



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Einfluss von Ausdauertraining auf die Thrombozytenfunktion bei Rauchern

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin:	Corinna Schlögl
Matrikel-Nummer:	0101406
Studienrichtung:	Ernährungswissenschaften (A474)
Betreuerin / Betreuer:	Univ.Prof. Dr. Ibrahim Elmadfa

Wien, am 15.09.09

Diese Diplomarbeit wurde durchgeführt an:

Universität Wien

Institut für Ernährungswissenschaften

Althanstraße 14

1090 Wien, Österreich

Institutsvorstand: Univ.Prof. Dr. Ibrahim Elmadfa

und

Medizinische Universität Wien

Institut für Physiologie

Schwarzspanierstraße 17

1090 Wien, Österreich

Institutsvorstand: Univ.Prof. Dr. Ivo Volf

VORWORT

Ich möchte mich recht herzlich bei meinem Hauptbetreuer Univ.Prof. Dr. Ibrahim Elmadfa vom Institut für Ernährungswissenschaften für die Ermöglichung dieser Diplomarbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön geht auch an Univ.Prof. Dr. Ivo Volf vom Institut für Physiologie für die Unterstützung bei der Ausarbeitung der Diplomarbeit und die Möglichkeit, eine so interessante Studie durchführen zu können.

Außerdem ein herzliches Danke an Dr. Alice Assinger für die Einweisung in die Laborarbeit und im Besonderen an Dr. Werner Schmid für die Unterstützung und stetige Betreuung dieser Diplomarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Firma Polar sowie Univ.Prof. Dr. Rochus Pokan für die Zurverfügungstellung der Pulsuhren bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern Elke und Wolfgang bedanken, die mich nicht nur bei meinem Studium immer voll unterstützt haben, sondern auch sonst stets bedingungslos hinter mir stehen.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2 LITERATURÜBERBLICK	5
2.1 Thrombozyten in physiologischen und pathologischen Prozessen	5
2.1.1 Thrombozyten - Physiologie	5
2.1.2 Die Hämostase - Blutstillung	7
2.2 Atherosklerose / Atherothrombose	10
2.2.1 Hypothesen zur Atherogenese	12
2.2.2 Klassifikation atherothrombotischer Läsionen	13
2.2.3 Endotheliale Dysfunktion	17
2.2.4 Inflammation	18
2.2.5 Rolle der Thrombozyten in der Atherogenese	21
2.3 Risikofaktoren für die Entwicklung von Atherothrombose	25
2.3.1 Auswirkungen von Rauchen auf Thrombozytenfunktion und Atherosklerose	26
2.3.2 Physische Aktivität und kardiovaskuläre Erkrankungen	27
3 MATERIAL UND METHODEN	33
3.1 Studienkollektiv	33
3.2 Blutabnahme	33
3.3 Durchflusszytometrie	33
3.3.1 Bestimmung der VASP-Phosphorylierung	34
3.3.2 Bestimmung des PRI	34
3.3.3 Bestimmung der CD62P-Expression	35
3.4 Bestimmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation	36
3.5 Spiroergometrie	37
3.6 Lauftraining	38
3.7 Auswertung und Statistik	38

4	ERGEBNISSE	39
4.1	Epidemiologische Eckdaten	39
4.2	Effekt des Trainingsprogramms auf den Leistungszustand	40
4.3	Auswirkungen des Lauftrainings auf die Thrombozytenfunktion	43
4.3.1	CD62P-Expression	43
4.3.2	Thrombozytenadhäsion	47
4.3.3	VASP-Phosphorylierung	48
4.3.4	Thrombozytenreaktivitätsindex	49
5	DISKUSSION	51
5.1	Änderung der Leistungsparameter	51
5.2	Auswirkungen auf die Thrombozytenfunktion	51
5.2.1	CD62P-Expression	53
5.2.2	Thrombozytenadhäsion	54
5.2.3	VASP-Phosphorylierung	55
5.2.4	Thrombozytenreaktivitätsindex	56
5.3	Schlussfolgerungen	57
6	ZUSAMMENFASSUNG	59
7	SUMMARY	61
8	LITERATURVERZEICHNIS	62
9	LEBENS LAUF	70

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Morphologie eines ruhenden Thrombozyten	6
Abbildung 2: Morphologie eines aktivierten Thrombozyten	6
Abbildung 3: Fünf Phasen der Plaqueprogression	13
Abbildung 4: Endotheliale Dysfunktion als erster Schritt der Atherogenese	18
Abbildung 5: Inflammation ist bei allen Phasen der Atherosklerose beteiligt	20
Abbildung 6: Hypothetisches Modell der durch Thrombozyten ausgelösten Atherogenese	23
Abbildung 7: Trainingsbedingte Änderung der $VO_2\text{max}$	41
Abbildung 8: Trainingsbedingte Änderung der $VO_2\text{max}$ bei Männern und Frauen	42
Abbildung 9: Basale CD62P-Expression vor und nach Training	43
Abbildung 10: CD62P-Expression vor und nach Training in Gegenwart unterschiedlicher ADP-Konzentrationen	44
Abbildung 11: CD62P-Expression vor und nach Training in Gegenwart unterschiedlicher PGE_1 -Konzentrationen	45
Abbildung 12: Adhäsion der Thrombozyten vor und nach Training	47
Abbildung 13: Sensitivität der VASP-Phosphorylierung vor und nach Training	48
Abbildung 14: Thrombozytenreaktivitätsindex vor und nach Training	50

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Epidemiologische Eckdaten – Übersicht über die Interventionsgruppe	39
Tabelle 2: Sportliche Aktivität vor und nach der Studienintervention	40
Tabelle 3: Leistungsparameter, gemessen zu Studienbeginn	40
Tabelle 4: Leistungsparameter, gemessen zu Studienende	42

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen umfassen eine Reihe von pathologischen Veränderungen des Herzens und der Blutgefäße, die sich klinisch als Herzinfarkt oder Schlaganfall manifestieren können. Sie stellen weltweit die mit Abstand häufigste Todesursache dar [WHO, 2007]. Der Großteil aller akuten Koronarsyndrome und der plötzlichen Herztode ist atherosklerotisch bedingt [NAGHAVI et al., 2003] und stellt somit neben der cerebrovaskulären Insuffizienz und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit die wichtigste klinische Manifestationsform der Atherosklerose dar. 2005 starben weltweit etwa 17,5 Millionen Menschen an den Folgen von kardiovaskulären Erkrankungen [WHO, 2007]. In Österreich verstarben 2007 32864 Personen (44% aller Verstorbenen) an Herz-Kreislauf-Krankheiten [STATISTIK AUSTRIA, 2008].

