich des Moleküls sind bisher drei Bindungsstellen für Fibrinogen entdeckt worden. Aber auch andere Agonisten können über eine Bindung zur Konformationsänderung mit nachfolgender Aktivierung führen. Massberg et al. untersuchen in ihrer Arbeit die Rolle der Thrombozyten in der Adhäsion und Progression der Atherosklerose *in vivo* an der ApoE-Knock-out-Maus mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie (51,53). Eine der Studien zeigt, dass bereits nach 6 Wochen cholesterinreicher Fütterung - ohne Nachweis von atherosklerotischen Läsionen - die Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel signifikant erhöht ist (51). Die anschließend durchgeführte Blockade des GPIIb-IIIa Rezeptors durch monoklonale Antikörper (mAK) führt zu einer Hemmung der permanenten Plättchenadhäsion von 95% gegenüber unbehandelten Mäusen (51). In einer Folgestudie an einem erweiterten Mausmodell, welches neben der ApoE-Defizienz zusätzlich eine Defizienz an GPIIb-IIIa aufweist, wird eine drastische Reduktion atherosklerotischer Läsionen detektiert. In der Bifurkation der *Arteria Carotis* ist die Reduktion mit 74% - nach 12 Wochen cholesterinreicher Fütterung - am stärksten ausgeprägt. Während nach 16 Wochen cholesterinreicher Ernährung in ApoE-defizienten Mäusen eine gesteigerte Thrombozytenadhäsion am Endothel der Carotiden stattfindet, beobachten sie in den GPIIb-IIIa-defizienten Mäusen eine vollständige Blockade der festen Plättchenadhäsion (53).

### **1.2.2.2 Leuzinreiche Glykoproteine**

Diese Gruppe der Rezeptoren ist durch ihre hohe Konzentration an der Aminosäure Leuzin charakterisiert. Die wichtigsten Vertreter sind die zwei Komplexe GPIV und GPIb-V-IX. Letzterer bildet den Adhäsionsrezeptor für vWF (von Willebrand Faktor) und induziert mit dessen Bindung an zirkulierende Thrombozyten den ersten Schritt der primären Hämostase. Der Komplex setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen.

Zentrale Bedeutung kommt dabei der GPIIb $\alpha$  Einheit zu, die Bindungsstellen in der extrazellulären Domäne für vWF und auch Thrombin enthält. Über die intrazelluläre Domäne steht sie mit dem Zytoplasma in Kontakt. Sie ist kovalent mit der GPIIb $\beta$  Einheit über Disulfidbrücken verbunden. Nicht kovalent bindet die GPV-Einheit an die GPIIb Einheit im Verhältnis 1:1 und jeweils zwei dieser Verbindungen umrahmen die GPIX-Einheit als zentrales Molekül (15,29).

### 1.2.2.3 Selektine

Selektine sind vaskuläre Adhäsionsrezeptoren, die im Wesentlichen die Interaktion zwischen Zellen vermitteln. Das größte der bisher drei bekannten Selektine ist P-Selektin, welches als Einziges in Thrombozyten vorkommt. Dort wird es in den  $\alpha$ -Granula gespeichert und ebenso wie in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen, erst nach Aktivierung der Zellen auf der Oberfläche exprimiert (3,29). P-Selektin fördert die Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten und Monozyten an die Endothelläsion, sowie deren Bindung an Thrombozyten. Damit begünstigt es die inflammatorische Reaktion und Atherogenese der Gefäßwand (3,29).

### 1.2.2.4 Rezeptoren vom Immunglobulintyp

Die Funktionen von „Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1“ (PECAM-1) und „Intercellular adhesion molecule-2“ (ICAM-2) für die Thrombozytenfunktion sind bislang noch weitgehend ungeklärt. Sie scheinen neben der Plättchenadhäsion an das Endothel, auch an der Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten beteiligt zu sein (29). Auch das Glykoprotein GPVI gehört zur Gruppe der Immunglobuline und ist ein thrombozytärer Kollagenrezeptor. Eine Studie an Mäusen weist erstmals mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* die Beteiligung des Glykoproteins GPVI am initialen Kontakt der Thrombozyten zur geschädigten Gefäßwand nach. GPVI-defiziente Mäuse, die durch Injektion des mAK JAQ1 entwickelt wurden, weisen eine signifikante Reduktion sowohl der transienten als auch der permanenten Plättchenadhäsion am geschädigten Subendothel der *Arteria carotis* auf (52).



### 1.2.3 Stadien der Primären Hämostase

Die nachfolgend erläuterten komplexen Mechanismen der Hämostase dienen dem Schutz vor größeren Blutverlusten bei Aufhebung der Gefäßwandintegrität durch Verletzungen. Daran sind verschiedene Systeme beteiligt, mit jeweils pro- und antithrombotischen Eigenschaften, die sich unter physiologischen Bedingungen im Gleichgewicht befinden. Verschiebt sich dieses, können daraus sowohl ein unkontrolliertes Thrombuswachstum als auch verlängerte Blutungen resultieren (29).

#### 1.2.3.1 Adhäsion

Als erster Schritt in der primären Hämostase wird die Adhäsion von noch ruhenden Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand angesehen. Verletzungen der Gefäßintima stören die antithrombotischen Eigenschaften des Endothels und präsentieren die Struktur- und Matrixproteine des Subendotheliums den Thrombozyten. Der erste Kontakt wird zwischen dem thrombozytären Membranglykoproteinkomplex GPIb-V-IX und dem kollagenimmobilisiertem vWF des Subendotheliums hergestellt. Diese Interaktion zeichnet sich durch eine hohe Affinität aus, um eine Adhäsion auch in Gefäßbereichen mit hohen Scherkräften zu ermöglichen (29,41,52). Unter physiologischen Bedingungen sollten Thrombozyten nicht mit der Gefäßwand interagieren. Neuere Studien beweisen jedoch auch eine Anlagerung der Blutplättchen an strukturell intakte Endothelzellen, wie bereits unter 1.1.2.1 dargestellt (51,53). Die Stabilisierung der Plättchenadhäsion erfolgt über die Bindung von Kollagen. Neben dem Integrin  $\alpha_2\beta_1$  ist auch GPVI an diesem Prozess maßgeblich beteiligt. Durch die Verbindung mit Kollagen werden Signaltransduktionen im Thrombozyten ausgelöst, welche in nachfolgender Aktivierung und Sekretion der Plättchen resultiert (29,41,52).

#### 1.2.3.2 Aktivierung

Neben der Adhäsion kann auch die direkte Bindung löslicher Agonisten wie ADP und Thrombin den Aktivierungsprozess auslösen. Dies ist ein komplexer Vorgang, der in mehreren Schritten abläuft (29,41).

Durch Bindung der Agonisten wird eine Kaskade von Signalen induziert, die mittels Bildung von „second messenger“ ins Zytoplasma übertragen werden, so genanntes

„outside-in-signaling“. Neben einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bewirken sie eine Reihe von metabolischen Veränderungen, die unter anderem zur Sekretion der Granula und Aktivierung der Glykoproteine führen (29,41).

Wird eine definierte Schwelle der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration überschritten, verändert der Thrombozyt seine Form und bildet Pseudopodien aus. Die daraus resultierende Oberflächenvergrößerung erhöht die Interaktion mit plasmatischen Reaktionen (29,41).

Durch die oben beschriebene Signaltransduktion und Adhäsion kommt es zu einer Konformationsänderung im Aggregationsrezeptor GPIIb-IIIa mit Freilegung der Fibrinogenbindungsstelle und einer Erhöhung der Oberflächendichte an GPIIb-IIIa. Erst durch diesen Schritt kann lösliches Fibrinogen an den Rezeptor binden und die Aggregation induzieren (29,41).

Als Sekretion oder Degranulation wird die Freisetzung der thrombozytären Granulainhaltsstoffe bezeichnet. Ein Prozess, der beim Überschreiten einer Granula spezifischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, entweder durch Verschmelzung mit dem offenen kanalikulären System oder als Exozytose erfolgt. Zuerst degranulieren die dichten Granula, dann die  $\alpha$ -Granula und zum Schluss die Lysosomen. Die freigesetzten Stoffe führen über Aktivierung und Rekrutierung noch zirkulierender Thrombozyten und Förderung der Fibrinbildung letztendlich zur Konsolidierung der Plättchenthrombi. Die  $\alpha$ -Granula setzen unter anderem P-Selektin und CD40L frei, die eine Interaktion zwischen den Thrombozyten und zirkulierenden Leukozyten und Monozyten induzieren und damit maßgeblich an der Entzündungsreaktion beteiligt sind (29,41).

### **1.2.3.3 Aggregation**

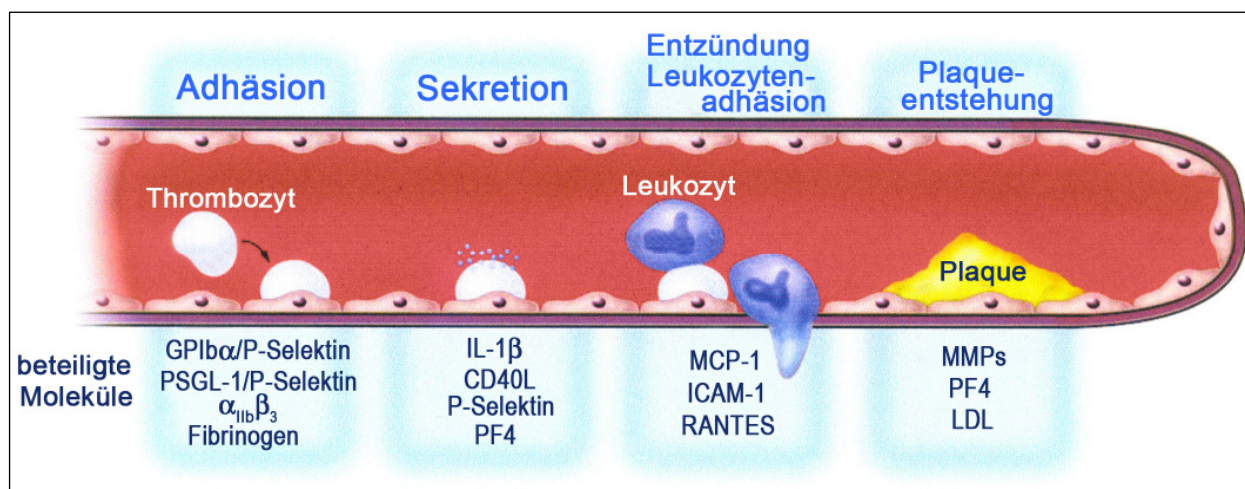
Als Aggregation wird die Koadhäsion zwischen zwei Thrombozyten bezeichnet. Dieser Prozess beginnt mit der Sekretion der Granula, die prokoagulatorische Substanzen und Agonisten in das direkte Umfeld der Blutplättchen abgeben. Eine zentrale Bedeutung kommt dabei dem GPIIb-IIIa Komplex auf dem aktivierten Thrombozyten zu. Fibrinogen kann an diesen Komplex in Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$  binden und über Vernetzung benachbarter Blutplättchen Mikroaggregate bilden. Diese initiale Verbindung ist noch reversibel. Sie wird über die Aktivierung der Gerinnungskaskade und nachfolgender

Thrombin-induzierter Konversion von Fibrinogen zu Fibrin stabilisiert. Dieser Vorgang wird als sekundäre Aggregation bezeichnet (29,41).

#### **1.2.4 Bedeutung der Thrombozyten in der Atherogenese**

Thrombozyten spielen eine multifaktorielle Rolle in verschiedenen Phasen der Atheroskleroseentstehung. Kardiovaskuläre Risikofaktoren sind mit einer erhöhten basalen Aktivierung von Thrombozyten assoziiert. Ein kurzer Kontakt mit dem Endothel im Bereich veränderter Scherkräfte (Gefäßaufzweigungen) könnte eine Aktivierung der Endothelzellen bewirken (29). Es ist bereits gezeigt worden, dass zirkulierende Blutplättchen auch direkt an intaktes Endothel adhären können (30,51,53). Diese erste lose Verbindung scheint neben dem GPIIb/IIIa auch durch P-Selektin, sowohl auf Thrombozyten als auch aktivierten Endothelzellen, vermittelt zu werden (30). Blutplättchen beinhalten in hohen Konzentrationen proinflammatorische und mitogene Substanzen, die nach Aktivierung in die direkte Umgebung abgegeben werden. Dadurch verändern sich die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften der Endothelzellen (29,30). Von besonderer Bedeutung für den Prozess der Atherogenese sind dabei das Zytokin IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 beta) und der Rezeptor CD40L, welche zur Aktivierung der Endothelzellen führen. Von den freigesetzten proinflammatorischen Faktoren vermittelt, kommt es in der Endothelzelle zu einer verstärkten Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1 sowie zur Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen wie MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1). MCP-1 fördert insbesondere Chemotaxis und Transmigration von Monozyten durch das Endothel, die zu Makrophagen differenzieren und nach Phagozytose von oxidierten LDL-Partikeln zu Schaumzellen (foam cells) transformieren. Es kommt zur Ausbildung atherosklerotischer Plaques (29,30). Die Sekretion des Chemokins RANTES triggert ebenso wie MCP-1 hauptsächlich die Monozytenadhäsion sowohl an Blutplättchen als auch an das aktivierte Endothel (3,30). Makrophagen und aktivierte Thrombozyten fördern die Proliferation der glatten Muskelzellen über einen PDGF (platelet-derived growth factor) abhängigen Mechanismus (29). Die Adhäsion von Leukozyten an Thrombozyten wird hauptsächlich durch P-Selektin vermittelt. Im weiteren Verlauf der Atherogenese führt Adhäsion und nachfolgende Aggregation noch zirkulierender Thrombozyten - vermittelt durch Zytokine und Chemokine - zum Wachstum der atherosklerotischen Plaques (30). Somit kommt den Thrombozyten eine zentrale Rolle

in der Entstehung und der Progression atherosklerotischer Läsionen zu. In *Abbildung 4* ist eine Zusammenfassung der thrombozytären Beteiligung in der Atherogenese dargestellt (30).



**Abb. 4: Model der Atherogenese - getriggert durch Thrombozyten**  
modifiziert nach Gawaz et al. (30)

## 2 Fragestellung

Ernährungsbedingte Krankheiten, wie z.B. Diabetes mellitus, Adipositas und insbesondere kardiovaskuläre Erkrankungen zeigen in Industrieländern einen stetigen Zuwachs. Die Ernährung ist dadurch zum primären Ansatz der Prävention geworden. Lange Zeit unbekannt war das Vorhandensein von sekundären Pflanzenstoffen besonders in Obst und Gemüse. Phloretin – ein Flavonoid aus der Gruppe der Dihydrochalcone – ist durch sein Vorkommen in Äpfeln und Tomaten in der westlichen Ernährung weit verbreitet. Die Effekte von Phloretin sind bisher wenig erforscht. In einigen Studien wurden Hinweise auf ein antiaggregatorisches Potential dieses Flavonoids mittels Aggregometrie beschrieben (45,59). Die genaue Wirkungsweise ist nach wie vor ungeklärt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher zu prüfen, ob Phloretin einen antithrombozytären Effekt zeigt und dadurch die Aggregation beeinflussen kann. Zu diesem Zweck haben wir die Wirkung des Flavonoids auf die Thrombozytenaktivität anhand von Oberflächenrezeptoren mittels Durchflusszytometrie getestet. Als funktioneller Gerinnungstest wird zudem die Aggregometrie durchgeführt. Aggregationshemmer sind ein wichtiger Bestandteil in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen, was den Stellenwert dieses Themas aufzeigt. Die Kenntnis über genaue Wirkungen und deren Mechanismen pflanzlicher Stoffe in diesem Spektrum, könnten bei der primären Prävention dieser Erkrankungen von Bedeutung sein.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Durchflusszytometrie**

##### **3.1.1 Funktionsprinzip Durchflusszytometer**

Die bereits Ende der achtziger Jahre etablierte Methode der durchflusszytometrischen Messung ermöglicht es, spezifische Veränderungen der Thrombozytenoberfläche genauestens zu charakterisieren (73). Dass diese Technik auch reproduzierbare Aussagen über ex vivo Situationen zulässt, ist bereits in zahlreichen Studien belegt worden (24,73). Des Weiteren dient sie inzwischen sowohl der diagnostischen als auch der therapeutischen Beurteilung zahlreicher Krankheitsbilder (1,24,37,56). Für die im Anschluss beschriebenen Messungen der Thrombozytenaktivität wird ein Durchflusszytometer vom Typ „FACSCalibur“ (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Mit dieser Methode werden verschiedene Parameter der zu untersuchenden Zelle simultan ermittelt, die eine Klassifizierung und Charakterisierung ermöglichen. Die Größe und interne Komplexität wird bestimmt durch die Granularität der Zelle und die relative Fluoreszenzintensität ist abhängig von der Probenbearbeitung (7,29). Um die Zellen registrieren zu können, werden sie vor der Messung mit spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAK) gegen einzelne Oberflächenproteine (Thrombozytenrezeptoren) markiert. Die entstandene Zellsuspension wird unter Druckluft vom Durchflusszytometer angesaugt und von einer Trägerflüssigkeit erfasst, die die Probe in einer laminaren Strömung durch den Laserfokus führt (7). Für die Messungen wurde FACSCalibur (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) als Trägerflüssigkeit verwendet. Der Abstand zwischen dicht aufeinander folgenden Zellen sollte vergrößert werden, so dass möglichst immer nur eine Zelle den Kreuzpunkt passiert. Dies wird durch Einstellung der Durchflussrate Low (~12 µl Probe pro Minute) am Gerät erreicht. An dem Kreuzpunkt trifft der Argonlaser (488 nm) auf den Zellstrom, was zur Entstehung von Streulicht führt. Dabei wird ein Teil des Lichtes in Verlaufsrichtung des Lasers gestreut und als Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) bezeichnet. Es entsteht proportional zur Zelloberfläche. Der andere Teil des Lichtes wird im rechten Winkel vom Laserstrahl aus gestreut - das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scatter). Es steigt proportional mit der internen Komplexität der Zelle (7). Eine große Zelle - die reich an Granula ist - würde also sowohl im FSC als auch im SSC

eine große Streuung des einfallenden Lichtes verursachen. Durch Messung der relativen Fluoreszenzintensität kann die Oberflächenexpression der Antigene bestimmt werden. Das emittierte Fluoreszenzlicht ist dabei proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle und wird im rechten Winkel zum einfallenden Licht gemessen. Die Fluoreszenz der Zellen ist abhängig vom Fluoreszenzfarbstoff der monoklonalen Antikörper, mit denen sie markiert werden. Dazu ist eine Anregung der Fluorochrome durch das Laserlicht der Wellenlänge 488 nm notwendig. Ein System von optischen Spiegeln und Filtern leitet das seitwärts emittierte Fluoreszenzlicht einer spezifischen Wellenlänge zu den entsprechenden Detektoren (FL). Um Mehrfachfluoreszenzen messen zu können, müssen die Emissionsspektren der Fluorochrome verschieden sein, wobei kleinere Überlagerungen durch Kompensation ausgeglichen werden können (7). Für die nachfolgenden Messungen werden die Fluorochrome FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) mit einem Emissionsmaximum bei 530 nm in FL1, PE (Phycoerythrin) mit einem Emissionsmaximum bei 585 nm in FL2 und PerCP (Peridinin-Chlorophyll-Protein) mit einem Emissionsmaximum bei 650 nm in FL3 verwendet. Insgesamt stehen an dem für diese Studie verwendeten Gerät vier Detektoren zur Verfügung, die eine gleichzeitige Registrierung von bis zu vier Fluoreszenzfarbstoffen ermöglichen.