Die Atherosklerose ist eine chronisch-progrediente, entzündliche Erkrankung der Intima und des subintimalen Raumes von großen und mittelgroßen Arterien. Thrombozyten und deren Aktivierungszustand spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression von Atherosklerose. Die Thrombozytenfunktion wird physiologischerweise bei intakter Endothelwand dahingehend kontrolliert, dass die Adhäsion von Thrombozyten und (anderen) inflammatorischen Zellen an die Gefäßwand verhindert wird. Die ursprüngliche Annahme, dass Thrombozyten lediglich in einem späten Stadium der Atherosklerose, nämlich beim Übergang der stabilen atherosklerotischen Plaque zur komplexen Läsion eine Rolle spielen, ist mittlerweile als überholt anzusehen [LINDEMANN et al., 2007]. Tatsächlich spielen die Thrombozyten durch die Freisetzung von mitogenen und inflammatorischen Substanzen eine bedeutende Rolle, nicht nur bei der Progression sondern auch bei der Initiation der Erkrankung und werden über ihre hämostaseologischen Eigenschaften hinaus zunehmend als „Entzündungszellen“ wahrgenommen und verstanden [GAWAZ et al., 2008; MAY et al., 2008].

Zahlreiche Studien haben die Ursachen für kardiovaskuläre Erkrankungen untersucht und Risikofaktoren definiert: Risikofaktoren, welche die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen deutlich erhöhen und für die kausale bzw.

pathophysiologische Erklärungsansätze bestehen, sind Tabakkonsum, erhöhte LDL (low density lipoprotein = Lipoprotein mit geringer Dichte)-Werte, verringerte HDL (high density lipoprotein = Lipoprotein mit hoher Dichte)-Werte, hoher Blutdruck, erhöhte Blutglukosewerte, Physische Inaktivität, Übergewicht und ungesunde Ernährung [YUSUF et al., 2001]. Die wichtigsten modifizierbaren Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen sind somit Bewegungsmangel, Rauchen sowie eine ungesunde Ernährung [WHO, 2007].

Für Rauchen konnte eine starke Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit zum Herzinfarktrisiko gezeigt werden. Je mehr und je länger geraucht wird, desto größer ist das Risiko, eine kardiovaskuläre Erkrankung zu entwickeln [YUSUF et al., 2004]. Speziell für Frauen konnte in einer rezenten Arbeit dieser Sachverhalt eindrucksvoll gezeigt werden. Im Rahmen der „Nurses Health Study“ mit über 104000 Probandinnen konnte in Abhängigkeit von der Dauer und der Menge des Tabak-Konsums ein mehr als 3-fach höheres kardio-vaskuläres Risiko bei Raucherinnen gegenüber Nichtraucherinnen ermittelt werden [KENFIELD et al., 2008]. Rauchen führt zu einer systemischen inflammatorischen Reaktion des Organismus, wie in zahlreichen Studien nachgewiesen werden konnte. Diese ist auch durch eine Stimulation des hämatopoetischen Systems charakterisiert, eine Folge davon ist die vermehrte Ausschüttung von Leukozyten und Thrombozyten in den Blutkreislauf [YANBAEVA et al., 2007]. Neben einer Thrombozythämie konnte auch eine erhöhte Thrombozytenfunktion im Sinne einer gesteigerten Thrombozytenadhäsion und -aggregation bei Rauchern gezeigt werden [MACCALLUM, 2005].

Hingegen wird durch moderates Training die Thrombozytenaggregation und -adhäsion verringert [WANG et al., 1995]. Regelmäßige körperliche Aktivität und Training verzögert die Atherogenese und reduziert die Inzidenz der wichtigsten klinischen Manifestationsformen der Atherosklerose, der koronaren Herzkrankheit, der cerebrovaskulären Insuffizienz und der peripher arteriellen Verschlusskrankheit [THOMPSON et al., 2007]. Eine hohe kardiorespiratorische Fitness verringert die Wahrscheinlichkeit Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Bluthochdruck, Hypercholesterinämie und Diabetes zu entwickeln und reduziert damit die erhöhte Gesamtmortalität [WILLIAMS, 2008]. Es

besteht eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der physischen Aktivität und der Reduktion von kardiovaskulären Erkrankungen [HASKELL et al., 2007]. Auch bei Vorliegen multipler Risikofaktoren (wie z.B. Rauchen) wirkt sich ein aktiver Lebensstil positiv auf die Mortalität und das kardiovaskuläre Erkrankungsrisiko aus [WARBURTON et al., 2006].

Ziel dieser Studie war, die Auswirkung von aerobem Ausdauertraining auf thrombozytäre Funktions-Parameter bei Rauchern festzustellen. Untersucht werden sollte die Veränderung der Grundaktivierung der Thrombozyten sowie das Ansprechen der Thrombozyten gegenüber klassischen Agonisten (z.B.: ADP = Adenosindiphosphat) und Antagonisten (z.B.: PGE₁ = Prostaglandin E₁). Des Weiteren sollten Unterschiede des Adhäsions- und Aggregationsverhaltens der Thrombozyten untersucht werden. Weiters sollte die Steigerung der Leistungsfähigkeit spiroergometrisch durch Messung der maximalen Sauerstoffaufnahme erhoben und objektiviert werden.