Zur Auswertung der verschiedenen Parameter jeder Zelle werden die Daten über Signalverstärker in elektronische Signale umgewandelt und an einen angeschlossenen Computer gesendet. Für diese Studie wird zur Analyse der Daten das Auswertungsprogramm „CellQuest“ des Herstellers verwendet.

### **3.1.2 Monoklonale Antikörper**

In *Tabelle 4* sind alle in dieser Studie verwendeten Antikörper mit der jeweiligen Färbung und ihren Bindungsstellen dargestellt.

Die Antikörper CD62P und die Isotypenkontrolle IgG1 stammen von Immunotech (Marseille, Frankreich), PAC-1 und CD42a von Becton-Dickinson (San Jose, USA) und die IgM Isotypenkontrolle von BD Biosciences (San Diego, USA).

**Tabelle 4: Monoklonale Antikörper**

Antikörper	Färbung	Bindungsstelle	Funktion
CD42a	PerCP	GP IX Rezeptor und GP Ib-IX-V Rezeptor Komplex (Rezeptor für von-Willebrand-Faktor)	Identifizierung der Thrombozyten im Vollblut
CD62P	PE	P-Selektin ( $\alpha$ -Granula Protein)	Aktivierungsmarker
PAC-1	FITC	Aktivierter GP IIb/IIIa Rezeptor (an Fibrinogen-Bindungsstelle der Untereinheit GP IIIa)	Aktivierungsmarker
IgG1	PE	Isotypenkontrolle zu CD62P (erfasst Anteil der an Thrombozyten erzielten unspezifischen Markierung)	Kontrolle
IgM	FITC	Isotypenkontrolle zu PAC-1 (erfasst Anteil an nicht-spezifischen Bindungen an Fc-Rezeptoren)	Kontrolle

Färbungen: PerCP = Peridin-Chlorophyll-a-Protein, PE = R-Phytoerythrin, FITC = Fluorescein Isothiocyanat

### 3.1.3 Studien

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Effekt des Flavonoids Phloretin auf die Thrombozytenaktivierung darzustellen. Es wurden nur gesunde Probanden untersucht, da verschiedene Krankheiten mit einer erhöhten basalen Aktivierung der Blutplättchen assoziiert sind (29). Keiner der Probanden hatte Acetylsalicylsäure oder andere Thrombozytenaggregationshemmer im Zeitraum von sieben Tagen vor der Untersuchung eingenommen. Alle Probanden nahmen freiwillig an der Studie teil. Insgesamt wurden fünfzehn Probanden in der Studie untersucht. Dabei ergaben sich Differenzen in der basalen Stimulierung der Proben mit den Agonisten ADP und TRAP-6 ohne den Zusatz von Phloretin. Auf Grund dessen wurden alle anderen Proben, die eine basale Stimulierung <15% positive Thrombozyten für die verwendeten mAK aufwiesen, nicht in die Auswertung aufgenommen. Die daraus resultierenden demographischen Daten der Probanden sind in *Tabelle 5* aufgeführt.

**Tabelle 5: Demographische Daten der Probanden**

	mAK PAC-1		mAK CD62P	
	ADP (n = 10)	TRAP- 6 (n = 10)	ADP (n = 10)	TRAP- 6 (n = 10)
Alter (Jahre)	32,9 $\pm$ 10,2	31,6 $\pm$ 9,0	26,4 $\pm$ 2,6	26,4 $\pm$ 2,6
Geschlecht (m / w)	4 / 6	4 / 6	5 / 5	5 / 5

Angaben in absoluter Probandenzahl oder Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

### 3.1.4 Probengewinnung und Aufbereitung

Ziel des nachfolgend beschriebenen Abnahme- und Aufbereitungsverfahrens in dieser Studie war die möglichst artefaktfreie Herstellung von Vollblutproben zur Messung der Thrombozytenaktivität. Den Probanden wurde dazu einmalig Blut aus einer mäßig gestauten Oberarmvene durch Punktion mit einer 21 Gauche-Kanüle (Venisystems, Sligo, Ireland) entnommen. Nach Verwerfen der ersten 3 ml Blut wurden für die durchflusszytometrische Messung 5 ml Blut in mit 3,8% Zitrat antikoagulierte Monovetten (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) abgenommen. Es gab Hinweise, dass Heparin und speziell EDTA die Struktur der Oberflächenrezeptoren und damit der Thrombozytenaktivierung beeinflusst (67,72). Eine Beeinträchtigung der Bindung von PAC-1 an fixierte oder mit EDTA behandelte Thrombozyten wurde auch durch den Hersteller des monoklonalen Antikörpers (Becton-Dickinson) angegeben. Aus diesem Grund und da die Proben sofort bearbeitet wurden, erfolgte keine Fixierung des Blutes wie in vielen anderen Studien. Die Stabilisierung der Thrombozyten durch Fixieren könnte sich nachteilig in einer Epitopänderung und einer erhöhten Autofluoreszenz der mAK auswirken (38,67,72).

Zur Evaluierung des Effektes von Phloretin wurden 1 ml Aliquots des Citratblutes mit Phloretin (Sigma/Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) in den Endkonzentrationen 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  für 30 Minuten bei Raumtemperatur versetzt. Zur Kontrolle diente ein weiterer Ansatz mit dem Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) in der Konzentration von 0,1%. Anschließend wurden den inkubierten Proben (100  $\mu\text{l}$ ) jeweils 100  $\mu\text{l}$  eines Agonisten zugegeben bzw. PBS (phosphate buffered saline) als unstimulierter Referenzwert. In dieser Studie wurde ADP (Adenosindiphosphat) (50  $\mu\text{M}$ ) (Sigma/Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) und TRAP-6 (thrombin-receptor-activating-peptide) (15  $\mu\text{M}$ ) (Bachem Biochemica, Bubendorf, Schweiz) verwendet. Die Lösungen wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur besseren Durchmischung erfolgte eine Verdünnung aller Proben von 1:20 mit PBS. Im nächsten Schritt wurden die monoklonalen Antikörper in sättigender Konzentration zugegeben, zur Detektion der thrombozytären Oberflächenproteine. Die mAK wurden in zuvor beschriftete FACS-Röhrchen pipettiert. Das genaue Schema ist in *Tabelle 6* dargestellt.



**Tabelle 6: Pipettierschema der mAK**

CD62P	IgG1	PAC-1	IgM
5 µl CD42a-PerCP 12 µl CD62P-PE	5 µl CD42a-PerCP 12 µl IgG1-PE	5 µl CD42a-PerCP 10 µl PAC-1-FITC	5 µl CD42a-PerCP 5 µl IgM-FITC 5 µl PBS
50 µl Vollblut (verdünnt)	50 µl Vollblut (verdünnt)	50 µl Vollblut (verdünnt)	50 µl Vollblut (verdünnt)

Färbungen: PerCP = Peridin-Chlorophyll-a-Protein; PE = R-Phytoerythrin; FITC = Fluorescein Isothiocyanat

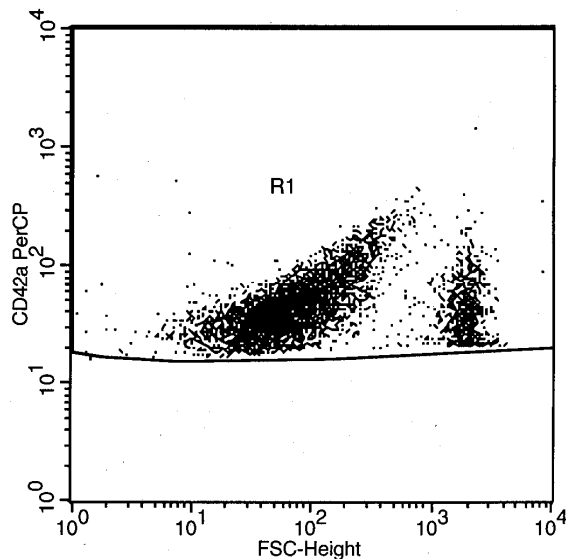
Die Ansätze wurden anschließend unter Lichtausschluss und ohne Agitation 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörperbindung wurde durch Zugabe von jeweils 200 µl kaltem PBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) gestoppt. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte sofort im Anschluss.

### 3.1.5 Durchflusszytometrische Messung

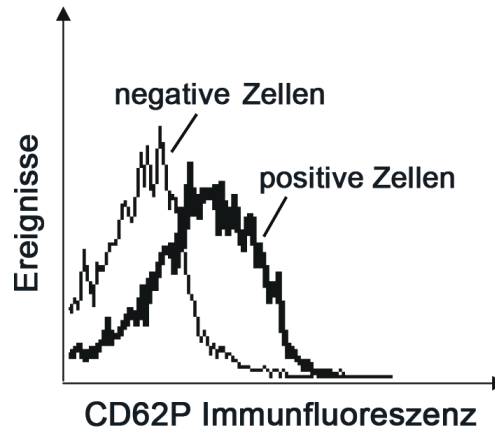
Das Durchflusszytometer registriert Zellen und andere Partikel die den Messpunkt passieren. Um selektiv eine spezielle Zellgruppe messen zu können - wie in dieser Studie die Thrombozyten - muss eine entsprechende Auswahl in der Software erfolgen. Durch ihre charakteristische Lichtstreuung lassen sich die Blutplättchen sehr gut in einer Zweiparameterdarstellung - auch Dot Plot genannt - auswählen. Dabei wird das FSC gegen SSC oder besser noch gegen einen thrombozytenspezifischen mAK wie CD42a aufgetragen. Gleichzeitig kann die Erfassung von lysierten Erythrozyten oder Zelltrümmern durch einen vorher festgelegten Schwellenwert für FSC ausgeschlossen werden. Die als Punktwolken angeordneten Thrombozyten lassen sich durch Eingrenzung in Regionen weiter analysieren. In *Abbildung 5* ist die Originalregistrierung eines Dot Plot mit Abgrenzung der Thrombozytenpopulation dargestellt. Es werden bei jeder Messung 5.000 Events (Zellsignale) gezählt. Die Einstellung des Registrierbereiches erfolgt vor jeder neuen Messung. Für die Erfassung der Thrombozyten die CD62P oder PAC-1 gebunden haben, werden ebenfalls Zweiparameterdiagramme verwendet in denen die Fluoreszenz der mAK gegen die von CD42a aufgetragen wird. Neben der Gesamtfluoreszenz der beiden mAK gilt ein besonderes Interesse dem Anteil der CD62P- bzw. PAC-1-positiven Blutplättchen zur Detektion der Thrombozytenaktivierung. Um diese messen zu können, verwenden wir eine Einparameterdarstellung - auch Histogramm genannt. Alle Ereignisse (Messwerte) werden nach der Stärke ihres Signals registriert und in einer Verteilungskurve dargestellt. Der Mittelwert der Kurvenverläufe erlaubt anschließend eine quantitative

Aussage über die Antikörperbindung und damit über die Expression thrombozytärer Membranglykoproteine. Das Prinzip ist in *Abbildung 6* dargestellt.

Zur Qualitätskontrolle des Gerätes erfolgt täglich eine Kalibrierung mit dem FACSComp Programm des Herstellers und den CaliBRITE Beads (Becton Dickinson, San Jose, USA).



**Abb. 5: Abgrenzung der Thrombozyten im „Dot Plot“**



**Abb. 6: Histogramm: CD62P-Fluoreszenz**

### 3.1.6 Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt mit dem Programm CellQuest, Version 3.0 des Herstellers (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

Nach dem oben beschriebenen Prinzip soll die Anzahl der Thrombozyten ermittelt werden die CD62P und PAC-1 gebunden haben. Ein Schwellenwert für die positive Signalintensität wird anhand der jeweiligen Isotypenkontrolle zur Filterung der unspezifischen Bindungen festgesetzt. Im Histogramm der Kontrolle wird dazu ein Marker auf 1% positive Zellen eingestellt, der dem Anteil falsch positiver Ereignisse entspricht (72). Anschließend erfolgt die Subtraktion der korrigierten Kurve von der des zugehörigen mAK. In der daraus erstellten Statistik werden die aktivierten (positiven) Zellen in Prozent angegeben.

## **3.2 Aggregometrie**

### **3.2.1 Funktionsprinzip Aggregometer**

Die Methode der Aggregometrie wurde erstmals 1962 von Born beschrieben (12) und wird auch heute noch nach diesem turbimetrischen Verfahren durchgeführt. Es beruht auf der Abhängigkeit der optischen Dichte von der Partikelzahl einer Suspension und nicht der Größe einzelner Zellen. Dazu wird plättchenreiches Plasma (PRP = Platelet Rich Plasma) in silikonisierte Glasküvetten gegeben und bei 37 °C unter Verwendung eines Rührstäbchens vermischt. Diese Küvette wird zwischen einer Lichtquelle und einer Photozelle platziert. Zu Beginn erscheint das PRP durch die vielen Thrombozyten trübe und zeigt eine geringe Lichtdurchlässigkeit. Durch die Zugabe von Plättchenagonisten beginnen die Thrombozyten zu aggregieren, was sich im Auftreten großer Aggregate äußert und die Lichtdurchlässigkeit erhöht. Die Veränderungen des Trübheitsgrades des PRP werden anhand einer Referenzküvette mit plättchenarmen Plasma (PPP = Platelet Poor Plasma) photometrisch ermittelt und auf einem Schreiber kontinuierlich in Kurvenform dargestellt. Die Änderung der Lichttransmission ist daher ein Maß für die Aggregabilität der Thrombozyten (12). Für die nachfolgend beschriebenen Messungen wird ein PAP-4 (Platelet Aggregation Profiler) der Firma Bio Data (Hatboro, USA) verwendet.

### **3.2.2 Studien**

Für die Versuche am Aggregometer galten dieselben Ein- und Ausschlusskriterien wie für die Durchflusszytometrie unter 2.1.3 dargestellt. Das Alter der Probanden lag im Bereich von 24 bis 44 Jahren und im Mittel bei  $28,3 \pm 6,4$  Jahren. Es wurden jeweils 7 weibliche und 3 männliche Probanden untersucht. Für die in dieser Studie verwendeten Thrombozytenagonisten ADP und Kollagen wurden jeweils zehn Messungen an verschiedenen Probanden durchgeführt.

### **3.2.3 Probengewinnung und Aufbereitung**

Den Probanden wurde Blut aus einer mäßig gestauten Oberarmvene durch Punktion mit einer 21 Gauche-Kanüle entnommen. Für die aggregometrische Messung erfolgte die Abnahme von 40 ml Blut in mit 3,8% Zitrat antikoagulierte Monovetten. Vor der

weiteren Verarbeitung wurden die Proben 60 Minuten ruhen gelassen. Durch diesen Schritt sollte eine mögliche Beeinflussung der Aggregation durch freigesetzte Hemmstoffe bei der Blutabnahme in Folge Gefäßwandverletzungen vermieden werden. Im Anschluss wurde das Blut zur Herstellung des PRP 10 Minuten bei 1800 U/min und 18 °C zentrifugiert. Der entstandene trübe Überstand – das PRP – wurde abpipettiert. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten bei 4000 U/min und 18 °C. Der klare Überstand wurde ebenfalls abpipettiert und stellte als PPP den Kontrollwert dar.

Um den physiologischen Effekt von Phloretin auf die funktionelle Aggregabilität der Thrombozyten und nicht nur auf die Expression einzelner Oberflächenproteine feststellen zu können, wurden 3 ml Aliquot des PRP für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Flavonoid inkubiert. Die verwendeten Endkonzentrationen von Phloretin betragen 10 µM und 50 µM. Um Unterschiede in den Proben durch verschiedene DMSO-Konzentrationen (Lösungsmittel) zu vermeiden, wurde die Probe mit 10 µM Phloretin durch entsprechende Zugabe von DMSO angeglichen. Als Kontrolle dienten eine Leerprobe und eine Lösungsmittelprobe mit 0,5% DMSO, die der Konzentration in den Proben mit Phloretin entsprach. Zur Vermeidung von Zeitverzögerungen wurden die Proben im Abstand von 10 Minuten nacheinander inkubiert.

### **3.2.4 Aggregometrische Messung**

Vor Beginn jeder Messung wurde am Gerät eine Nulllinie als Basis, sowie folgende Einstellungen vorgenommen: Messtemperatur 37 °C, Rührgeschwindigkeit 1000 U/min, Papiervorschub 25 mm/min.

Für die Untersuchung wurden zuerst 500 µl PPP in eine silikonisierte Testküvette (Mölab, Hilden, Deutschland) gegeben. Diese diente als Referenzwert, da die optische Dichte des PPP die maximal mögliche (100%) Aggregation definierte. Anschließend wurden jeweils 500 µl PRP einer Probe in 4 Testküvetten gegeben und für 3 Minuten bei 37 °C im Inkubator des Gerätes vorgewärmt. Nachdem alle vier Kanäle mit der Referenzprobe kalibriert wurden, konnten die aufgewärmten Proben in die Messkanäle eingesetzt werden. Nach Öffnung der Kanäle starteten die Schreiber selbständig. Die Durchmischung der Proben erfolgte kontinuierlich mit Hilfe eines Rührstäbchens. Nach

1 Minute wurden je 25 µl der Stimulantien ADP (Mascia Brunelli, Milano, Italien) in den Endkonzentrationen 2,5 µM und 1,25 µM sowie Kollagen (Mascia Brunelli, Milano, Italien) in den Endkonzentrationen 2 µg/ml und 1 µg/ml zugegeben. Die Aggregation wurde über 10 Minuten aufgezeichnet und für alle 4 Proben (Leer, DMSO, 10 µM und 50 µM Phloretin) gleichermaßen durchgeführt. Am Ende jedes Testdurchlaufes erfolgte eine Inspizierung der PRP Probe im Licht, um zu überprüfen ob Aggregate entstanden waren.