2 LITERATURÜBERBLICK

2.1 Thrombozyten in physiologischen und pathologischen Prozessen

Thrombozyten (Blutplättchen) erfüllen im Körper wichtige physiologische Funktionen in der Blutstillung und bei der Wundheilung, sind jedoch auch an pathophysiologischen Prozessen wie der Atherosklerose / Atherothrombose beteiligt; v.a. im Rahmen inflammatorischer und immunologischer Prozesse [JURK und KEHREL, 2008].

2.1.1 Thrombozyten - Physiologie

Thrombozyten entstehen durch Fragmentierung von Megakaryozyten des Knochenmarks. Ein Drittel der Thrombozyten wird in der Milz gespeichert, die anderen zwei Drittel zirkulieren im Blut. Unter physiologischen Bedingungen liegt die Thrombozytenkonzentration im Blut bei 150 000 bis 450 000 Zellen/mm³. Thrombozyten haben einen Durchmesser von 2 - 4 µm und ein durchschnittliches Volumen von 6 - 8 Femtoliter. Nach einer mittleren Überlebensdauer von etwa 10 Tagen werden Thrombozyten von phagozytotischen Zellen entfernt [CHAER et al., 2006]. Unter physiologischen Bedingungen bei intakter Gefäßwand ruhen die Thrombozyten und werden ohne Interaktion mit anderen Zellen konvektiv durch die Blutgefäße transportiert. Diese ruhenden, nicht stimulierten Thrombozyten (dargestellt in Abbildung 1) haben eine diskoide Gestalt. Die Plasmamembran der Thrombozyten, eine Phospholipiddoppelschicht, ist von einer Glykokalix mit Rezeptoren für verschiedene Thrombozytenagonisten und -antagonisten umgeben. Unterhalb der Plasmamembran befinden sich Aktinfilamente, die über Filamin mit dem Glykoprotein Ib der Plasmamembran verbunden sind.

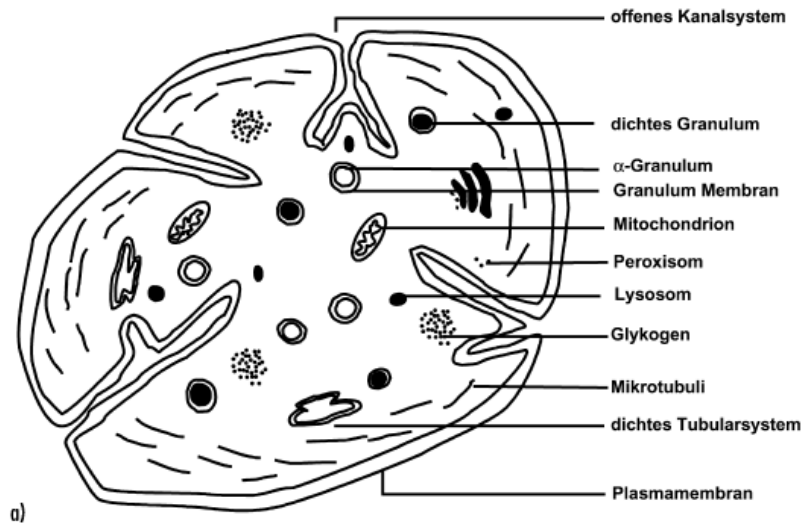


Abbildung 1: Morphologie eines ruhenden Thrombozyten [KEHREL, 2003]

Bei Aktivierung, zum Beispiel durch eine Gefäßverletzung ausgelöst, wird das Filamin durch Calpain gespalten, die Thrombozyten verlieren ihre diskoidale Gestalt und bilden Pseudopodien aus (siehe Abbildung 2) [KEHREL, 2003].

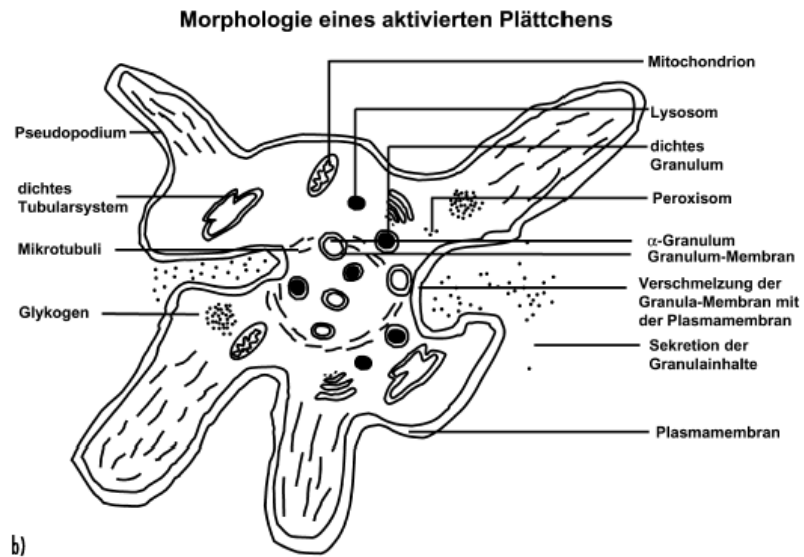


Abbildung 2: Morphologie eines aktivierten Thrombozyten [KEHREL, 2003]

Bei dieser Umstrukturierung der Aktinfilamente, welche für verschiedene hämostatische Prozesse von großer Bedeutung ist, spielen unter anderem Ena/VASP - Proteine (vasodilator stimulated phosphoproteine = Vasodilator-

stimuliertes Phosphoprotein) eine wichtige Rolle. Sie werden zu großen Proteinkomplexen, die Aktinfilamente mit der extrazellulären Matrix verbinden (so genannte fokale Adhäsionskomplexe), rekrutiert und durch (De-)Phosphorylierung reguliert. Ena/VASP - Proteine erfüllen nicht nur bei der Thrombozytenaktivierung (dem so genannten „shape change“ der Thrombozyten), sondern auch bei Adhäsion, Migration und Interaktionen zwischen den Zellen eine wichtige Funktion [PULA und KRAUSE, 2008].

Thrombozyten haben keinen Zellkern, jedoch eine Vielzahl anderer Zellorganellen, darunter drei Arten sekretorischer Granula: Lysosomen, alpha-Granula und dense bodies (elektronendichte Körperchen). In den am häufigsten vorkommenden alpha-Granula befinden sich Fibrinogen, Zytokine und Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF (platelet-derived growth factor). Dense bodies enthalten ADP, Serotonin und Kalzium. Thrombozyten haben zwei verschiedene Kanalsysteme: ein mit der Oberfläche verbundenes, offenes Kanalsystem sowie ein geschlossenes Kanalsystem (DTS = dense tubular system) [MCNICOL und ISRAELS, 2003].

2.1.2 Die Hämostase - Blutstillung

Die Hämostase ist ein wichtiger Prozess, der den Blutfluss regelt und bei Gefäßverletzung durch Bildung eines Thrombus einen potentiellen Blutverlust verhindert oder zumindest reduziert. Die drei Phasen der Hämostase – primäre Hämostase, sekundäre Hämostase (Koagulation) und Fibrinolyse – sind eng miteinander verknüpft und komplex reguliert [LASNE et al., 2006].

2.1.2.1 Primäre Hämostase

Die primäre Hämostase wird sofort nach dem Auftreten eines Gefäßwanddefektes initiiert. Zur Vermeidung größerer Blutverluste ist sie für den menschlichen Organismus von großer Bedeutung [CHAER et al., 2006].

Bei einer Gefäßverletzung kontrahiert sich die Gefäßwand und gleichzeitig heften sich Thrombozyten an die subendotheliale Matrix an. Die Thrombozyten können danach an verschiedene Strukturen des exponierten Subendothels

binden, wie etwa den vWF (von-Willebrand-Faktor), ein Ligand des Thrombozyten-Rezeptors GPIIb-IX, Fibronectin oder Kollagen. Der Thrombozyten-adhäsion folgt die Aktivierung der Thrombozyten; sie verlieren ihre diskoidale Gestalt und bilden Pseudopodien aus. Die Thrombozytengranula sezernieren ihre Inhaltsstoffe, welche verschiedene Funktionen erfüllen: ADP, vWF, Fibrinogen und Thrombospondin verstärken die Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Faktor V und Fibrinogen sind an der Blutgerinnung, der sekundären Hämostase beteiligt. Serotonin verstärkt die Gefäßkontraktion und PDGF fördert Zellproliferation und -migration und damit die Wundheilung. Aktivierte Thrombozyten synthetisieren zudem Moleküle wie Thromboxan A₂ und den Thrombozyten-Aktivierungs-Faktor, die an spezifische Rezeptoren anderer Thrombozyten binden und so zu weiterer Thrombozytenrekrutierung führen. Von Bedeutung ist eine Konformationsänderung des GPIIb-IIIa - Rezeptors nach Aktivierung der Thrombozyten. Diese Konformationsänderung ermöglicht die Bindung von Fibrinogen, welches benachbarte Thrombozyten verknüpft und zur Thrombozytenaggregation führt. Zugleich präsentieren die Thrombozyten negativ geladenen Phosphatidylserine an die Außenseite ihrer Membran, was für die Funktion der sekundären Hämostase von Bedeutung ist [LASNE et al., 2006].

2.1.2.2 Sekundäre Hämostase - Koagulation (Gerinnung)

Die Gerinnungskaskade wird durch die Exposition von Gewebethromboplastin (Faktor III, Tissue factor - TF) und die Bildung des TF/Faktor VII – Komplexes ausgelöst. Dieser aktiviert Faktor X und wandelt geringe Mengen Prothrombin in Thrombin um. Thrombin fördert gemeinsam mit Blutkalzium und anionischen Phospholipiden der Thrombozyten durch positive Feedback-Prozesse die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren XI, IX, VIII und V sowie die Plättchenaktivierung. Die Gerinnungsfaktoren heften sich gleichzeitig an die Thrombozytenoberfläche an, wo eine sehr rasche Aktivierung und Vermehrung auftritt. Nun werden große Mengen des Faktor X aktiviert und Prothrombin wird zu Thrombin umgewandelt. Thrombin bewirkt die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, welches letztendlich mit Unterstützung des Faktor XIIIa (der zuvor

Thrombin-vermittelt aktiviert wurde) ein stabiles Fibrinnetzwerk bildet und damit die Entstehung eines irreversiblen Thrombus ermöglicht [PEREZ-GOMEZ und BOVER, 2007].

2.1.2.3 Fibrinolyse

Nach der Aktivierung des Gerinnungssystems wird normalerweise auch die Fibrinolyse, ein hochkontrollierter enzymatischer Prozess, der zur Auflösung des stabilen Thrombus führt, aktiviert. Am Fibrin des stabilen Thrombus ist Plasminogen gebunden, welches durch Plasminogenaktivatoren wie Gewebs-Plasminogen-Aktivator oder Urokinase-Plasminogen-Aktivator gespalten werden kann. Das dabei entstehende Plasmin führt zur Proteolyse von Fibrin und es kommt zum Abbau des Thrombus [LASNE et al., 2006].