### 3.2.5 Auswertung der Aggregationskurven

Nach Beendigung der Aggregation - durch Schließen der Kanäle - werden automatisch die endgültige prozentuale Aggregation und der Slope für jeden Kanal mit der zugehörigen Kanalnummer ausgedruckt. Der Slope ist ein einheitsloser Wert, der die maximale Aggregationsgeschwindigkeit angibt. Nach Einstellen der 0% Basislinie beginnt der Slope-Leser automatisch mit der Überwachung. Zur weiteren Auswertung werden anhand der gedruckten Kurven der maximale Ausschlag ( $\Delta T_{max}$ ) und die Reversibilität als Maß der Aggregationshemmung bestimmt. Die Reversibilität wird wie folgt errechnet:

$$\frac{\Delta T_{max} - \text{endgültige prozentuale Aggregation}}{\Delta T_{max}}$$

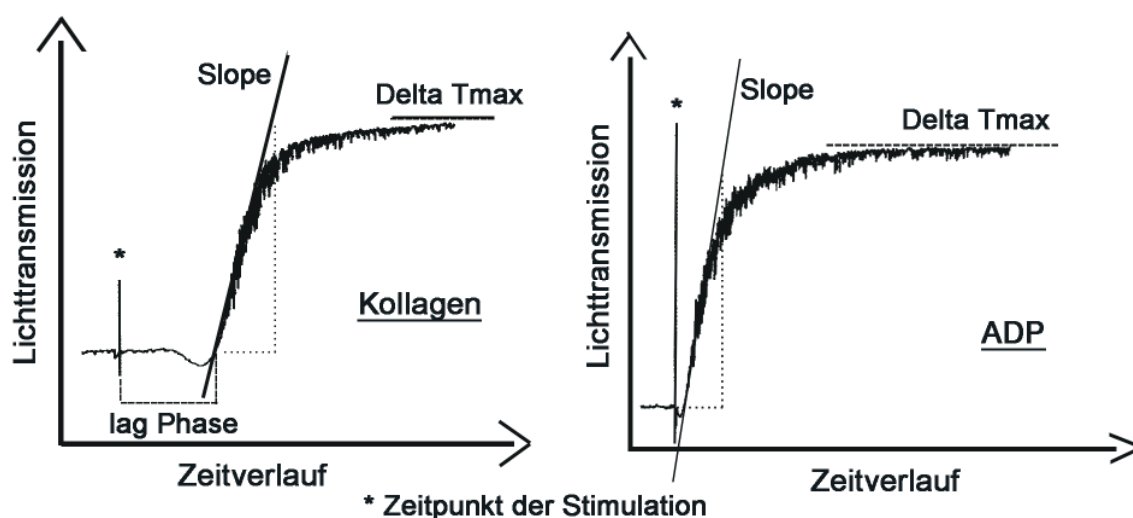


Abb. 7: Auswertung der Aggregometerkurven

Für den Thrombozytenagonisten Kollagen kann zusätzlich die „lag Phase“ - als Zeit zwischen der Zugabe des Stimulus bis zum Anstieg der Kurve - gemessen werden. In *Abbildung 7* sind die Aggregationskurven für ADP und Kollagen mit den jeweiligen Parametern der Auswertung dargestellt.

### **3.3 Statistik**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgt mittels der Computer Software Microsoft Excel 2003 und anschließend mit SigmaStat.

Die statistische Analyse beginnt mit dem Test auf Normal- und Gleichverteilung, die von dem Programm SigmaStat automatisch durchgeführt wird. Es erfolgt ein Vergleich zwischen den Gruppen mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (One Way Analysis of Variance) und anschließendem Student-Newman-Keuls Test bzw. der Holm-Sidak Methode. Die Werte werden als arithmetische Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler SEM („standard error of the mean“) angegeben soweit nicht anders ausgewiesen.

Die Ergebnisabbildungen werden mit der Software SigmaPlot erstellt. Die Signifikanz der Werte - definiert als  $p < 0,05$  - wurden entsprechend gekennzeichnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Durchflusszytometrie

#### 4.1.1 Glykoprotein IIb-IIIa

Die Bindung des mAK PAC-1 erfolgt an der Fibrinogen-Bindungsstelle des aktivierten GPIIb-IIIa Rezeptors und dient demzufolge der Evaluierung aktivierter Thrombozyten.

Der Anteil PAC-1-positiver Zellen in den unstimulierten Proben ohne Zugabe von Phloretin und DMSO lag bei  $1,4 \pm 1,7\%$ . Durch die Zugabe von 0,1% DMSO - als Lösungsmittelkontrolle - sowie Phloretin in steigender Konzentration konnte keine wesentliche Änderung der Fluoreszenz von PAC-1 in unstimulierten Proben ermittelt werden, wie in *Tabelle 7* dargestellt.

Die Stimulierung mit dem Agonisten ADP in der Konzentration  $50 \mu\text{M}$  *in vitro* ergab eine deutlich gesteigerte PAC-1 Fluoreszenz mit  $30,2 \pm 8,9\%$  positiven Zellen. Der Agonist TRAP-6 mit  $15 \mu\text{M}$  zeigte eine leicht schwächere basale Stimulation der Blutplättchen mit  $28,5 \pm 14,8\%$  positiven Zellen für PAC-1. Der Einfluss von DMSO als Lösungsmittel bewirkte einen leichten Anstieg des prozentualen Anteils aktivierter Thrombozyten in ADP-stimulierten Proben mit  $33,4 \pm 9,7\%$  im Vergleich zur basalen Stimulierung ( $30,2\%$ ). Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit TRAP-6 als Agonist beobachtet. DMSO führte zu einem geringfügigen Anstieg von  $28,5\%$  (basale Stimulierung) auf  $31,4 \pm 7,7\%$  positiven Zellen für PAC-1. Die Ergebnisse wurden in *Tabelle 7* zusammenfassend dargestellt.

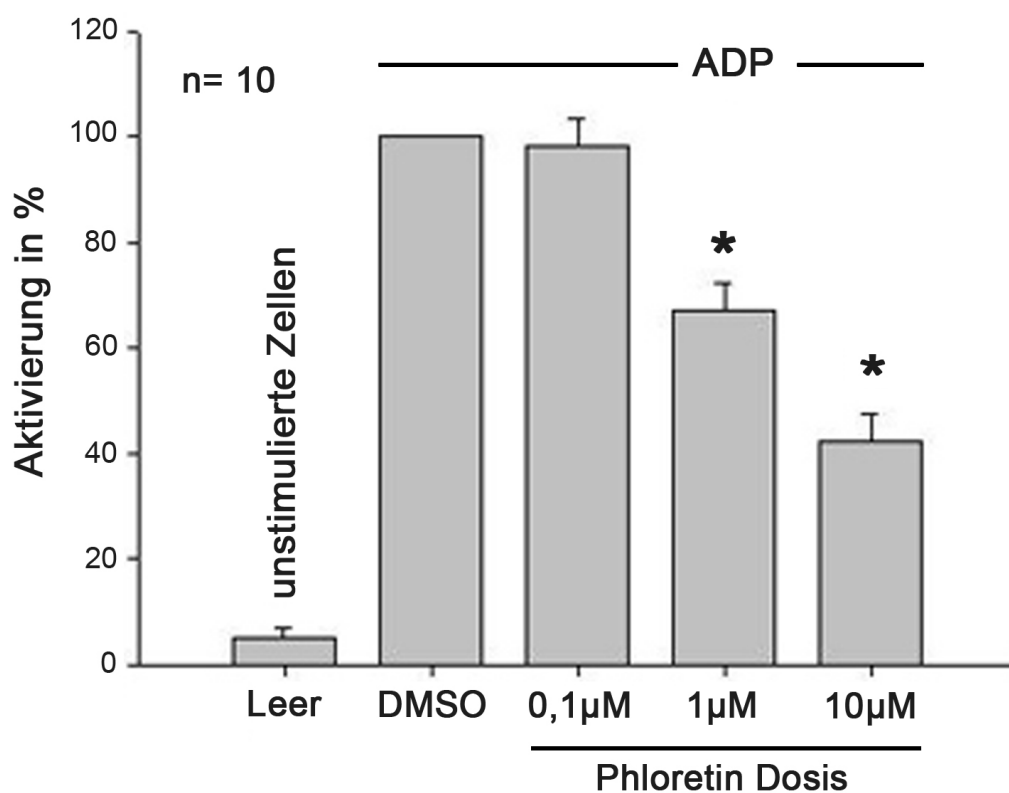
**Tabelle 7: Bindung des mAK PAC-1**

	Leerprobe	0,1% DMSO	100 nM Phloretin	1 $\mu\text{M}$ Phloretin	10 $\mu\text{M}$ Phloretin
<b>unstimuliert</b>	$1,4 \pm 1,7\%$	$1,4 \pm 1,5\%$	$1,4 \pm 1,2\%$	$1,4 \pm 1,1\%$	$1,3 \pm 1,2\%$
<b>ADP-stim.</b>	$30,2 \pm 8,9\%$	$33,4 \pm 9,7\%$	$31,0 \pm 9,2\%$	$22,1 \pm 8,1\%$	$13,6 \pm 6,5\%$
<b>TRAP-stim.</b>	$28,5 \pm 14,8\%$	$31,4 \pm 7,7\%$	$31,5 \pm 8,6\%$	$23,2 \pm 7,1\%$	$17,4 \pm 7,6\%$

Alle Werte sind als Mittelwerte der % positiven Zellen für PAC-1  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Die Inkubation mit dem Flavonoid Phloretin erfolgte für 30 Minuten *in vitro*. Mit steigender Konzentration war eine deutliche Abnahme der PAC-1 Fluoreszenz und damit der Anzahl aktivierter Thrombozyten zu erkennen. Es zeigten sich dabei Unterschiede zwischen den beiden Agonisten ADP und TRAP. Die niedrigste

Konzentration von 100 nM Phloretin bewirkte nur eine minimale Änderung der PAC-1 Bindung in ADP-stimulierten Proben. Ein signifikanter Abfall der Fluoreszenz ließ sich sowohl für 1  $\mu\text{M}$  als auch für 10  $\mu\text{M}$  Phloretin, mit ADP als Agonist, nachweisen. Im Vergleich mit der Lösungsmittelkontrolle führte die höchste verwendete Konzentration des Flavonoids zu einem Abfall des prozentualen Anteils aktivierter Thrombozyten um etwa 58% ( $p < 0,001$ ). Mit 1  $\mu\text{M}$  Phloretin wurde eine Reduktion der PAC-1-Expression von 33% ( $p < 0,001$ ) erreicht. Die Ergebnisse für ADP stimulierte Proben wurden in der *Abbildung 8* zusammengefasst.

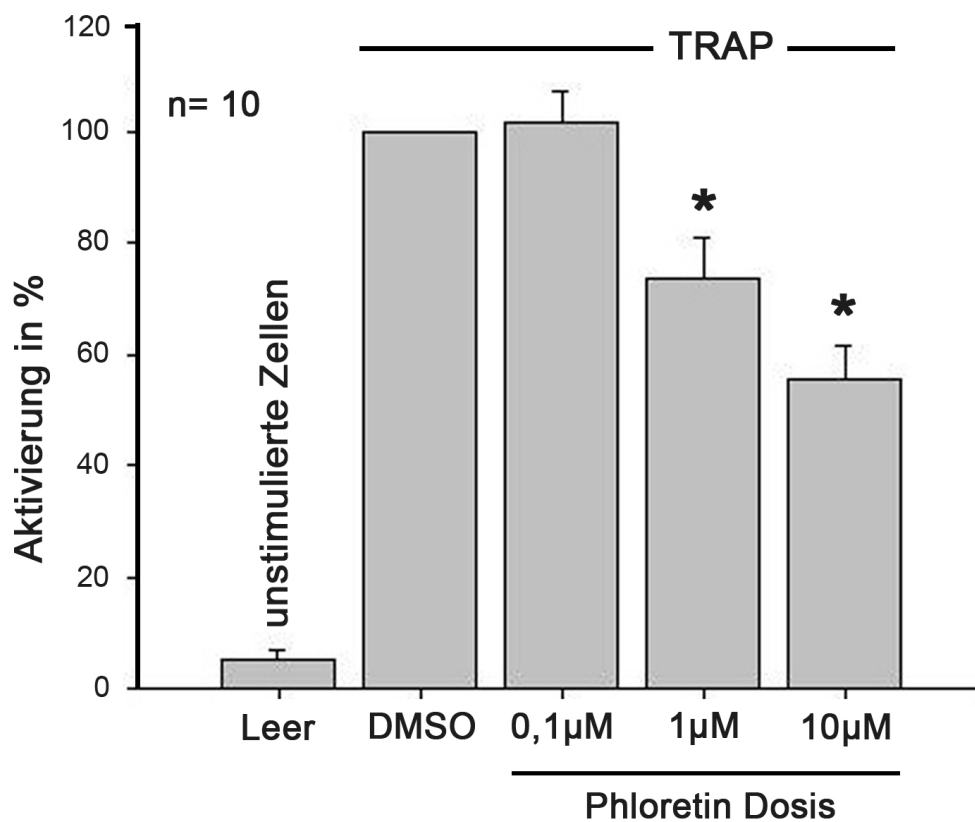


**Abb. 8: PAC-1 Fluoreszenz (ADP-stimuliert)**

\* = Signifikanz mit  $p < 0,05$



Ähnliche Ergebnisse konnten in den mit TRAP-stimulierten Proben ermittelt werden. Die niedrigste verwendete Konzentration von 100 nM Phloretin zeigte keine Änderung der Fluoreszenz im Vergleich zur Lösungsmittelprobe. Signifikante Unterschiede ließen sich für 1 µM und 10 µM Phloretin nachweisen. Die maximale Reduktion der PAC-1 Fluoreszenz lag bei etwa 44% ( $p < 0,001$ ) und damit deutlich niedriger als bei ADP-stimulierten Proben. Unter 1 µM Phloretin wurde ein Abfall der Fluoreszenz von 26% ( $p < 0,001$ ) gemessen. Die Ergebnisse der TRAP-stimulierten Proben wurden in der *Abbildung 9* zusammengefasst.



**Abb. 9: PAC-1 Fluoreszenz (TRAP-stimuliert)**

\* = Signifikanz mit  $p < 0,05$

#### 4.1.2 P-Selektin Freisetzung

Die Freisetzung von P-Selektin aus den  $\alpha$ -Granula wurde anhand CD62P-positiver Thrombozyten bestimmt. Auch dieser Rezeptor diente als Aktivierungsmarker.

Die Fluoreszenz der unstimulierten leeren Proben lag bei  $2,1 \pm 1,3\%$  CD62P-positiven Zellen. Eine Stimulierung mit den beiden Agonisten ADP und TRAP ergab eine deutliche Aktivierung der Blutplättchen. Die basale Stimulation durch ADP ergab  $50,2 \pm 6,6\%$  und für TRAP  $51,3 \pm 8,5\%$  CD62P-positive Zellen. Ein Einfluss des Lösungsmittels konnte auch in diesen Versuchen durch einen moderaten Anstieg der aktivierten Thrombozyten auf  $56,7 \pm 8,8\%$  mit ADP und auf  $58,7 \pm 8,0\%$  mit TRAP bestätigt werden. Zusammenfassend wurden die Messergebnisse in *Tabelle 8* dargestellt.

**Tabelle 8: Bindung des mAK CD62P**

	Leerprobe	0,1% DMSO	100 nM Phloretin	1 $\mu$ M Phloretin	10 $\mu$ M Phloretin
<b>unstimuliert</b>	$2,1 \pm 1,3\%$	$2,0 \pm 1,6\%$	$1,7 \pm 0,4\%$	$2,3 \pm 0,8\%$	$1,9 \pm 0,8\%$
<b>ADP-stim.</b>	$50,2 \pm 6,6\%$	$56,7 \pm 8,8\%$	$54,7 \pm 8,8\%$	$56,2 \pm 7,6\%$	$58,4 \pm 6,3\%$
<b>TRAP-stim.</b>	$51,3 \pm 8,5\%$	$58,7 \pm 8,0\%$	$53,9 \pm 10,2\%$	$59,4 \pm 6,9\%$	$58,7 \pm 6,8\%$

Alle Werte sind als Mittelwerte der % positiven Zellen für CD62P  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Die Inkubation der Proben erfolgte auch bei diesen Versuchen für 30 Minuten mit drei verschiedenen Konzentrationen von Phloretin. Nachweisbare Unterschiede in der Plättchenaktivierung anhand der CD62P-Expression ließen sich zu keinem Zeitpunkt der Messungen aufzeigen. In den mit ADP-stimulierten Proben fand man sogar einen leichten nicht signifikanten Anstieg bei 10  $\mu$ M Phloretin. Die Proben nach TRAP-Stimulierung zeigten keinerlei Unterschied zwischen der maximal verwendeten Phloretinkonzentration und dem Lösungsmittel. Die *Abbildungen 10 und 11* zeigen eine graphische Darstellung der Auswertungen.