2.2 Atherosklerose / Atherothrombose

Die Atherosklerose ist eine chronisch-progrediente, entzündliche Erkrankung der Intima und des subintimalen Raumes von großen und mittelgroßen Arterien. Es kommt zum Auftreten umschriebener Läsionen, der so genannten atherosklerotischen Plaque (Atherom), welche generalisiert im arteriellen Gefäßsystem auftreten können und somit sowohl das kardiovaskuläre, als auch das cerebrovaskuläre und peripher arterielle System betreffen [MEADOWS und BHATT, 2007; VORCHHEIMER und BECKER, 2006]. Sie ist eine progressive Erkrankung, deren Kardinalereignisse die atherosklerotische Plaquebildung, Disruption und Thrombenbildung darstellen. Die Atherosklerose beginnt bereits in früher Kindheit und schreitet im frühen Erwachsenenalter meist asymptomatisch voran [VILES-GONZALEZ et al., 2004]. Auf Basis einer Größenprogredienz der stabilen atherosklerotischen Läsion kommt es zu einer zunehmenden Stenosierung des intravasalen Lumens und in weiterer Folge zu den klinischen Manifestationsformen der Atherosklerose. Abhängig vom betroffenen Organstromgebiet kommt es zu einer stabilen Angina pectoris bei Stenosierung der Herzkranzgefäße, zu einer cerebrovaskuläre Insuffizienz bei Karotisstenose oder einer peripher arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK) bei atherosklerotischen Läsionen der Beinarterien.

Als Schlüsselereignis der Umwandlung einer stabilen atherosklerotischen Läsion in eine instabile Läsion kommt es zur Ruptur der Plaque mit Freisetzung thrombotischen Materials und konsekutiver Entstehung eines Thrombus auf der Läsion. Der auf diesem Prozess basierende Terminus der Atherothrombose kann dann schließlich zu den lebensbedrohlichen Krankheitsbildern wie dem ACS (acute coronary syndrom = akuten Koronarsyndrom), dem ischämischen Schlaganfall oder der TIA (transient ischaemic attack = transienten ischämischen Attacke) sowie einer PAD (peripheral arterial disease = Beinischämie) führen [KIKANO und BROWN, 2007].

An atherosklerotisch bedingten kardiovaskulären Erkrankungen versterben jährlich mehr als 19 Millionen Menschen [NAGHAVI et al., 2003]. In den so genannten Industrieländern stellen die klinischen Manifestationen der akuten

Atherothrombose wie Herzinfarkt und Schlaganfall mit etwa 44% aller Todesfälle [STATISTIK AUSTRIA, 2008] die häufigste Mortalitäts- und Morbiditätsursache dar, Tendenz steigend [MEADOWS und BHATT, 2007]. Vor allem sozial schwache Schichten sind von kardiovaskulären Krankheiten betroffen. In Entwicklungsländer und Schwellenländer steigt die Zahl der atherosklerotischen Erkrankungen ebenfalls stark an, vermutlich als Folge der Urbanisierung und Zunahme der modifizierbaren Risikofaktoren wie Adipositas, Diabetes und Bluthochdruck [YUSUF et al., 2001]. Weltweit haben die Atherosklerose / Atherothrombose nicht nur schwere individuelle gesundheitliche Auswirkungen, sondern verursachen auch einen hohen ökonomischen Schaden. Die WHO (World Health Organisation = Weltgesundheitsorganisation) schätzt, dass 2015 beinahe 20 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen, hauptsächlich an Herzinfarkt und Schlaganfall, sterben werden [WHO, 2007].

2.2.1 Hypothesen zur Atherogenese

Der Begriff Atherosklerose wurde von Felix Marchand 1904 eingeführt, der sie für beinahe alle obstruktiven Prozesse der Arterien verantwortlich sah [MEHTA und KHAN, 2002]. Im Laufe der Erforschung der Atherogenese wurden viele verschiedene Hypothesen entwickelt und trugen zum Verständnis dieses komplexen Prozesses bei. Die wichtigsten seien im Folgenden kurz beschrieben:

Nikolai N. Anichkov konnte 1913 im Tierversuch an Ratten erstmals zeigen, dass Cholesterin atherosklerotische Veränderungen der Intima verursachen kann [ANICHKOV und CHALATOV, 1913]. Die „response-to-retention“ Hypothese wird dieser Beobachtung gerecht und beschreibt die Interaktionen zwischen Lipoproteinen und der Matrix als kritisches Ereignis in der frühen Atherosklerose [WILLIAMS und TABAS, 1995]. Die „response-to-injury“ Hypothese von Ross et al. stellt als auslösendes Ereignis der Atherosklerose die Schädigung des arteriellen Endothels in den Vordergrund. Ross et al. heben auch die Schlüsselfunktion der Thrombozyten bei der Entwicklung der atherosklerotischen Läsionen durch die Stimulation der Proliferation der glatten Muskelzellen der Intima hervor [ROSS et al., 1977]. Steinberg et al. formulierten erstmals die „oxidative modification“ Hypothese, welche die Oxidation von LDL in den Mittelpunkt des atherosklerotischen Geschehens und der Atherogenese stellt: nicht native LDL wirken atherosklerotisch, sondern erst oxidierte LDL führen zur Schaumzellenbildung [STEINBERG et al., 1989]. Das aktuelle „oxidative response to inflammation“ Modell von Stocker und Keaney baut auf den beschriebenen Hypothesen auf und ermöglicht ein Zusammenführen der bisherigen Erklärungsansätze indem es das inflammatorische Geschehen als primären Prozess und oxidativen Stress als sekundäres Ereignis der Atherogenese betrachtet [STOCKER und KEANEY, 2004].

Obwohl die einzelnen Hypothesen unterschiedliche Ereignisse als auslösenden Faktor sehen, weisen sie doch Gemeinsamkeiten auf: Jede spricht dem entzündlichen Geschehen eine wichtige Rolle zu und auch LDL als zentrales Element ist bei allen vertreten.

Heute gilt als gesichert, dass die Atherosklerose eine inflammatorische Erkrankung ist [ROSS, 1999], die ein prooxidatives Umfeld bildet, welches die Basis für oxidative Schädigungen im subintimalen Raum darstellt.

2.2.2 Klassifikation atherothrombotischer Läsionen

Nach einer Modifikation und Vereinfachung der Kriterien des Komitees für vaskuläre Läsionen der AHA (American Heart Association) [STARY et al., 1992; STARY et al., 1995; STARY et al., 1994] kann die Plaqueprogression in fünf Phasen unterteilt werden [CORTI et al., 2004; FUSTER et al., 2005], wie in Abbildung 3 gezeigt.