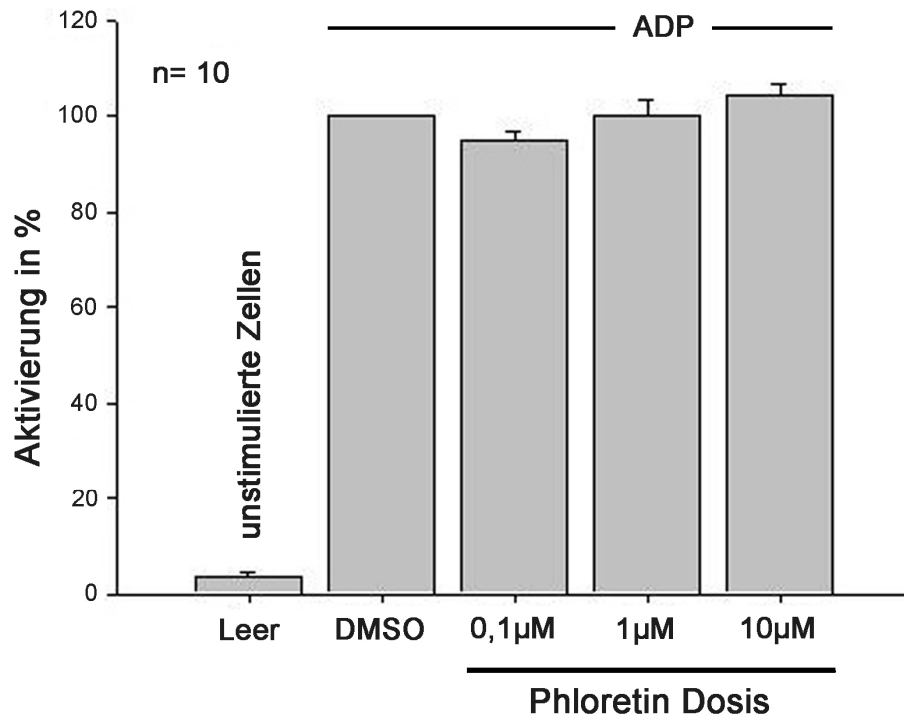


Abb. 10: CD62P Fluoreszenz (ADP-stimuliert)

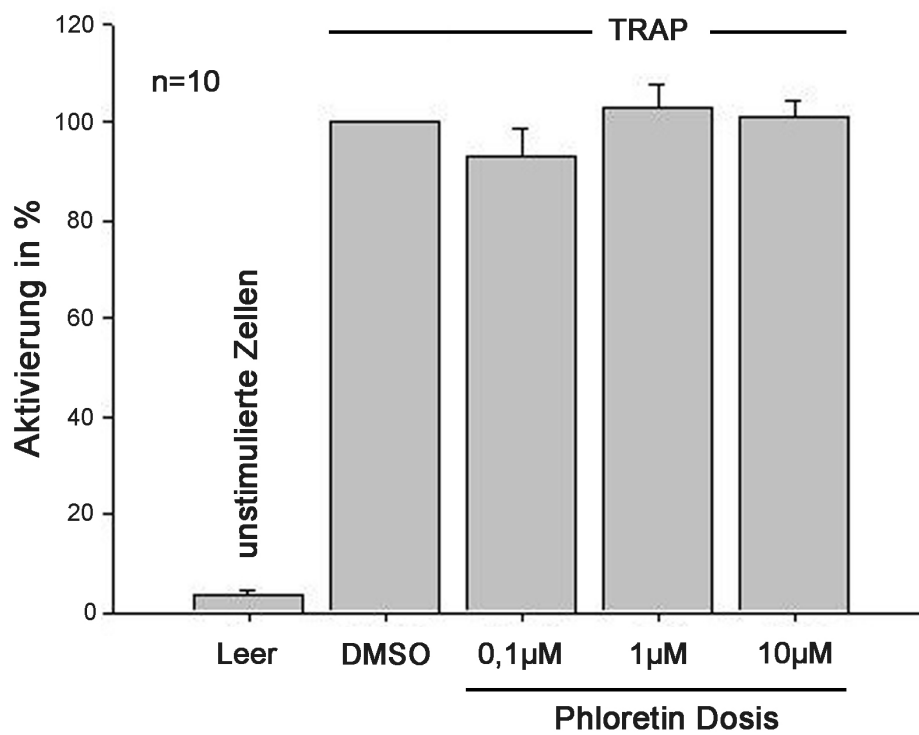
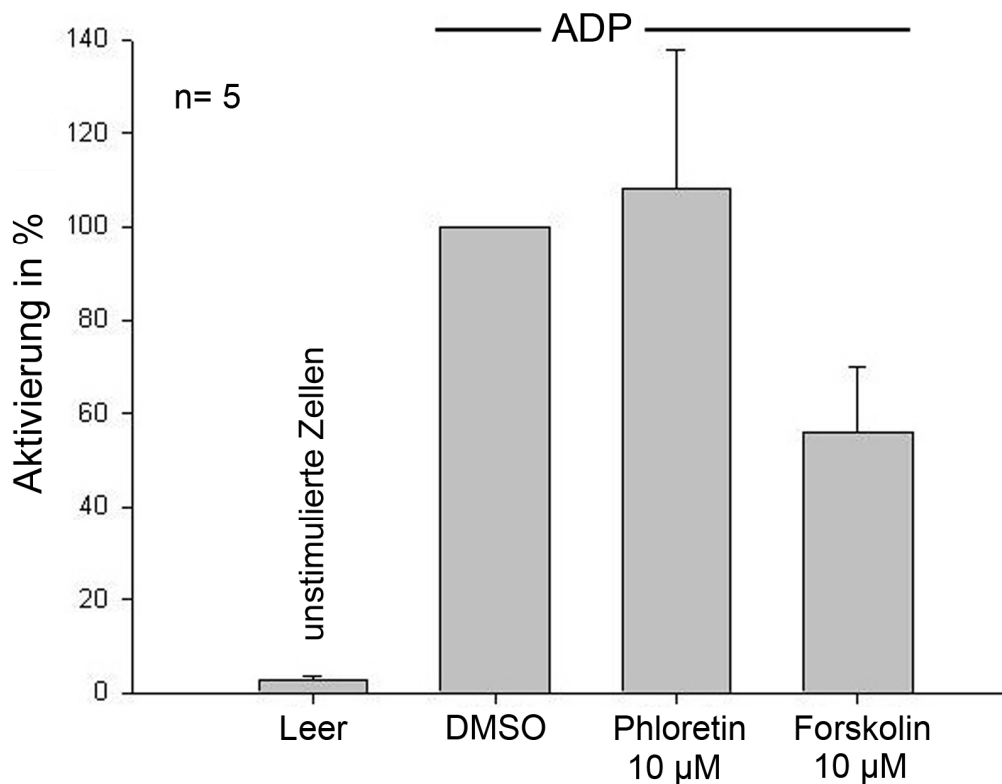


Abb. 11: CD62P Fluoreszenz (TRAP-stimuliert)

Da Phloretin keinen Einfluss auf die P-Selektin-Expression in unseren Versuchen zeigte, prüften wir die Wirksamkeit des mAK CD62P. Dazu wurden fünf Versuche parallel mit 10  $\mu$ M Phloretin und 10  $\mu$ M Forskolin - einem Adenylatcyclase Aktivator - als Positivkontrolle durchgeführt. Wir beschränkten uns bei der Stimulierung auf ADP. In der Literatur wurde eine Reduktion der CD62P-Fluoreszenz für Forskolin beschrieben (47). Auch in unseren Versuchen konnte eine verminderte Bindung des mAK CD62P durch den Einfluss von Forskolin nachgewiesen werden. Die zuvor beschriebenen Ergebnisse bezüglich des Einflusses von Phloretin auf CD62P wurden auch in diesen Versuchen bestätigt. Zusammenfassend wurden die Ergebnisse in *Abbildung 12* dargestellt.



**Abb. 12: CD62P Fluoreszenz mit Phloretin und Forskolin**

## 4.2 Aggregometrie

### 4.2.1 Maximale Aggregation

Die aggregometrische Messung wurde als funktioneller Test durchgeführt ohne einen speziellen Oberflächenrezeptor der Thrombozyten zu fokussieren. Ein wertvoller Marker dieser Methode war die maximale Aggregation (Delta max), die prozentual den größten Ausschlag jeder Kurve angab. Es wurde auch bei diesen Messungen immer eine Leerprobe und eine Lösungsmittelprobe mitgeführt. Für die aggregometrischen Messungen wurde Phloretin in den Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  verwendet. Flavonoidkonzentrationen unter 10  $\mu\text{M}$  führten wir auf Grund geringerer Effekte in der Durchflusszytometrie nicht mit. In Studien, die sich mit dem Einfluss von Phloretin auf die Thrombozytenaggregation beschäftigten, wurde ein signifikanter Effekt für 50  $\mu\text{M}$  beschrieben (45,59). Aus diesem Grund wählten wir zusätzlich die höhere Konzentration in der Aggregometrie. Dementsprechend wurde die Lösungsmittelkontrolle mit 0,5% DMSO mitgeführt, welche in 50  $\mu\text{M}$  Phloretin enthalten war. Die Inkubationszeit blieb konstant bei 30 Minuten. Als Agonisten wählten wir bei allen Versuchen Kollagen und ADP in je zwei verschiedenen Konzentrationen. Eine Originalregistrierung zeigt *Abbildung 13*.

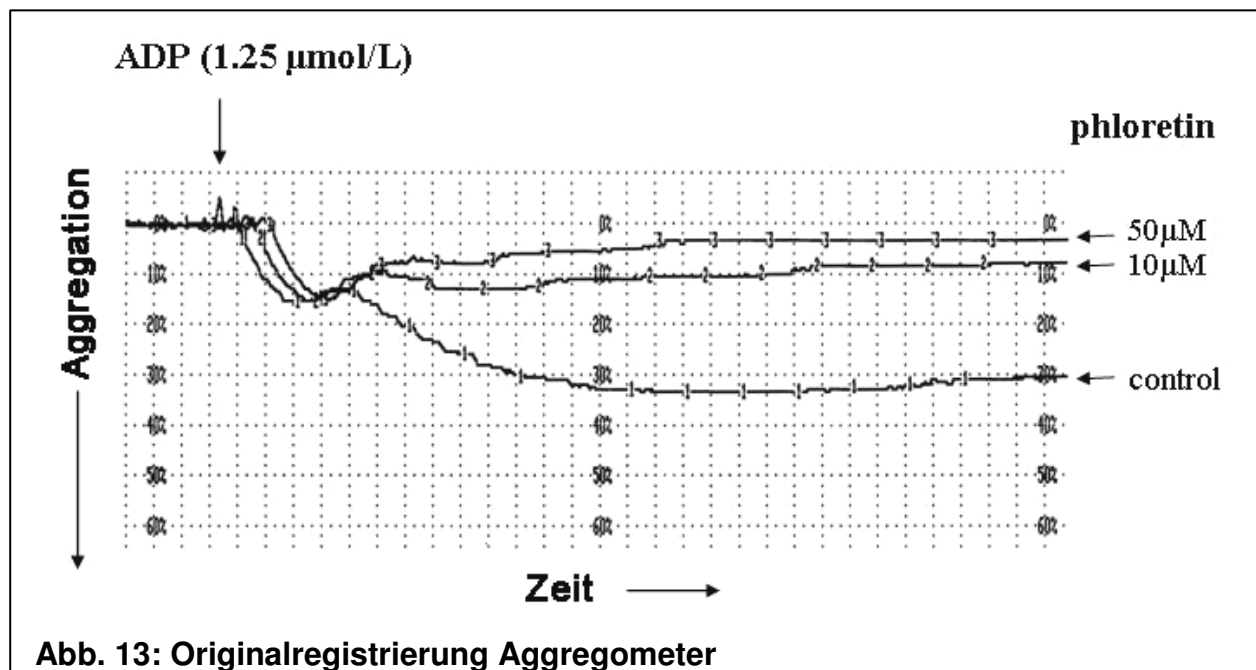


Abb. 13: Originalregistrierung Aggregometer

In der Auswertung zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Leerwerten ADP-stimulierter Proben. Mit 1,25 µM lag die maximale Aggregation bei  $65,1 \pm 20,7\%$  und mit 2,5 µM ADP bei  $76,9 \pm 10,1\%$ . Die beiden verwendeten Kollagen Konzentrationen wiesen dagegen nur geringe Unterschiede auf. Der Einfluss von DMSO als Lösungsmittel zeigte sich besonders bei der Anwendung von 1,25 µM ADP. Während die maximale Aggregation der Leerprobe bei 65,1% lag, sank sie unter 0,5% DMSO auf  $47,4 \pm 23,2\%$  ab. Eine Übersicht der Messwerte wurde in *Tabelle 9* dargestellt.

**Tabelle 9: Messergebnisse der maximalen Aggregation**

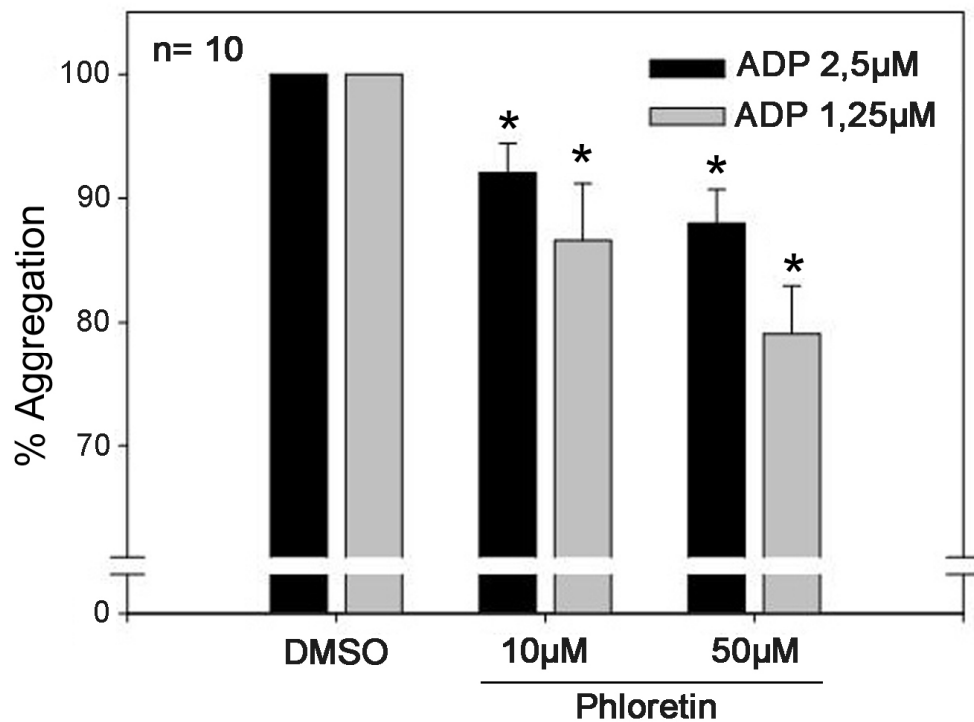
	Leerprobe	0,5% DMSO	10 µM Phloretin	50 µM Phloretin
1,25 µM ADP	$65,1 \pm 20,7\%$	$47,4 \pm 23,2\%$	$40,5 \pm 23,3\%$	$35,8 \pm 21,0\%$
2,5 µM ADP	$76,9 \pm 10,1\%$	$77,2 \pm 9,0\%$	$71,6 \pm 9,8\%$	$68,5 \pm 11,0\%$
1 µg/ml Kollagen	$78,1 \pm 7,2\%$	$75,4 \pm 5,6\%$	$74,3 \pm 7,4\%$	$70,8 \pm 8,6\%$
2 µg/ml Kollagen	$79,7 \pm 6,5\%$	$80,7 \pm 6,7\%$	$79,4 \pm 4,9\%$	$79,0 \pm 8,5\%$

Alle Werte sind als Mittelwerte der maximalen Aggregation in % ± Standardabweichung angegeben

Unter dem Einfluss von Kollagen bewirkte Phloretin einen tendenziellen Abfall der maximalen Aggregation. Nach statistischer Auswertung der Daten war eine Signifikanz bei einer Senkung von 6% für 1 µg/ml Kollagen und 2,5% für 2 µg/ml Kollagen nicht vorhanden, weshalb auf eine graphische Darstellung verzichtet wurde.

Ein signifikanter Abfall von Delta max durch Phloretin wurde dagegen unter ADP-Stimulation beobachtet. Bei den mit 1,25 µM ADP versetzten Proben konnte eine signifikante Senkung von etwa 24% ( $p < 0,001$ ) bei 50 µM Phloretin und etwa 15% ( $p = 0,007$ ) unter Einfluss von 10 µM Phloretin im Vergleich zu DMSO ermittelt werden. Bei 2,5 µM ADP war ebenfalls ein Abfall der maximalen Aggregation durch Phloretin zu beobachten. Die Werte waren geringer aber ebenfalls signifikant. Eine konzentrationsabhängige Reduktion von etwa 7% ( $p = 0,016$ ) und 11% ( $p < 0,001$ ) wurden erreicht.

*Abbildung 14* zeigt eine zusammenfassende Darstellung der Werte unter ADP Stimulation. Auf eine graphische Darstellung der maximalen Aggregation mit dem Agonisten Kollagen wurde an dieser Stelle wegen fehlender Signifikanz verzichtet.



**Abb. 14: Maximale Aggregation (ADP-stimuliert)**

\* = Signifikanz mit  $p < 0,05$

#### 4.2.2 Reversibilität

Die Reversibilität wurde aus der maximalen Aggregation und der am Ende der Registrierung angegebenen endgültigen Aggregation in Prozent errechnet, wie in Kapitel 3.2.5 erklärt. Eine hohe Reversibilität würde einer effektiven Hemmung der Thrombozytenaggregation im verwendeten plättchenreichen Plasma entsprechen.

Als Vergleich wurde wie bei allen Versuchen die Lösungsmittelprobe herangezogen. DMSO in einer Konzentration von 0,5% nahm zum Teil erheblichen Einfluss auf die Reversibilität in Bezug zur Leerprobe. Am deutlichsten zeigte sich dieser Effekt in den mit 1,25 µM ADP-stimulierten Proben. Die Reversibilität lag für DMSO bei  $32,0 \pm 21,9\%$  und in der Leerprobe mit  $12,6 \pm 16,4\%$  deutlich niedriger. Der Einfluss von DMSO auf die anderen Proben war gering. Eine Übersicht der Messwerte gibt *Tabelle 10* wieder.

**Tabelle 10: Messergebnisse der Reversibilität**

	Leerprobe	0,5% DMSO	10 µM Phloretin	50 µM Phloretin
1,25 µM ADP	12,6 ± 16,4	32,0 ± 21,9	32,6 ± 23,1	42,3 ± 27,7
2,5 µM ADP	4,3 ± 2,5	5,3 ± 3,7	7,8 ± 5,8	12,1 ± 8,5
1 µg/ml Kollagen	5,1 ± 1,1	6,1 ± 2,5	9,1 ± 4,1	12,1 ± 4,9
2 µg/ml Kollagen	4,8 ± 2,4	3,8 ± 1,8	6,2 ± 3,0	4,7 ± 1,7

Alle Werte sind als Mittelwerte der Reversibilität in % ± Standardabweichung angegeben

Die Proben wurden für 30 Minuten jeweils mit 10 µM und 50 µM Phloretin inkubiert, um eine Vergleichbarkeit zu den Versuchen mit dem Durchflusszytometer herstellen zu können. Dabei wurden ADP und Kollagen in je zwei Konzentrationen als Stimulantien verwendet.

Der Einfluss von Phloretin auf die ADP-stimulierten Proben resultierte in einer gesteigerten Reversibilität. Nach statistischer Auswertung zeigte die Konzentration von 10 µM Phloretin einen steigenden, aber nicht signifikanten Trend. Im Vergleich zur DMSO Kontrolle etwa 4% ( $p=0,812$ ) bei 1,25 µM ADP und etwa 84% ( $p=0,345$ ) bei 2,5 µM ADP. Der Zusatz von 50 µM Phloretin bewirkte bei beiden ADP-Konzentrationen eine signifikante Steigerung der Reversibilität. Der Zuwachs betrug etwa 50% ( $p=0,025$ ) bei 1,25 µM ADP und etwa 228% ( $p=0,015$ ) bei 2,5 µM ADP. Betrachtete man die Einzelversuche ergaben sich erhebliche Schwankungen bei der kleineren verwendeten ADP-Konzentration. Die Werte wurden deshalb in *Tabelle 11* extra aufgeführt.

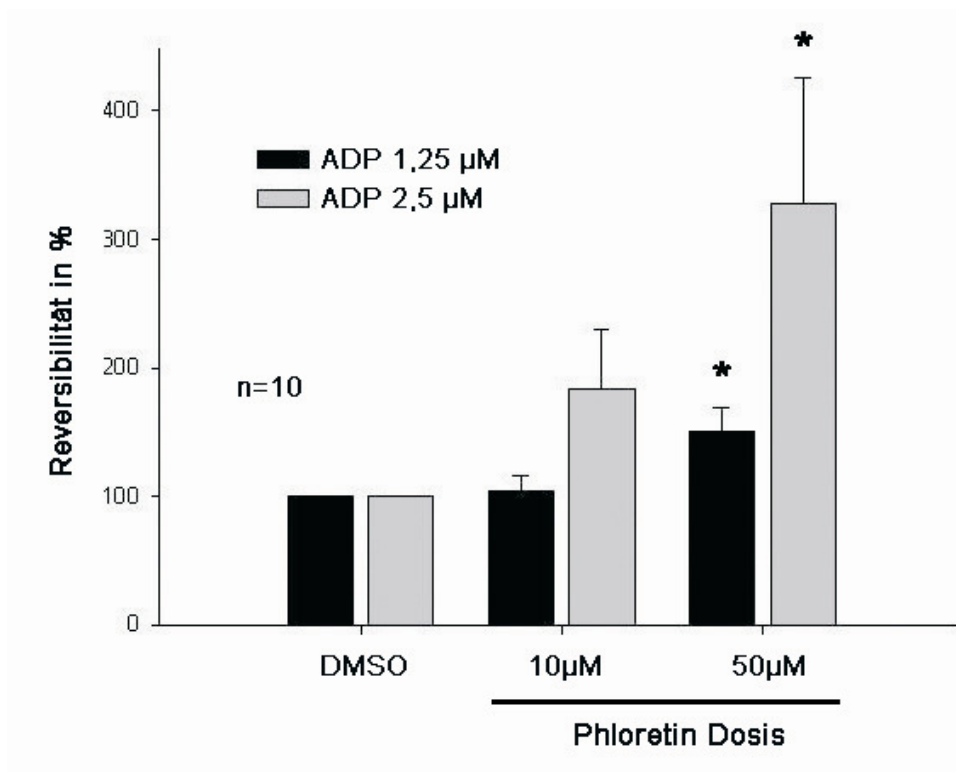
**Tabelle 11: Einzelwerte der Reversibilität für 1,25 µM ADP**

Probanden	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,5% DMSO	6,0	4,9	42,5	38,5	56,7	56,1	14,8	22,6	66,7	3,6
10 µM Phloretin	5,0	2,5	50,0	28,6	76,0	47,5	17,9	30,3	50,0	11,0
50 µM Phloretin	9,3	6,9	42,3	60,0	78,3	82,9	34,8	16,7	62,5	28,9

Alle Werte sind als % der Reversibilität angegeben



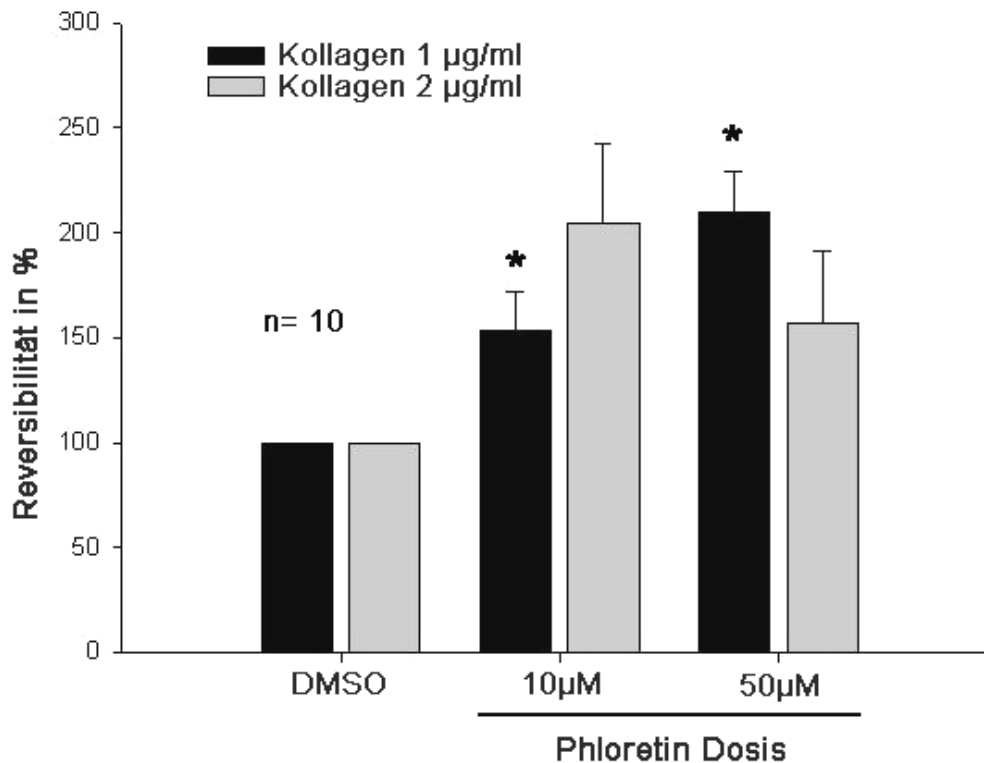
Anhand der Werte wurde ersichtlich, dass eine hohe Phloretinkonzentration einen signifikanten Effekt auf die Reversibilität ausübte. Eine niedrigere Konzentration jedoch in 50% der Versuche einen gegenteiligen Trend aufwies. Zur besseren Übersicht wurden die Werte mit ADP als Agonist in *Abbildung 15* noch mal graphisch zusammengefasst.



**Abb. 15: Reversibilität unter ADP-Stimulation**

\* = Signifikanz mit  $p < 0,05$

Auch bei der Stimulation mit Kollagen resultierte die Inkubation mit Phloretin in einer Steigerung der Reversibilität. Nach statistischer Auswertung zeigte sich eine Signifikanz der Werte allerdings nur in der Konzentration von 1 µg/ml Kollagen. Im Vergleich zur Referenzprobe mit 0,5% DMSO stieg sie um 53% ( $p=0,023$ ) bei der Zugabe von 10 µM Phloretin und 110% ( $p<0,001$ ) bei 50 µM Phloretin. Unter Stimulation mit 2 µg/ml Kollagen erkannte man auch eine gesteigerte Reversibilität durch Phloretin, die allerdings nicht signifikant war. Dabei fiel auf, dass Phloretin in der niedrigeren Konzentration einen größeren Effekt zeigte. Eine graphische Übersicht wurde in *Abbildung 16* dargestellt.



**Abb. 16: Reversibilität unter Kollagen-Stimulation**

\* = Signifikanz mit  $p < 0,05$

#### 4.2.3 Slope-Werte

Slope ist ein einheitsloser Wert, der die maximale Aggregationsgeschwindigkeit angibt. Er wurde vom Aggregometer automatisch ermittelt sobald die Messung begann. Nach Beendigung der Messung erschien der Wert separat für jeden Kanal auf dem Ausdruck. Eine Hemmung der Thrombozytenaggregation als Ausdruck verminderter Aktivität müsste sich in einem Abfall des Slope-Wertes darstellen.

Als Referenzwert wurde wiederum die Lösungsmittelprobe mit 0,5% DMSO verwendet. Bei der Auswertung erkannte man bereits einen geringfügigen Abfall der Slope-Werte im Vergleich zur Leerprobe ohne Flavonoid Zugabe. Eine Zusammenfassung aller Messwerte wurde in *Tabelle 12* dargestellt.

Es lies sich in allen Proben ein Abfall des Slope-Wertes nachweisen.

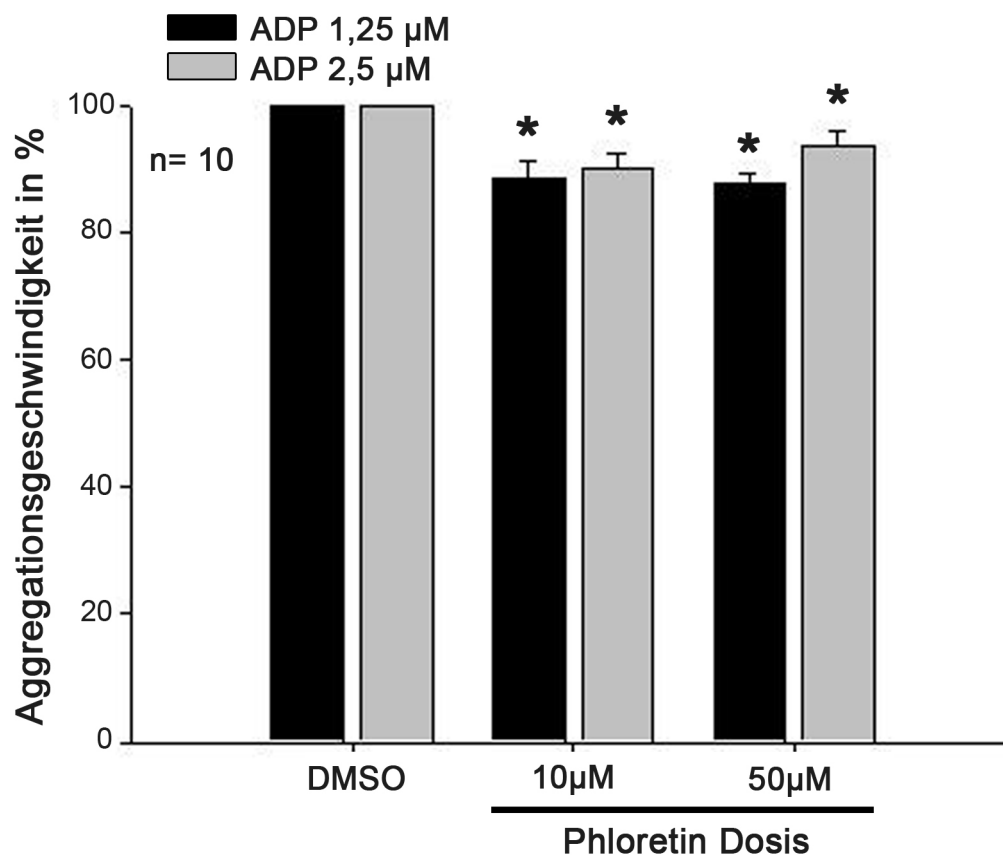
**Tabelle 12: Messergebnisse der Slope-Werte**

	Leerprobe	0,5% DMSO	10 µM Phloretin	50 µM Phloretin
1,25 µM ADP	32,8 ± 6,7	30,5 ± 6,2	27,0 ± 6,1	26,7 ± 5,6
2,5 µM ADP	40,8 ± 7,1	39,9 ± 5,9	35,9 ± 5,0	37,5 ± 6,6
1 µg/ml Kollagen	42,5 ± 4,8	36,3 ± 7,2	33,4 ± 5,2	30,4 ± 5,5
2 µg/ml Kollagen	45,0 ± 4,4	43,0 ± 3,8	40,8 ± 3,4	40,1 ± 3,8

Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt

Kollagen-stimulierte Versuche unterlagen bei Betrachtung der Werte einem größeren Einfluss von dem Lösungsmittel DMSO. Die Ausgangswerte ohne Phloretin Zusatz waren dennoch höher als unter ADP-Stimulation. Nach statistischer Auswertung ergab sich für die mit 2 µg/ml Kollagen-stimulierten Proben eine Senkung von etwa 5% durch 10 µM und etwa 6% durch 50 µM Phloretin im Vergleich zur DMSO Probe. Eine Signifikanz ließ sich nicht darstellen. Die niedrigere Konzentration von 1 µg/ml Kollagen zeigte mit einer Senkung von 6% ( $p=0,207$ ) unter 10 µM Phloretin ebenfalls keinen signifikanten Effekt. Eine Signifikanz wurde erst durch die Zugabe von 50 µM Phloretin mit einem Abfall des Slope-Wertes von 15% ( $p=0,011$ ) erreicht.

Bei den ADP-stimulierten Proben ließ sich dagegen ein Abfall des Slope-Wertes unter Phloretin beobachten. Bei 2,5 µM ergab sich eine signifikante Senkung für beide verwendeten Phloretin-Konzentrationen. Mit einer Abnahme des Slope-Wertes von etwa 10% ( $p=0,003$ ) unter 10 µM Phloretin war der Effekt stärker ausgeprägt als der von 50 µM Phloretin mit 6% ( $p=0,031$ ). Bei 1,25 µM ADP beobachtete man wiederum eine konzentrationsabhängige Senkung wie bei Kollagen. 10 µM Phloretin bewirkte einen signifikanten Abfall von etwa 11% ( $p=<0,001$ ) und 50 µM Phloretin von etwa 12% ( $p=<0,001$ ). Zwischen den beiden Flavonoid-Konzentrationen ließ sich dabei kein bedeutender Unterschied feststellen. Eine graphische Zusammenfassung der Werte mit dem Agonisten ADP wurde in *Abbildung 17* dargestellt. Auf die graphische Darstellung der Werte mit Kollagen-Stimulierung wurde wegen fehlender Signifikanz an dieser Stelle verzichtet.



**Abb.17: Slope-Werte (ADP-stimuliert)**

\* = Signifikanz mit  $p < 0,05$

## 5 Diskussion

Ziel unserer Studie war es herauszufinden, ob Phloretin eine antithrombozytäre Wirkung besitzt. Als sekundärer Pflanzenstoff gehört es zur Gruppe der Dihydrochalcone mit hauptsächlichem Vorkommen in Äpfeln und dort insbesondere in der Schale. Ein hemmender Einfluss von Phloretin auf die Thrombozytenaggregation konnte bereits beobachtet werden. Weiterführend untersuchten wir deshalb die Wirkung des Flavonoids auf zwei als Aktivierungsmarker bekannte thrombozytäre Oberflächenrezeptoren.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigten eine signifikante dosisabhängige Hemmung des Glykoprotein IIb-IIIa durch Phloretin in Abhängigkeit vom verwendeten Agonisten. Nachweisbare Unterschiede in der Expression von P-Selektin ließen sich dagegen zu keinem Zeitpunkt der Untersuchungen aufzeigen.

Die anschließenden aggregometrischen Messungen sollten klären ob Phloretin in der Lage ist die Aggregation der Blutplättchen zu beeinflussen. Mit diesem Test sollte die funktionelle Bedeutung der erhobenen Daten geprüft werden. Die maximale Aggregation wurde konzentrationsabhängig durch Phloretin in allen Versuchen gehemmt. Weiterhin wurden die Reversibilität, die mit Hemmung der Aggregation anstieg und der Slope-Wert, welcher die maximale Aggregationsgeschwindigkeit angab, zur Auswertung herangezogen. Der Einfluss von Phloretin führte zu einer gesteigerten Reversibilität in allen Versuchen, wobei die Ergebnisse wiederum abhängig vom gewählten Agonisten waren. Weiterhin bewirkte das Flavonoid eine Hemmung der Aggregationsgeschwindigkeit besonders bei der Stimulierung mit ADP. Die Ergebnisse der Proben mit Kollagen wiesen denselben Trend auf, waren aber nicht signifikant.

### 5.1 Beurteilung der Messergebnisse

#### 5.1.1 Veränderungen der thrombozytären Oberflächenrezeptoren

Als Methode haben wir die Durchflusszytometrie gewählt, um eine genaue Aussage über die Änderung der Expression von thrombozytären Oberflächenrezeptoren treffen zu können. Wie bereits dargestellt ändert sich durch eine Aktivierung der Blutplättchen die Oberflächendichte der Glykoproteine. In der vorliegenden Studie untersuchen wir die Expression von Glykoprotein IIb-IIIa, welches durch die Bindung von Fibrinogen und vWF eine zentrale Rolle in der Aggregation einnimmt. Durch Aktivierung kommt es zu

einer Konformationsänderung des Rezeptors mit Freilegung einer Ligandenbindungs-tasche. Dieser „hochaffine“ aktivierte Rezeptorkomplex kann durch die Bindung des mAK PAC-1 charakterisiert werden. Allerdings erfolgt die Bindung dieses mAK nur an Rezeptoren, die noch kein Fibrinogen gebunden haben, da eine kompetitive Hemmung vorliegt (29). Die Ligandenbindung führt zu einer weiteren Konformationsänderung mit Freilegung einer ligandeninduzierten Bindungsstelle (LIBS) (17). Durch andere spezifische AK kann ausschließlich der mit Fibrinogen besetzte Rezeptor detektiert werden. Die aktivierungsspezifischen anti-GPIIb-IIIa-Antikörper können sehr sensitiv den Aktivierungszustand der Blutplättchen erkennen, bevor eine Freisetzungsreaktion stattgefunden hat (29).