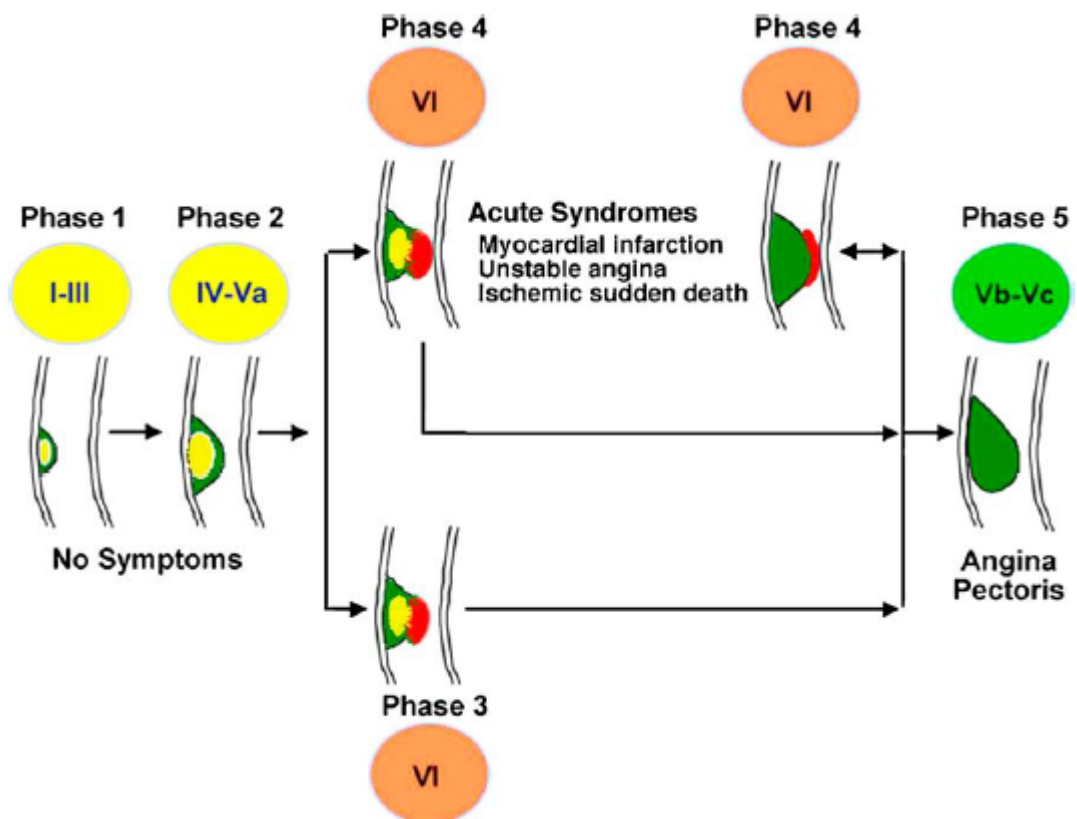


Abbildung 3: Fünf Phasen der Plaqueprogression

Modifizierte AHA Klassifikation der Morphologie von Läsionen der koronaren Atherosklerose [CORTI et al., 2004]

2.2.2.1 Phase 1 (früh)

Die Läsionen sind klein, kommen häufig bei jungen Menschen vor und können in drei Typen kategorisiert werden [FUSTER et al., 2005]:

Die initialen (Typ I) Läsionen enthalten ausreichend atherogene Lipoproteine um eine Ansammlung der Makrophagen und die Bildung von Schaumzellen (Makrophagen gefüllt mit Lipidtröpfchen) zu verursachen. Sie sind der einzige Läsionstyp der bei Kindern auftritt, können aber auch bei Erwachsenen vorkommen.

Typ II Läsionen bestehen hauptsächlich aus Schaumzellen, die in benachbarten Gebieten auftreten, und glatten Muskelzellen der Intima, die reich an Lipidtröpfchen sind. Typ II Läsionen beinhalten auch die so genannten fatty streaks, welche als gelbe Streifen oder Flecken auf der Oberfläche der Arterienintima sichtbar sind.

Typ III Läsionen bestehen aus glatten Muskelzellen, welche von extrazellulärem Bindegewebe, Fibrillen und Lipidablagerungen umgeben sind. Sie werden auch als Intermediärläsionen oder Präatheroma bezeichnet und bilden eine morphologische und chemische Brücke zwischen Typ II Läsionen und Atheroma (Typ IV Läsionen).

Die Läsionen des Typs I - III sind stille Präkursoren für mögliche zukünftige Erkrankungen [STARY et al., 1994].

2.2.2.2 Phase 2 (fortgeschritten)

Fortgeschrittene Läsionen sind solche, die nicht notwendigerweise hämodynamisch wirksam sind, aber aufgrund ihres hohen Lipidgehalts, ausgeprägtem inflammatorischen Geschehens und dünner fibröser Kappe anfällig für Rupturen sind. Sie umfassen die Läsionen des Typs IV und Va [CORTI et al., 2004].

Typ IV Läsionen (Atheroma) weisen ausgedehnte, aber klar abgegrenzte Ansammlungen von extrazellulären Lipiden, den so genannten Lipidkern („lipid core“) auf. Dieser charakteristische Lipidkern führt zu einer starken Desorganisation der Intima und einer Verdickung der Arterienwand, weshalb Typ IV Läsionen als fortgeschritten gelten. Die Intima beinhaltet zwischen dem Lipid-

kern und der Endotheloberfläche Makrophagen, glatte Muskelzellen, die teilweise Lipidtröpfchen eingeschlossen haben, aber auch Lymphozyten und Mastzellen. Die Bildung von fibrösem Gewebe wird verstärkt. In der Umgebung der Läsion finden sich vermehrt Makrophagen, Schaumzellen und Lymphozyten. Dadurch sind die Läsionen vulnerabel und rupturanfällig, auch wenn sie noch keine starken Gefäßverengungen hervorrufen [STARY et al., 1995].