Die Inkubation mit dem Dihydrochalcon Phloretin induziert eine signifikante Senkung der thrombozytären Aktivität, gemessen an der Reduktion der GPIIb-IIIa Expression. Der dargestellte Effekt ist stark konzentrationsabhängig. Mit der maximal verwendeten Konzentration von Phloretin kann die größte Hemmung der PAC-1-positiven Zellen ermittelt werden, während die niedrigste Konzentration keinen Effekt zeigt. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, die den Einfluss von Flavonoiden auf die GPIIb-IIIa Expression untersuchen. Rein et al. fanden eine Reduktion der PAC-1 Bindung durch Procyanidine im Kakao *in vitro*, die allerdings nicht signifikant war. Nach dem Konsum von Kakao *ex vivo* zeigen sie sogar eine signifikante Expressions-hemmung von GPIIb-IIIa allerdings nur mit Epinephrin als Agonist. Die Aufnahme von Wasser oder Wein bleibt bei diesen Versuchen ohne Effekt (65). Ähnliche Ergebnisse liefern die Gruppe um Pearson. Auch bei ihren Versuchen wird eine Senkung der PAC-1 Bindung durch den Einfluss von Kakao *ex vivo* nur in Epinephrin-stimulierten Proben erreicht. Verwenden sie ADP als Agonist bewirkt lediglich die Kombination mit Aspirin eine reduzierte GPIIb-IIIa Expression (61).

Über welchen Mechanismus die antithrombozytäre Wirkung der Flavonoide vermittelt wird bleibt nachwievor unklar. Anhand der aktuellen Erkenntnisse kann darüber lediglich spekuliert werden. Vielfältig untersucht und bewiesen ist das antioxidative Potential von Flavonoiden (50,54,62,77,83,85), welches viele Autoren als verantwortlichen Mechanismus der reduzierten Plättchenaktivität ansehen. Eine Studie mit rotem Traubensaft und daraus extrahierten Flavonoiden kann *in vitro* und *ex vivo* eine verminderte Thrombozytenaggregation darstellen. In weiteren Experimenten zeigen sie zudem eine verringerte Entstehung von Superoxid-Anionen sowie eine erhöhte thrombozytäre NO-Freisetzung. Da die reaktiven Sauerstoffspezies über einen

Proteinkinase C-vermittelten Mechanismus zur Plättchenaktivierung führen, könnte dies eine mögliche Wirkungsweise der Flavonoide darstellen. Diese These untermauernd wird nach Aufnahme von rotem Traubensaft eine erhöhte antioxidative Kapazität im Plasma der Probanden festgestellt. Besonders der nachgewiesene Anstieg von  $\alpha$ -Tocopherol scheint hierbei von Bedeutung (28). Eine kürzlich erschienene Studie befasst sich mit diesem Thema und untersucht die Möglichkeit der direkten GPIIb-IIIa Aktivierung durch reaktive Sauerstoffspezies. Obwohl durch alle verwendeten Oxidationssysteme in den Thrombozyten ein erhöhtes Oxidationspotential geschaffen wird kann keine verstärkte GPIIb-IIIa Expression nachgewiesen werden. Nur die intrazelluläre Erhöhung von freiem Eisen, welches die Entstehung von hochreaktiven Radikalen im Thrombozyten katalysiert, zeigt eine deutliche Zunahme der PAC-1 Bindung (75). Flavonoide mit intrazellulärer Wirkung und antioxidativem Potential könnten somit die GPIIb-IIIa Aktivität beeinflussen. Phloretin wird auf Grund seiner lipophilen Eigenschaft als membrangängig angesehen (58).

Ein starker Agonist der Plättchenaktivierung ist neben Thrombin auch Thromboxan- $A_2$ , dessen Bildung aus der Arachnoidonsäure unter anderem durch die Cyclooxygenase vermittelt wird. In früheren Studien wird bereits ein hemmender Einfluss auf die Cyclooxygenase durch Phloretin nachgewiesen (45,59). Möglicherweise kann die Hemmung der Thromboxan- $A_2$ -vermittelten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Erhöhung durch Phloretin zu der antithrombozytären Wirkung beitragen. Mit diesen Ergebnissen im Einklang steht eine Studie mit dem Flavonoid Hesperetin. Durch die verringerte Bildung von Abbauprodukten wird eine Hemmung der Cyclooxygenase nachgewiesen, wobei kein Einfluss auf die Thromboxan- $A_2$ -Synthetase besteht. Weiterhin werden die Kollagen-induzierte Aggregation und Phospholipase-C- $\gamma_2$  phosphorylation gehemmt (40). Eine neuere Studie beobachtet für die Flavonoide Quercetin, Rutin und Apigenin eine Interaktion mit dem Thromboxan- $A_2$ -Rezeptor in Thrombozyten. Normalerweise wird über diesen membranständigen G-Protein gekoppelten Rezeptor die Signalkaskade induziert. Die Ergebnisse der Studie zeigen eine verminderte intrazelluläre  $Ca^{2+}$  Erhöhung sowie eine Hemmung der Proteinphosphorylationen durch den Einfluss der Flavonoide (32). Neben der antioxidativen Wirkung, der Cyclooxygenasehemmung sowie weiterer inhibitorischer Effekte der Signaltransduktion im Thrombozyten wäre auch ein direkter Einfluss auf das Glykoprotein IIb-IIIa möglich. Da Phloretin scheinbar intrazellulär wirken kann, ist eine Bindung an den Rezeptor mit anschließender Konformationsänderung nicht auszuschließen. Entsprechend einer

kompetitiven Hemmung wäre dann eine Bindung von Fibrinogen nicht mehr möglich. Um die genaue Wirkungsweise des antithrombozytären Effektes von Phloretin und anderen Flavonoiden zu klären sind weitere Studien notwendig.

Bei den Ergebnissen unserer Versuche erkennt man eine Abhängigkeit vom gewählten Thrombozytenaktivator. Phloretin vermag bei einer Stimulierung mit ADP einen größeren Effekt auszuüben als bei TRAP. Letzterer ist ein sehr starker Agonist der Plättchenaktivierung, was ein Grund für die geringere Expressionshemmung von GPIIb-IIIa durch Phloretin sein könnte. Eine ähnliche Beobachtung ergibt auch eine andere Studie die ADP und TRAP zur Aktivierung nutzt. Die getesteten pharmakologischen GPIIb-IIIa Antagonisten können alle die ADP-induzierte Aggregation hemmen. Im Gegensatz dazu ist die TRAP-induzierte Plättchenaggregation auch noch bei hohen Konzentrationen der Antagonisten nachweisbar (24).

Ein weiterer Marker ist P-Selektin, das in den  $\alpha$ -Granula gespeichert, nach der Aktivierung freigesetzt und auf der Oberfläche exprimiert wird. Durch diesen Rezeptor wird eine Adhäsion zwischen den Plättchen mit Leukozyten und Endothelzellen vermittelt (3,29,30,41). Anhand des mAK CD62P kann dieser Prozess verfolgt werden, der ein späteres Stadium der Aktivierung repräsentiert. Eine erhöhte Expression würde daher für eine vermehrte Plättchenaktivierung sprechen, aber auch ein Hinweis auf vermehrte Leukozytenrekrutierung darstellen. Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (37) oder Myeloproliferativen Erkrankungen (39) wird eine erhöhte basale P-Selektin Expression nachgewiesen.

P-Selektin ist auch in gelöster Form im Plasma vorhanden. Dabei entspricht dies zum größten Teil dem P-Selektin, welches zuvor an der Thrombozytenoberfläche exprimiert war (3). Die Abscherung der Rezeptoren von der Plättchenmembran erfolgt wieder sehr rasch nach der Aktivierung (3,55).

In unseren Versuchen ist kein Effekt von Phloretin auf die Expression von P-Selektin nachweisbar. Auch in höherer Konzentration vermag Phloretin keine Reduktion der CD62P-positiven Zellen zu bewirken. Durch die Agonisten ADP und TRAP kann eine Freisetzungsreaktion der  $\alpha$ -Granula ausgelöst werden, was für ein funktionierendes System spricht. Bei nahezu identischen Messzeiten zwischen Kontroll- und Phloretinproben ist eine frühzeitige Abscherung der Rezeptoren mit entsprechender Abnahme der P-Selektin Expression, ebenfalls unwahrscheinlich. Ein Grund kann auch



die fehlende Interaktion mit anderen Zellen und inflammatorischen Substanzen sein, wie sie *in vivo* besteht. Das stellt auch Michelson et al. in seinem Artikel dar. Die Expression von P-Selektin ist *in vitro* nach Aktivierung nicht reversibel. *In vivo* dagegen, so dokumentieren die Autoren, verlieren Thrombozyten rasch wieder das P-Selektin von der Oberfläche und zirkulieren weiter im Blutkreislauf mit erneuter Funktionsfähigkeit (56). Eine andere Studie zeigt eine besonders große intraindividuelle Varianz für die Expression von P-Selektin im Gegensatz zur Fibrinogenbindung an GPIIb-IIIa. Dabei sind mehrere Proben eines Probanden innerhalb einer Woche unter gleichen Bedingungen abgenommen worden. Der Variationskoeffizient für die P-Selektin Expression mit Aktivierung durch niedrige ADP-Konzentration ist sehr hoch. Der Koeffizient nimmt bei höherer ADP Konzentration ab (37).

Vergleichende Studien mit Phloretin existieren derzeit nicht. Eine Studie von Pearson et al. untersucht den Effekt von Kakao Konsum und Einnahme von Aspirin auf die Thrombozytenaktivität *ex vivo*. Die Expression von P-Selektin nach Stimulierung mit ADP kann weder nach Aufnahme von Kakao noch nach Aspirin gesenkt werden. Eine signifikante Reduktion der CD62P-positiven Zellen wird nur mit dem Agonisten Epinephrin und der Kombination aus Aspirin und Kakao erreicht. Bei den Ergebnissen lässt sich eine Abhängigkeit von der erreichten initialen Aktivierung als auch der Auswahl des Agonisten sowie deren Konzentration erkennen (61). Eine andere *in vitro* Studie mit Anthocyanidinen und phenolischen Säuren zeigt ähnliche Ergebnisse. Eine signifikante Reduktion der P-Selektin Expression wird unter Epinephrin-Stimulation nicht erreicht sowie mit dem Agonisten TRAP nur durch eine Mischung verschiedener Polyphenole und ihrer Metabolite. Die Zugabe von einzelnen Anthocyanidinen oder phenolischen Säuren zum Vollblut zeigt zumeist nur einen abfallenden Trend der P-Selektin Expression. Diese Untersuchungen werden mit geringen Konzentrationen der Polyphenole durchgeführt, die auch mit der Nahrung erreicht werden können (64).

Eine weitere Studie von Rein et al. erbringt sehr verschiedene Effekte für *in vitro* und *ex vivo* Versuche. Dabei werden die Polyphenole im Kakao (besonders Procyanidin), Koffein und alkoholfreien Rotwein getestet. Die *in vitro* Inkubation mit Polyphenolen - ähnlich unserem Versuchsaufbau - zeigt eine signifikante Reduktion der CD62P-positiven Zellen für Procyanidine und alkoholfreien Rotwein unter Stimulation mit dem schwachen Agonist Epinephrin. Die Effekte *ex vivo* zu verschiedenen Zeitpunkten nach Konsum können den *in vitro* Effekt für alkoholfreien Rotwein nicht bestätigen. Durch Aufnahme von Kakao wird in den Epinephrin-stimulierten Proben ebenfalls keine

verminderte P-Selektin Expression nachgewiesen. Eine signifikante Reduktion zeigen dagegen die ADP-stimulierten Versuche. Im Einklang mit anderen Studien ist dabei eine Abhängigkeit von der Konzentration des verwendeten Agonisten sichtbar. Erst sechs Stunden nach Konsum zeigt sich eine signifikante Reduktion von CD62P-positiven Zellen bei erhöhter initialer Aktivierung durch eine hohe ADP-Konzentration (65).

Wie beschrieben scheren zirkulierende aktivierte Thrombozyten das exprimierte P-Selektin sehr rasch wieder von der Oberfläche ab. Aus diesem Grund ist es fraglich, ob es einen idealen Marker der Thrombozytenaktivierung in der Durchflusszytometrie darstellt (56). Anhand der Versuche mit Forskolin zeigt sich, dass eine Beeinflussung von P-Selektin *in vitro* möglich ist. Der Effekt von Forskolin wird über die Aktivierung der Adenylatcyclase vermittelt (47). Wir müssen daher davon ausgehen, dass Phloretin nicht in die intrazellulären Signalwege eingreifen kann.

Eine andere Studie bestätigt, dass GPIIb-IIIa Antagonisten nur geringe oder gar keinen Einfluss auf die Freisetzungsreaktionen von Thrombozyten besitzen. Die Expression von P-Selektin kann bei fast allen GPIIb-IIIa Antagonisten sowohl unter ADP- als auch unter TRAP-Stimulation nicht gehemmt werden (24). Des Weiteren zeigen andere Studien, dass nicht alle Polyphenole einen Effekt auf die P-Selektin Expression ausüben.

### **5.1.2 Aggregometrie**

Auf Grund der differentiellen Ergebnisse in den durchflusszytometrischen Messungen untersuchen wir zusätzlich den Einfluss von Phloretin auf die Aggregation der Thrombozyten als funktionellen Test. Diese Methode ermöglicht keine Differenzierung einer direkten Plättchenaktivierung wie die Durchflusszytometrie, kann aber die Veränderung der Thrombozytenreaktivität einer bestimmten Situation im Allgemeinen anzeigen.

Die Änderung der maximalen Aggregation unter Zugabe der Agonisten ADP und Kollagen zeigt das Ausmaß der Gerinnungshemmung an. Eine Senkung kann in allen Versuchen nachgewiesen werden, wobei Phloretin nur durch Stimulation mit der kleineren ADP-Konzentration signifikante Ergebnisse zeigt. Auf der Originalregistrierung ist sehr gut zu erkennen, dass Phloretin die zweite Phase der Aggregation hemmt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Studie von Landolfi et al. die den Effekt von sechzehn verschiedenen Flavonoiden auf die Plättchenaggregation untersuchen.

Phloretin ist einer der stärksten Inhibitoren. Eine halb maximale Hemmung der Aggregation, induziert durch Arachnoidonsäure, bedarf einer wesentlich geringeren Konzentration an Phloretin als unter Stimulation mit Kollagen (45). Verglichen mit unseren Ergebnissen könnte es den nicht signifikanten Effekt bei der Stimulierung mit Kollagen erklären, da die maximale verwendete Konzentration von Phloretin niedriger liegt. Mit ADP als Agonist wird entsprechend unseren Ergebnissen eine signifikante Reduktion der maximalen Aggregation ermittelt (45). In einer anderen Studie von Ozaki et al. werden Thrombin und Ionomycin zur Stimulierung in der Aggregometrie benutzt. Eine halb maximale Aggregationshemmung erreichen sie erst mit einer hohen Phloretinkonzentration und dem Agonist Thrombin. Einen Einfluss auf die Ionomycin-induzierte Gerinnung durch Phloretin kann nicht dargestellt werden (59). Die Hemmung der Aggregation zeigt damit eine Abhängigkeit vom gewählten Agonisten. In beiden Studien wird des Weiteren eine Hemmung der Abbauprodukte der Cyclooxygenase durch Phloretin beschrieben (45,59). Zusammen mit den Ergebnissen unserer Studie, das Glykoprotein IIb-IIIa betreffend, bestehen vermutlich mehrere Ansatzpunkte für die Wirkung von Phloretin auf die Thrombozytenfunktion.

## **5.2 Absorption und Bioverfügbarkeit von Phloretin**

Ergebnisse von *in vitro* Studien müssen auf ihre Reproduzierbarkeit *in vivo* hinterfragt werden. Die Möglichkeit von Absorption und Metabolisierung können die Wirkung von Phloretin innerhalb des menschlichen Körpers erheblich limitieren.

Bereits die Zubereitungsform der Nahrung hat einen starken Effekt auf die tatsächlich aufgenommene Konzentration an Polyphenolen. Es ist bekannt, dass Äpfel die höchste Konzentration an Flavonoiden in der Schale aufweisen (14,18,27,79,80). Wie eine Studie belegen kann, sogar erhöht in mit Pestiziden behandelten Sorten. Eine Ausnahme stellt lediglich Phloridzin dar (14). Würde man die Schalen entfernen ist der aufgenommene Anteil zu gering, um eine der aufgezeigten Wirkungen im Körper zu erzielen (14). Im Gegensatz dazu befinden sich in Apfelsäften höhere Konzentrationen an Phloretin als in den getesteten Äpfeln (79). Die industrielle Herstellung von Säften bedingt wiederum eine höhere Konzentration an Dihydrochalconen - zu denen Phloretin gehört - gegenüber handausgepressten Säften (79). Die Ursache dafür kann in der kompletten Verarbeitung aller Teile inklusive Kernen und Schalen mit sehr hohen

Flavonoidkonzentrationen sowie der thermischen Bestrahlung mit nachfolgender Inaktivierung der abbauenden Enzyme liegen (79). Das Schälen von Früchten und Gemüse kann zu einem signifikanten Verlust an Polyphenolen im Allgemeinen führen. Des Weiteren eliminiert Kochen von Zwiebeln und Tomaten nach einigen Minuten zwischen 75% und 85% ihrer initialen Quercetinkonzentration sowie 65% nach Zubereitung in der Mikrowelle und etwa 30% durch Braten (50).

Zur Bioverfügbarkeit, Absorption und Metabolisierung von Polyphenolen gibt es einige Untersuchungen, die die Vorgänge aber nicht bis ins letzte Detail zu klären vermögen. Möglicherweise kommt der in unserer Studie dargestellten signifikanten GPIIb-IIIa Reduktion durch die mittlere verwendete Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Phloretin die größte physiologische Bedeutung zu. In unseren Versuchen wird das Flavonoid direkt mit der Vollblutprobe inkubiert. Dies würde der Konzentration im Plasma *in vivo* nach oraler Aufnahme und Absorption der Substanz entsprechen. Dass die von uns gewählte Konzentration an Phloretin auch realistisch im Bezug auf physiologische Effekte des Flavonoids ist, zeigt eine Studie an gesunden Probanden. Dabei wird Phloridzin im Plasma gesunder Probanden ohne gesonderte Ernährungsweise im Vorfeld der Untersuchungen identifiziert. Die gemessenen Konzentrationen lagen in dem von uns verwendeten Bereich. Die Ergebnisse deuten auf eine Absorption als Glykosidform hin (60). Spätere Studien lassen eine Hydrolyse von Phloridzin zu Phloretin durch die Lactat-Phloridzin-Hydrolase (LPH) vor der Absorption vermuten (18,49). Die Aufnahme in intestinale Zellen erfolgt dann als Aglykon. Diese Annahme bestätigt eine Studie an Ratten, welche mit Phloretin oder Phloridzin gefüttert werden. Im Plasma der Tiere kann kein Phloridzin identifiziert werden. Der überwiegende Teil liegt als konjugierte Metaboliten von Phloretin - unabhängig von der verabreichten Form - vor. Es zeigt sich weiterhin, dass beide Formen sehr rasch absorbiert und eliminiert werden. Nach vierundzwanzig Stunden findet man im Plasma Konzentrationen, die dem Ausgangslevel vor der Fütterung entsprechen. Das würde dafür sprechen, dass die Substanzen keinem enterohepatischem Kreislauf unterliegen (18). Diese Ergebnisse bestätigen, dass Phloretin absorbiert werden kann und dass auch die glykosilierte Form als Aglykon (Phloretin) im Plasma vorliegt.

Die aktiven Polyphenole, welche durch Glukoronidierung, Methylierung und Sulfatierung aus den Aglykonen entstehen, entsprechen meistens nicht den nativen Formen aus der Nahrung, die aber Inhalt der Studien sind. Ob die Bioaktivität durch die Metabolisierung

verändert wird bleibt fraglich (4,70). Die maximale Konzentration von Flavonoiden im menschlichen Plasma, die nach Nahrungsaufnahme erreicht werden kann, liegt bei etwa 1  $\mu\text{M}$  bis 2  $\mu\text{M}$  (83). Der Nachweis von Phloretin im tierischen Plasma in Konzentrationen die *in vitro* antithrombozytäre Effekte auslösen können, lässt auch Effekte *in vivo* vermuten.

Die meisten Studien verwenden jedoch Dosen die eher pharmakologischer Bedeutung sind (83). Auch die von uns gewählte maximale Konzentration an Phloretin liegt außerhalb der physiologisch nachgewiesenen Mengen an Flavonoiden. Weitere Studien zur Bioverfügbarkeit der Polyphenole sind daher notwendig.

### 5.3 Bedeutung und Beurteilung der Durchflusszytometrie

In den letzten Jahren hat die Durchflusszytometrie immer mehr an Bedeutung gewonnen und besitzt ein breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten. Besonders in der Analyse von Thrombozytenfunktionsstörungen kommt ihr ein großer Stellenwert zu. Die Methode ermöglicht es, anhand der auf der Oberfläche exprimierten Strukturen eine Aussage über den Aktivierungsgrad der Blutplättchen zu treffen. Des Weiteren lässt sich die Oberflächendichte thrombozytärer Glykoproteine bestimmen.

Durchgesetzt hat sich bei der Analyse am Durchflusszytometer die Vollblutmethode nach Shattil (73). Ein entscheidender Vorteil dabei ist das physiologische Milieu, in dem die Thrombozyten verbleiben und somit weniger anfällig gegenüber Störfaktoren sind. Mit diesem Vorgehen wird eine minimale Manipulation der Zellen gewährleistet und verhindert eine artifizielle Aktivierung der Blutplättchen. Die Methode besitzt einen hohen Grad an Sensitivität bei der Identifizierung von Thrombozytensubpopulationen und der Differenzierung unterschiedlichen Aktivierungsverhaltens (55,73).

Die Verwendung der Doppelmarkierungstechnik mit dem Einsatz fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper (mAK) ermöglicht die Differenzierung der Thrombozyten von anderen Zellen im Vollblut. Dafür wird ein mAK gegen ein thrombozytenspezifisches Antigen zur Detektion der Blutplättchen verwendet. Dafür eignet sich am ehesten ein Antikörper gegen den GPIb-V-IX-Komplex.

GPIX (CD42a) und GPIb als Bestandteile des Komplexes sind auf nicht aktivierten Thrombozyten in konstanter Menge vorhandene thrombozytenspezifische Oberflächenrezeptoren im Verhältnis 1:1 (29). Diese werden infolge einer Aktivierung *in*

*vitro* mit Agonisten sowie einer Gefäßwandverletzung *in vivo* - unabhängig von der Degranulation - downreguliert (6,86). Trotzdem ist es möglich, mit spezifischen Antikörpern gegen diese Glykoproteine Thrombozyten im Scatterplot-Diagramm zuverlässig zu definieren (6). Eine Reduktion der GPIb Expression von 65% durch den Agonisten TRAP hat keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten strömender Thrombozyten. Mit zunehmender Zeit nach Aktivierung zeigt sich wieder ein Anstieg der GPIb Expression, die den Ausgangswert jedoch nicht erreicht (86). Die Charakterisierung als GPIb- oder GPIX-positive Partikel innerhalb der festgelegten polygonalen Region und nicht als einzelne Thrombozyten bedingt eine Beschränkung dieser Methode (6). Die Eingrenzung der Thrombozytenpopulation ist aber notwendig, um eventuell vorhandene größere Thrombozytenaggregate aus der Messung auszuschließen.

Da die Antikörper eine monoklonale Abstammung besitzen, verringert sich die Wahrscheinlichkeit des Auftretens unspezifischer Bindungen (74). Zur Kontrolle dieser unspezifischen Bindungen wurde zu jeder Blutprobe eine Isotypenkontrolle mitgeführt und statistisch ausgewertet.

Für die Weiterverarbeitung der Blutproben ist eine Antikoagulation unerlässlich. Das meist verwendete Entnahmemedium für die Thrombozytenanalyse ist Citrat. Auf keinen Fall sollte EDTA verwendet werden, da der so entstehende Calciumentzug zu einer Konformationsänderung der Oberflächenproteine führt. Dies kann zu einer artifiziellen Aktivierung und Degranulation der Blutplättchen mit falsch erhöhter Expression der Glykoproteine beitragen (67,72). Heparin-antikoagulierte Röhrchen sind ebenfalls nicht geeignet, da sie ähnliche Effekte auf die Struktur der thrombozytären Oberflächenproteine ausüben (72). Es gibt jedoch eine Studie, die in Citrat-antikoagulierte Blut eine höhere basale P-Selektin Expression nachweist im Vergleich zu anderen Antikoagulantien (37).

Eine häufig diskutierte Frage ist die Notwendigkeit der Fixierung. Der Vorteil dabei liegt in der Stabilisierung der Thrombozyten und einer Erweiterung des Zeitfensters für die Messung auf vierundzwanzig Stunden. Nachteilig kann sich jedoch eine fixierungsbedingte Destruktion der Epitope auf die Bindung der mAK auswirken. Die Autofluoreszenz erhöht sich und führt zur Verfälschung der Messergebnisse. Weitere funktionelle Tests sind dann *in vitro* nicht mehr nachvollziehbar (72). Bei der Etablierung

unseres Versuchsaufbaus haben wir zunächst auch mit einer Fixierung gearbeitet. Allerdings haben wir festgestellt, dass die Proben im Anschluss nicht mehr durch Agonisten stimulierbar waren. Nur ohne die Fixierung können wir eine ausreichende Aktivierung der Thrombozyten erreichen. In der Literatur sind beide Methoden beschrieben und angewendet. Eine Weiterverarbeitung der Proben ohne Fixierung muss dabei innerhalb von sechzig Minuten nach Abnahme erfolgen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten (67). Wir haben das in unserer Studie berücksichtigt und dieses Zeitlimit bei allen Proben eingehalten.

Das in unserer Studie untersuchte Flavonoid Phloretin wird in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. DMSO kann ab einer Konzentration von 2% zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation führen (45). In unseren Vorversuchen zeigt sich ein deutlicher Einfluss des Lösungsmittels schon bei ca. 1%. Um eine Beeinträchtigung der Messergebnisse zu vermeiden, haben wir daher eine niedrigere Konzentration von DMSO verwendet. Bei jedem Versuch wird eine Lösungsmittelkontrolle parallel mitgeführt. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf die Werte der DMSO-Kontrollen, um auch geringe Effekte des Lösungsmittels auszuschließen.

#### **5.4 Methodenkritik**

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Effekte von Phloretin auf die Thrombozytenfunktion beruhen alle auf *in vitro* Studien. Dabei besteht das Risiko einer artifiziellen Aktivierung der Blutplättchen sowohl bei der Gewinnung als auch der Verarbeitung der Proben. Aus diesem Grund werden die Bedingungen in Abnahme und Aufbereitung bei allen Probanden konstant gehalten und die Proben in kürzester Zeit verarbeitet (maximal eine Stunde). Eine Einschränkung der Methode ergibt sich auch durch fehlende Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen sowie die mögliche Elimination von Aggregaten nach Aktivierung durch die Milz und anderer Organe *in vitro*.

## 5.5 Relevanz und Ausblick

Die Resultate unserer Studie belegen eine verminderte Thrombozytenaktivität und eine daraus resultierende Aggregationshemmung durch Phloretin. Während die Freisetzungsreaktion unbeeinflusst bleibt, kann die Expression des Glykoproteins GPIIb-IIIa signifikant reduziert werden. Die Ergebnisse der Aggregometrie bestätigen die entscheidende Rolle des GPIIb-IIIa bei der Thrombozytenaggregation. Vorangegangene Studien identifizieren das Membranglykoprotein als ausschlaggebenden Mediator der thrombozytären, proinflammatorischen Mechanismen (53). Nach initialem Kontakt der Thrombozyten mit dem Endothel über den GPIb-V-IX Rezeptor erfolgt die Aktivierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors mit nachfolgender Festigung der Adhäsion und Aggregation (29,41,52). Die Beobachtung, dass eine Thrombozytenadhäsion bereits an strukturell intaktes Endothel erfolgt, bestätigt die zentrale Rolle der Blutplättchen an der Initiierung und Aufrechterhaltung des chronisch-inflammatorischen Prozesses der Atherosklerose (51,53). Phloretin könnte durch seinen anti-thrombozytären Effekt zur Risikoreduktion der KHK und akuten Gefäßereignissen beitragen. Damit im Einklang stehen Ergebnisse von Kohortenstudien die durch Äpfel- und Zwiebelaufnahme eine Senkung der Mortalität an ischämischen Herzerkrankungen nachweisen. Eine regelmäßige Flavonoidzufuhr wird zumeist über mehrere Jahre durchgeführt (34,35,43,44). Die Aufnahme an Polyphenolen wird durch eine kombinierte Auswahl flavonoidreicher Nahrungsmittel realisiert. Die Ergebnisse der Studien resultieren demzufolge aus den Effekten vieler verschiedener Flavonoide. Eine Identifizierung von Einzeleffekten bestimmter Flavonoide und deren Relevanz lassen sich damit nicht nachweisen. Arts et al. fasst die bis 2005 erfolgten Studien mit Flavonoiden in einem Review zusammen. Insgesamt sieben der zwölf aufgeführten Studien können einen protektiven Effekt der Flavonoide darstellen mit einer Risikoreduktion der koronaren Herzkrankheit von bis zu 65%. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Wirkung von Flavonolen und Flavonen (4). Auch wenn einige Studien den positiven Einfluss der Flavonoide nicht bestätigen können, überwiegt in der Literatur die Annahme, dass Flavonoide günstig auf die Entwicklung ischämischer Herzerkrankungen einwirken.

Das Verständnis von Thrombozyten als inflammatorische Zellen mit maßgeblicher Beteiligung an chronisch entzündlichen Erkrankungen fordert eine neue Generation von antithrombotischen Substanzen, die gezielt proinflammatorische Funktionen inhibieren



ohne hämostatische Mechanismen zu beeinträchtigen. Die Ergebnisse unserer und vorangegangener Studien weisen darauf hin, dass einzelne Flavonoide in unserer täglichen Nahrung diese Stellung einnehmen können. Es werden aber weitere Studien zur Bioverfügbarkeit und der wirksamen Metaboliten notwendig sein, um einen pharmakologischen Nutzen aus der Vielzahl von protektiven Effekten der einzelnen Flavonoide ziehen zu können.

## 6 Zusammenfassung

In den letzten Jahren ist in den Industrieländern die Zahl ernährungsbedingter Krankheiten, wie z.B. Diabetes mellitus, Hypertonie, Adipositas und insbesondere kardiovaskuläre Erkrankungen deutlich angestiegen. Epidemiologische und experimentelle Studien deuten darauf hin, dass sekundären Pflanzenstoffen in der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen eine Bedeutung zukommt. Phloretin, ein Flavonoid aus der Klasse der Dihydrochalcone, ist durch sein Vorkommen in Äpfeln und Tomaten ein wesentlicher Bestandteil westlicher Ernährung. Es gibt Hinweise darauf, dass dieses Flavonoid ein hohes antioxidatives Potential sowie einen antiaggregatorischen Effekt besitzt. Unklar war bisher, inwiefern Phloretin auf die Aktivierung der Thrombozyten einwirken kann und ob dieser Mechanismus zu einer Hemmung der Plättchenaggregation führt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der durchflusszytometrischen Analyse aktivierungsspezifischer Oberflächenrezeptoren von menschlichen Thrombozyten innerhalb eines gesunden Probandenkollektivs unter dem Einfluss von Phloretin. Für die Identifizierung der Thrombozyten aus der Vollblutprobe wird der GPIX-Rezeptor (CD42a) genutzt. Als Marker der Thrombozytenaktivierung dienen CD62P (P-Selektin), ein nach Aktivierung aus den  $\alpha$ -Granula freigesetzter Oberflächenrezeptor und PAC-1, ein Antikörper der den aktivierten GPIIb-IIIa-Rezeptor markiert. Die Aktivierung der Blutplättchen erfolgt nach Inkubation mit Phloretin durch die Agonisten ADP und TRAP-6 *in vitro*.

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass Phloretin eine konzentrationsabhängige Expressionshemmung des Fibrinogenrezeptors GPIIb-IIIa bei der Stimulation mit ADP und TRAP bewirkt. Besonders bemerkenswert ist die signifikante Reduktion durch eine geringere Flavonoidkonzentration, welche möglicherweise *in vivo* erreicht werden kann. Nachweisbare Unterschiede durch Phloretin in der P-Selektin Expression lassen sich zu keinem Zeitpunkt der Untersuchungen aufzeigen.

Um die funktionelle Relevanz dieser differentiellen Regulation zu überprüfen nutzen wir die Aggregometrie zur Erfassung von Veränderungen der Thrombozytenreaktivität. Dabei wird Phloretin mit plättchenreichem Plasma inkubiert und durch die Agonisten ADP und Kollagen aktiviert. Die Ergebnisse zeigen eine Hemmung der maximalen Aggregation durch Phloretin. Auch finden sich eine Steigerung der Reversibilität sowie

eine verminderte Aggregationsgeschwindigkeit nach Phloretin-Zugabe in allen Versuchen.

Zusammenfassend führt Phloretin bei differentieller Regulation mit Reduktion von PAC-1 und fehlendem Einfluss auf thrombozytäre Freisetzungsreaktionen zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation. Diese Ergebnisse bestätigen die zentrale Rolle des Fibrinogenrezeptors GPIIb-IIIa im Prozess der Plättchenaktivierung und –aggregation. Durch den nachgewiesenen antithrombozytären und antiaggregatorischen Effekt könnte Phloretin eine präventive Bedeutung in Hinblick auf kardiovaskuläre Ereignisse zukommen.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AP	Aktivator-Protein
ApoE	Apolipoprotein E
ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
CD40L	CD40 Ligand
CFR	Cyclic Flow Reduction
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Herz- und Kreislaufforschung
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGCG	Epigallocatechin-3-gallate
FEV	Forciertes endexpiratorisches Volumen
FG	Frischgewicht
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	Forward Scatter
GP	Glykoprotein
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta
i.v.	Intravenös
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low density lipoprotein
LIBS	Ligandeninduzierte Bindungsstelle
LPH	Lactat-Phloridzin-Hydrolase
mAK	Monoklonale Antikörper
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MMP	Matrixmetalloproteinase
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B

NO	Stickstoffmonoxid
PAP	Platelet Aggregation Profiler
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PECAM	Platelet-endothelial cellular adhesion molecule
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PPP	Platelet poor plasma
PRP	Platelet rich plasma
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RANTES	<b>R</b> egulated on <b>a</b> ctivation <b>n</b> ormal <b>T</b> cell <b>e</b> xpressed and <b>s</b> ecreted
SA	Standardabweichung
SEM	Standard error of the mean
SGLT	Sodium-Glukose Cotransporter
SSC	Side Scatter
TAC	Total antioxidant capacity
TNF	Tumornekrosefaktor
TOSC	Total oxyradical scavenging capacity
TRAP-6	Thrombin-receptor-activating-peptide-6
UV	Ultraviolet
vWF	Von Willebrand Faktor
WHO	World Health Organisation

**8      Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:       Grundstruktur der Flavonoide..... 3

Abbildung 2:       Strukturformel von Phloridzin und Phloretin..... 11

Abbildung 3:       Immunologische Marker..... 16

Abbildung 4:       Model der Atherogenese-getriggert durch Thrombozyten... 23

Abbildung 5:       Abgrenzung der Thrombozyten im “Dot Plot”..... 29

Abbildung 6:       Histogramm: CD62P–Fluoreszenz ..... 29

Abbildung 7:       Auswertung der Aggregometerkurven..... 32

Abbildung 8:       PAC-1 Fluoreszenz (ADP-stimuliert)..... 35

Abbildung 9:       PAC-1 Fluoreszenz (TRAP-stimuliert)..... 36

Abbildung 10:      CD62P Fluoreszenz (ADP-stimuliert)..... 38

Abbildung 11:      CD62P Fluoreszenz (TRAP-stimuliert)..... 38

Abbildung 12:      CD62P Fluoreszenz mit Phloretin und Forskolin.....39

Abbildung 13:      Originalregistrierung Aggregometer.....40

Abbildung 14:      Maximale Aggregation (ADP-stimuliert)..... 42

Abbildung 15:      Reversibilität unter ADP–Stimulation..... 44

Abbildung 16:      Reversibilität unter Kollagen–Stimulation..... 45

Abbildung 17:      Slope–Werte (ADP-stimuliert)..... 47

**9 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Hauptklassen der Flavonoide.....	4
Tabelle 2:	Gehalt an Dihydrochalconen in verschiedenen Apfelsorten..	12
Tabelle 3:	Übersicht der thrombozytären Membranrezeptoren.....	17
Tabelle 4:	Monoklonale Antikörper.....	26
Tabelle 5:	Demographische Daten der Probanden.....	26
Tabelle 6:	Pipettierschema der mAK.....	28
Tabelle 7:	Bindung des mAK PAC-1.....	34
Tabelle 8:	Bindung des mAK CD62P.....	37
Tabelle 9:	Messergebnisse der maximalen Aggregation.....	41
Tabelle 10:	Messergebnisse der Reversibilität.....	43
Tabelle 11:	Einzelwerte der Reversibilität für 1,25 $\mu$ M ADP.....	43
Tabelle 12:	Messergebnisse der Slope–Werte.....	46