Typ Va Läsionen (Fibroatheroma) sind Läsionen, bei denen sich neues fibröses Bindegewebe um eine Läsion mit Lipidkern gebildet hat. Sie können mehrfach geschichtet sein: Verschiedene Lipidkerne sind durch dicke, fibröse Bindegewebsschichten getrennt und liegen unregelmäßig übereinander. Man spricht auch von „multilayered fibroatheroma“ [STARY et al., 1995].

Plaques der Phase 2 können sich zu Plaques der akuten Phase 3 oder 4 entwickeln [CORTI et al., 2004].

2.2.2.3 Phase 3

Plaques der Phase 3 bestehen aus akuten „komplizierten“ Typ VI Läsionen, die aus rupturierten (Typ IV oder Va) oder erodierten Läsionen entstehen und zu einem nicht-obstruktiven Wandthrombus führen. Dieser Prozess verläuft klinisch unauffällig, kann jedoch zu einem Gefäßverschluss führen [CORTI et al., 2004].

2.2.2.4 Phase 4

Läsionen der Phase 4 sind durch Typ VI Läsionen mit okklusiver Thrombose gekennzeichnet und können zu einem akuten Koronarsyndrom führen, wobei sie nicht selten still verlaufen [FUSTER et al., 2005].

2.2.2.5 Phase 5

Diese Läsionen umfassen solche des Typs Vb (kalzifizierte) und Typ Vc (fibröse), die Angina pectoris verursachen, aber auch still verlaufen können sofern zuvor ein Kollateralkreislauf bestand [FUSTER et al., 2005].

Läsionen des Typs Vb sind Läsionen, bei denen die Mineralisation eine dominante Rolle einnimmt. Sie enthalten eine große Menge an Calcium und weisen wie Typ Va Läsionen vermehrt fibröses Bindegewebe auf.

Bei Typ Vc Läsionen ist die normale Intima durch fibröses Bindegewebe ersetzt und verdickt. Lipide sind in diesen Läsionen nur gering oder gar nicht vorhanden [STARY et al., 1995].

Die Wahrscheinlichkeit einer Plaqueruptur scheint vor allem von zwei Faktoren abhängig zu sein: Der Größe des Lipidkerns und der Dicke der fibrösen Kappe. Plaques mit dünner fibröser Kappe werden als thin-cap fibroatheroma (TCFA) bezeichnet. Wenn auch nur ein kleiner Teil der fibrösen Kappe reißt besteht Lebensgefahr. Etwa 75% aller schwerwiegenden koronaren Thromben die zu Myokardinfarkt oder Tod führen sowie zirka 90% aller karotischen Thromben die einen ischämischen Schlaganfall auslösen sind durch Plaqueruptur verursacht [THIM et al., 2008].

2.2.3 Endotheliale Dysfunktion

Heute wird vor allem die endotheliale Dysfunktion als initiales Ereignis der Atherogenese gesehen [CORTI et al., 2004; FAXON et al., 2004; HADI et al., 2005]. Dies stellt eine Weiterentwicklung der „response-to-injury“ Hypothese von Ross et al. dar, der – wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben – endotheliale Denudation als ersten Schritt der Atherogenese sah [ROSS, 1999].

Das vaskuläre Endothel ist für eine Vielzahl physiologischer Prozesse von Bedeutung: Es reguliert den Stoffaustausch zwischen Gewebe und Blut sowie den Blutdruck, ist Nährstofflieferant aber auch Entsorger von Abfallprodukten und spielt bei Entzündung, Thrombose und Hämostase eine wichtige Rolle. Hauptsächlich geschieht die Regulation dieser Vorgänge über die Produktion autokriner und parakriner Mediatoren wie NO (Stickstoffmonoxid), Prostaglandine, Endothelin und Angiotensin II [FAXON et al., 2004]. Endotheliale Dysfunktion ist durch eine Reduktion der Bioverfügbarkeit von Vasodilatoren, im Besonderen von Stickstoffmonoxid, und/oder einem Anstieg von Vasokonstriktoren gekennzeichnet. Es kommt zur Vasokonstriktion – ein funktionelles Charakteristikum endothelialer Dysfunktion. Stickstoffmonoxid schützt unter physiologischen Bedingungen vor Gefäßschädigung, Inflammation und Thrombose. Es verhindert die Extravasation von Leukozyten durch eine Hemmung der Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle, verhindert die Proliferation der glatten Muskelzellen der Intima und begrenzt die Thrombozytenaggregation [SZMITKO et al., 2003]. Endotheliale Dysfunktion (vereinfacht dargestellt in Abbildung 4) führt somit zur Reduktion dieser antimigratorischen, antiinflammatorischen, antiaggregatorischen und antiproliferativen Effekte von Stickstoffmonoxid [BONETTI et al., 2003]. Die gleichzeitige endotheliale Aktivierung [HADI et al., 2005] steigert die Adhäsivität von Leukozyten und Thrombozyten sowie die Endothelpermeabilität [JURK und KEHREL, 2008].

Durch die erhöhte Permeabilität des Endothels wird die Einwanderung von Lipoproteinen in die Intima erleichtert und die Lipidretention erhöht. Besonders durch freie Radikale oxidierte LDL werden von Endothelzellen und

Makrophagen rasch aufgenommen. Der Prozess der Atherogenese wird weiter vorangetrieben [MALLIKA et al., 2007].