**10 Literaturverzeichnis**

1. Abrams C, Shattil SJ. Immunological Detection of Activated Platelets in Clinical Disorders. *Thromb Haemost* 1991; 65: 467-473.
2. American Heart Association: International Cardiovascular Disease Statistics 2006. URL: [http://www.americanheart.org/downloadable/heart/1173881029846-InternationDeathRates\\_2007.pdf](http://www.americanheart.org/downloadable/heart/1173881029846-InternationDeathRates_2007.pdf) (Stand: 11.08.2007)
3. André P. P-selectin in haemostasis. *Br J Haematol* 2004; 126: 298-306.
4. Arts JCW, Hollman PCH. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 317S-325S.
5. Auger C, Gerain P, Laurent-Bichon F, et al. Phenolics from Commercialized Grape Extracts Prevent Early Atherosclerotic Lesions in Hamsters by Mechanisms Other than Antioxidant Effect. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 5297-5302.
6. Ault KA, Rinder HM, Mitchell JG, Rinder CS, Lambrew CT, Hillmann RS. Correlated Measurement of Platelet Release and Aggregation in Whole Blood. *Cytometry* 1989; 10: 448-455.
7. Becton Dickinson. Training-Handbuch Durchflusszytometer. Heidelberg 1999
8. Beer JH. Plättchenrezeptoren: Nomenklatur-Struktur-Funktion. *Schweiz Med Wschr* 1992; 122: 1249-1263.
9. Biris N, Abatzis M, Mitsios JV, et al. Mapping the binding domains of the  $\alpha_{IIb}$  subunit. A study performed on the activated form of the platelet integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . *Eur J Biochem* 2003; 270: 3760-3767.
10. Bizzozero J. Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Archiv für pathol Anat* 1880; Bd. XC: 261-332.
11. Boyer J, Liu RH. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J* 2004;3:5
12. Budde U. Diagnose von Funktionsstörungen der Thrombozyten mit Hilfe der Aggregometrie. *J Lab Med* 2002; 26: 564-571.
13. Butland BK, Fehily AM, Elwood PC. Diet, lung function, and lung function decline in a cohort of 2512 middle aged men. *Thorax* 2000; 55: 102-108.
14. Chinnici F, Bendini A, Gaiani A, Riponi C. Radical Scavenging Activities of Peels and Pulp from cv. Golden Delicious Apples as Related to Their Phenolic Composition. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 4684-4689.



15. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet GPIb-V-IX Complex. Structure, Function, Physiology, and Pathology. *Semin Thromb Hemost* 1995; 21: 130-135.
16. Coimbra S, Castro E, Rocha-Pereira P, Rebelo I, Rocha S, Santos-Silva A. The effect of green tea in oxidative stress. *Clin Nutr* 2006; 25: 790-796.
17. Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Demigne C, Remesy C. Comparison of the Intestinal Absorption of Quercetin, Phloretin and Their Glucosides in Rats. *J Nutr* 2001; 131: 2109-2114.
18. Crespy V, Aprikian O, Morand C, et al. Bioavailability of Phloretin and Phloridzin in Rats. *J Nutr* 2002; 132: 3227-3230.
19. Dai Q, Borenstein AR, Wu Y, Jackson JC, Larson EB. Fruit and Vegetable Juices and Alzheimer's Disease: The Kame Projekt. *Am J Med* 2006; 119: 751-759.
20. Davis PA, Polagruto JA, Valacchi G, et al. Effect of Apple Extracts on NF- $\kappa$ B Activation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Exp Biol Med* 2006; 231: 594-598.
21. Deana R, Turetta L, Donella-Deana A, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate inhibits platelet signalling pathways triggered by both proteolytic and non-proteolytic agonists. *Thromb Haemost* 2003; 89: 866-874.
22. Demrow HS, Slane PR, Folts JD. Administration of Wine and Grape Juice Inhibits In Vivo Platelet Activity and Thrombosis in Stenosed Canine Coronary Arteries. *Circulation* 1995; 91: 1182-1188.
23. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Herz- und Kreislaufforschung: AWMF-online-Leitlinien: Diagnose und Behandlung der chronischen koronaren Herzerkrankung, URL: <http://leitlinien.net>, Register Nr.019/001(Stand: 23.8.2006)
24. Dickfeld T, Ruf A, Pogatsa-Murray G, et al. Differential Antiplatelet Effects of Various Glycoprotein IIb-IIIa Antagonists. *Thromb Res* 2001; 101: 53-64.
25. Ding M, Lu Y, Bowman L, et al. Inhibition of AP-1 and Neoplastic Transformation by Fresh Apple Peel Extract. *J Biol Chem* 2004; 279: 10670-10676.
26. Duffy SJ, Keaney JF, Holbrook M, et al. Short- and Long-Term Black Tea Consumption Reverses Endothelial Dysfunction in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation* 2001; 104: 151-156.
27. Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 2000; 405: 903-904.
28. Freedman JE, Parker C, Li L, et al. Select Flavonoids and Whole Juice From Purple Grapes Inhibit Platelet Function and Enhance Nitric Oxide Release. *Circulation* 2001; 103: 2792-2798.
29. Gawaz M. Das Blutplättchen. Thieme Verlag, Stuttgart 1999

30. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115: 3378-3384.
31. Geleijnse JM, Launer LJ, Hofman A, Pols HAP, Witteman JCM. Tea Flavonoids May Protect Against Atherosclerosis The Rotterdam Study. *Arch Intern Med* 1999; 159: 2170-2174.
32. Guerrero JA, Navarro-Nunez L, Lozano ML, et al. Flavonoids inhibit the platelet TXA<sub>2</sub> receptors (TP) in platelets and smooth muscle cells. *Br J Clin Pharmacol*. 2007; 64: 133-144.
33. Hassan M, Yazidi CE, Landrier JF, et al. Phloretin enhances adipocyte differentiation and adiponectin expression in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 361: 208-213.
34. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342: 1007-1011.
35. Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet* 1997; 349: 699.
36. Hilt P, Schieber A, Yildirim C, et al. Detection of Phloridzin in Strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR Spectroscopy. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 2896-2899.
37. Holmes MB, Sobel BE, Howard DB, Schneider DJ. Differences between Activation Thresholds for Platelet P-Selectin and Glycoprotein IIb-IIIa Expression and Their Clinical Implications. *Thromb Res* 1999; 95: 75-82.
38. Hu H, Daleskog M, Li N. Influences of Fixatives on Flow Cytometric Measurements of Platelet P-Selectin Expression and Fibrinogen Binding. *Thromb Res* 2000; 100: 161-166.
39. Jensen MK, Nully Brown P, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbach HC. Increased platelet activation and abnormal membrane glycoprotein content and redistribution in myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 2000; 110: 116-124.
40. Jin YR, Han XH, Zhang YH, et al. Antiplatelet activity of Hesperetin, a bioflavonoid, is mainly mediated by inhibition of PLC- $\gamma$ 2 phosphorylation and Cyclooxygenase-1 activity. *Atherosclerosis* 2007; 194: 144-152.
41. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: Physiology and Biochemistry. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31: 381-390.
42. Kahle K, Kraus M, Richling E. Polyphenol profiles of apple juices. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 797-806.

43. Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* 1996; 312: 478-481.
44. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 560-568.
45. Landolfi R, Mower RL, Steiner M. Modification of Platelet Function and Arachidonic Acid Metabolism by Bioflavonoids. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 1525-1530.
46. Lee KW, Kim YJ, Kim DO, Lee HJ, Lee CY. Major Phenolics in Apple and Their Contribution to the Total Antioxidant Capacity. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 6516-6520.
47. Libersan D, Rousseau G, Merhi Y. Differential regulation of P-selektin expression by protein kinase A and protein kinase G in thrombin-stimulated human platelets. 2003; 89: 310-317.
48. Logeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean Diet, Traditional Risk Factors, and the Rate of Cardiovascular Complications after Myocardial Infarction. Final Report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999; 99: 779-785.
49. Lotito SB, Frei B. Relevance of Apple Polyphenols as Antioxidants in Human Plasma: Contrasting in Vitro and in Vivo Effects. *Free Radical Biology & Medicine* 2004; 36: 201-211.
50. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 727-747.
51. Massberg S, Brand K, Grüner S, et al. A Critical Role of Platelet Adhesion in the Initiation of Atherosclerotic Lesion Formation. *J Exp Med* 2002; 196: 887-896.
52. Massberg S, Gawaz M, Grüner S, et al. A Crucial Role of Glycoprotein VI for Platelet Recruitment to the Injured Arterial Wall In Vivo. *J Exp Med* 2003; 197: 41-49.
53. Massberg S, Schürzinger K, Lorenz M, et al. Platelet Adhesion Via Glycoprotein IIb Integrin Is Critical for Atheroprogession and Focal Cerebral Ischemia. An In Vivo Study in Mice Lacking Glycoprotein IIb. *Circulation* 2005; 112: 1180-1188.
54. Mayer B, Schumacher M, Brandstätter H, Wagner FS, Hermetter A. High-Throughput Fluorescence Screening of Antioxidative Capacity in Human Serum. *Anal Biochem* 2001; 297: 144-153.
55. Michelson AD. Flow cytometry: A Clinical Test of Platelet Function. *Blood* 1996; 87: 4925-4936.
56. Michelson AD, Furman MI. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Curr Opin Hematol* 1999; 6: 342-348.

- 
57. Nakamura Y, Watanabe S, Miyake N, Kohno H, Osawa T. Dihydrochalcones: Evaluation as Novel Radical Scavenging Antioxidants. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 3309-3312.
58. Olson ML, Kargacin ME, Ward CA, Kargacin GJ. Effects of Phloretin and Phloridzin on  $Ca^{2+}$  Handling, the Action Potential, and Ion Currents in Rat Ventricular Myocytes. *JPET* 2007; 321: 921-929
59. Ozaki Y, Matsumoto Y, Yatomi Y, Higashihara M, Kariya T, Shoji K. Effects of Five Anion Channel Blockers on Thrombin- and Ionomycin- Activated Platelet Functions. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 2147-2152.
60. Paganga G, Rice-Evans CA. The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Lett* 1997; 401: 78-82.
61. Pearson DA, Paglieroni TG, Rein D, et al. The effects of flavonol-rich cocoa and aspirin on ex vivo platelet function. *Thromb Res* 2002; 106: 191-197.
62. Rababah TM, Hettiarachchy NS, Horax R. Total Phenolics and Antioxidant Activities of Fenugreek, Green Tea, Black Tea, Grape Seed, Ginger, Rosemary, Gotu Kola, and Ginkgo Extracts, Vitamin E, and *tert*-Butylhydroquinone. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 5183-5186.
63. Raja MM, Tyagi NK, Kinne RKH. Phlorizin Recognition in a C-terminal Fragment of SGLT1 Studied by Tryptophan Scanning and Affinity Labeling. *J Biol Chem* 2003; 278: 49154-49163.
64. Rechner AR, Kroner C. Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thromb Res* 2005; 116: 327-334.
65. Rein D, Paglieroni TG, Pearson DA, et al. Cocoa and Wine Polyphenols Modulate Platelet Activation and Function. *J Nutr* 2000; 130: 2120S-2126S.
66. Rezk BM, Haenen GRMM, Vijgh v WJF, Bast A. The antioxidant activity of Phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 295: 9-13.
67. Ritchie JL, Alexander HD, Rea IM. Flow cytometry analysis of platelet P-selectin expression in whole blood- methodological considerations. *Clin Lab Haem* 2000; 22: 359-363.
68. Rossetti L, Smith D, Shulman GJ, Papachriston D, DeFronzo RA. Correction of Hyperglycemia with Phlorizin Normalizes Tissue Sensitivity to Insulin in Diabetic Rats. *J Clin Invest* 1987; 79: 1510-1515.
69. Sagesaka-Mitane Y, Miwa M, Okada S. Platelet Aggregation Inhibitors in Hot Water Extract of Green Tea. *Chem Pharm Bull* 1990; 38: 790-793.

70. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 215S-217S.
71. Schaefer S, Baum M, Eisenbrand G, Dietrich H, Will F, Janzowski C. Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Mol Nutr Food Res* 2006; 50: 24-33.
72. Schmitz G, Rothe G, Ruf A, et al. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus Protocol for Flow Cytometric Characterisation of Platelet Function. *Thromb Haemost* 1998; 79: 885-896.
73. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of Activated Platelets in Whole Blood Using Activation-Dependent Monoclonal Antibodies and Flow Cytometry. *Blood* 1987; 70: 307-315.
74. Shattil SJ. Why is platelet activation useful for assessing thrombotic risk? What are the advantages and limitations of using flow cytometry to measure platelet activation? *Am J Clin Nutr* 1992; 56: 789S-790S.
75. Sill JC, Proper JA, Johnson ME, Uhl CB, Katusic ZS. Reactive oxygen species and human platelet GP IIb/IIIa receptor activation. *Platelets* 2007; 18: 613-619.
76. Slimestad R, Fossen T, Verheul MJ. The flavonoids of Tomatoes. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 2436-2441.
77. Stangl V, Lorenz M, Stangl K. The role of tea and tea flavonoids in cardiovascular health. *Mol Nutr Food Res* 2006; 50: 218-228.
78. Statistisches Bundesamt. Todesursachenstatistik 2004. URL: <http://www.destatis.de/presse/deutsch/pm2005/p4600092.htm> (Stand: 10.7.2006)
79. Tomas-Barberan F, Clifford MN. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 1073-1080.
80. Tsao R, Yang R, Young C, Zhu H. Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *J Agric Food Chem* 2003; 51: 6347-6353.
81. Tsao R, Yang R, Xie S, Sockovie E, Khanizadeh S. Which Polyphenolic Compounds Contribute to the Total Antioxidant Activities of Apple? *J Agric Food Chem* 2005; 53: 4989-4995.
82. Vrhovsek U, Rigo A, Tonon D, Mattivi F. Quantitation of Polyphenols in Different Apple Varieties. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 6532-6538.
83. Watzl B, Rechkemmer G. Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* 2001; 48: 498-502.
84. WHO. World Health Statistics 2006. URL: <http://www.who.int/whosis/whostat2006/en/index.htm> (Stand: 10.7.2006)

85. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of Carcinogenesis by Dietary Polyphenolic Compounds. *Annu Rev Nutr* 2001; 21: 381-406.
86. Zanten v GH, Heijnen HFG, Wu Y, et al. A Fifty Percent Reduction of Platelet Surface Glycoprotein Ib Does Not Affect Platelet Adhesion Under Flow Conditions. *Blood* 1998; 91: 2353-2359.

**11 Publikationsliste**

1. Stangl V, Lorenz M, Ludwig A, Grimbo N, Guether C, Sanad W, Ziemer S, Martus P, Baumann G, Stangl K. The flavonoid phloretin suppresses stimulated expression of endothelial adhesion molecules and reduces activation of human platelets. *J Nutr* 2005; 135: 172-178.

## 12 Danksagung

Frau Prof. Dr. med. Verena Stangl möchte ich an erster Stelle für die Übernahme der Arbeit und die kompetente Betreuung ganz herzlich danken. Als Doktormutter stand sie mir mit wertvollen Ratschlägen und konstruktiver Kritik bei allen Fragen und Problemen zur Seite. Besonders durch ihre ständige Anwesenheit und zahlreiche Anregungen, hat sie wesentlich am Zustandekommen dieser Arbeit mitgewirkt.

Mein ganz persönlicher Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Mario Lorenz für die permanente Unterstützung bei allen Fragen rund um die Arbeit. Ich habe diese besonders geschätzt, da er nicht für die Betreuung meiner Arbeit zuständig war. Ohne seine Hilfe hätte ich diese Arbeit wahrscheinlich nicht beenden können.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Wasiem Sanad für die wertvolle Unterstützung bei der Einarbeitung und dem Verständnis der Methode.

Weiterhin möchte ich Fr. Dr. Sabine Ziemer und ihren Mitarbeitern des Instituts der Laboratoriumsmedizin ganz herzlich für die Bereitstellung und die Einarbeitung in die Methode der Aggregometrie bedanken. Die fachkundige Beratung bei der Auswertung der untersuchten Daten hat zum Gelingen der Arbeit maßgeblich beigetragen.

Des Weiteren möchte ich auch ganz herzlich Kathrin Minkwitz danken. Sie hat mir immer wieder bei der Suche nach freiwilligen Probanden innerhalb der Charité geholfen, sich selbst eingeschlossen.

Ganz herzlich danke ich Angelika Westphal für die ständige Hilfe bei der Beschaffung aller notwendigen Materialien. Durch die schnelle und unkomplizierte Unterstützung konnte ein reibungsloser Ablauf der Versuchsreihen ermöglicht werden.

Sehr herzlich möchte ich auch meiner Freundin und Kommilitonin Nicole Grimbo für die herausragende Unterstützung in der statistischen Aufbereitung der Daten danken.

Nicht zuletzt gehört mein Dank auch meinem Freund, meiner Mutter und meinem Stiefvater, die mir die Freiräume zum Erstellen der Arbeit ermöglicht haben. Durch ihre ständige Motivation und Erinnerungen konnte ich dieses Ziel – das Fertigstellen der Arbeit – erreichen.



## **13 Lebenslauf**

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

**14 Erklärung**

„Ich, Carola Güther erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *Der Einfluss des Flavonoids Phloretin auf die Thrombozytenaktivität und die Aggregationshemmung* 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.“

Datum: 30. April 2008

Unterschrift .....