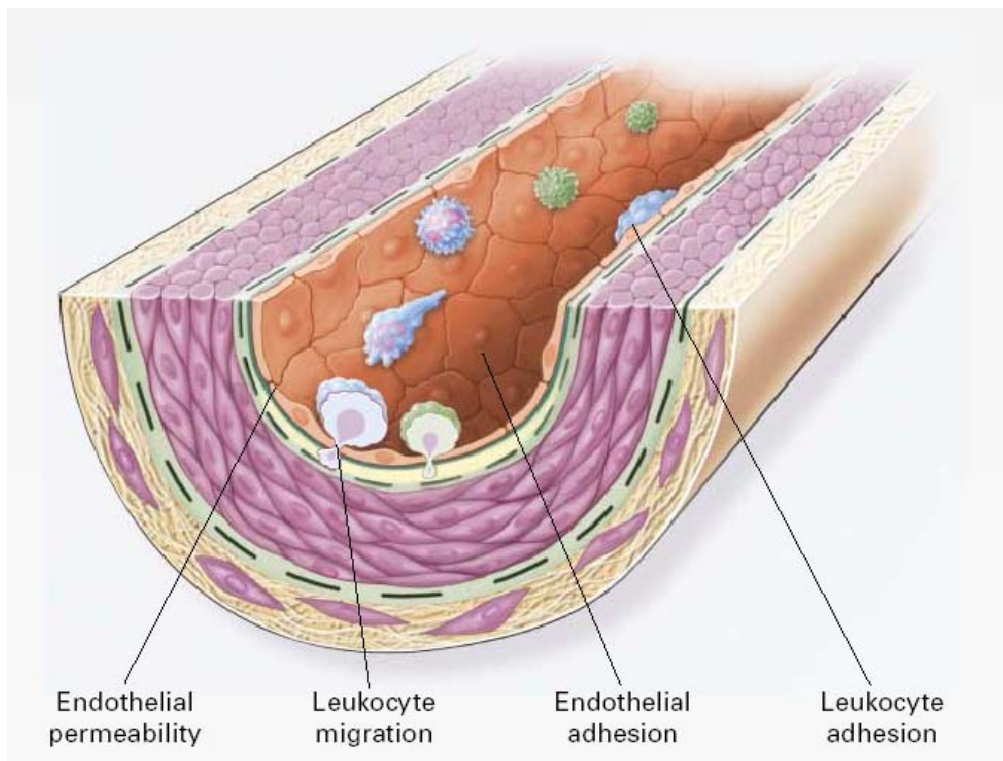


Abbildung 4: Endotheliale Dysfunktion als erster Schritt der Atherogenese

Durch gesteigerte Endothelpermeabilität, vermittelt durch Prostazykline, PDGF, Endothelin und Angiotensin II, können Plasmabestandteile wie z.B. Lipoproteine leichter in die Intima eindringen. Durch gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen können sich Leukozyten leichter am Endothel anhaften und migrieren schließlich in die Gefäßwand [ROSS, 1999].

2.2.4 Inflammation

Inflammation ist bei allen Stadien der Atherogenese von Bedeutung, sowie bei der Initiation und der Progression der Atherothrombose. Sammeln sich geringe Mengen oxidierter LDL in der arteriellen Gefäßwand an, werden endotheliale Zellen zur Produktion proinflammatorischer Moleküle, wie Adhäsionsmolekülen, chemotaktischen Proteinen und Wachstumsfaktoren, angeregt. Dies bewirkt die Rekrutierung von Monozyten an der Gefäßwand. Oxidierte LDL inhibieren zudem die Produktion von Stickstoffmonoxid, mit all den schon in Kapitel 2.2.3 genannten Auswirkungen. Neben oxidierten LDL können auch viele andere Faktoren, wie z.B. hämodynamische Kräfte, erhöhte Homocysteinwerte,

Sexualhormone, Diabetes oder Infektionen proinflammatorisch wirken [LUSIS, 2000]. Endotheliale Leukozyten-Adhäsionsmoleküle, zu denen P- und E-Selektine gehören, binden an zirkulierende Leukozyten (wie Monozyten und T-Zellen), welche nun auf der Endotheloberfläche rollen. Die Regulation der endothelialen Adhäsionsmoleküle erfolgt vor allem über ihre Transkription: Der „zentrale Transkriptionsfaktor der Inflammation“, NFκB (= nuclear factor κB) wird aufgrund von proinflammatorischen Zytokinen, die an Endothelrezeptoren binden, verstärkt exprimiert. Eine feste Bindung der Leukozyten mit dem Endothel wird durch Interaktionen von Immunglobulin-like Molekülen des Endothels, z.B. ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1 = interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1 = vasculäres Zelladhäsionsmolekül-1), mit Integrinen auf der Leukozytenoberfläche ermöglicht. Chemotaktische Faktoren (z.B. MCP = Monozyten-chemotaktisches Protein) bewirken eine Auswanderung der Leukozyten in die Intima. Das Chemokin MCP-1 fördert die Rekrutierung von Monozyten und T-Zellen und wird in allen Phasen der Atherosklerose exprimiert [HANSSON, 2001]. Die aktivierten Leukozyten setzen proteolytische Enzyme, Zytokine und Peptid-Wachstumsfaktoren frei. Diese bauen Matrixproteine ab und stimulieren glatte Muskelzellen, Endothelzellen und Makrophagen [FAXON et al., 2004]. Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen wird durch den M-CSF (macrophage colony stimulating factor = Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor), ein Zytokin, vermittelt. M-CSF bewirkt auch eine vermehrte Expression von Scavenger-Rezeptoren auf den Makrophagen, die nun modifizierte Lipoproteine wie z.B. oxidierte LDL durch Endozytose aufnehmen können. Die Ansammlung der Cholesterinester im Zytoplasma führt zur Umwandlung der Makrophagen in Schaumzellen. Gleichzeitig kommt es zu einer Proliferation von Makrophagen durch die Sekretion zahlreicher Wachstumsfaktoren und Zytokine wie TNFα (tumor necrosis factor α = Tumornekrosefaktor α) und IL 1β (Interleukin 1β), wodurch es zu einem Fortschreiten der Atherogenese kommt [PACKARD und LIBBY, 2008].

Eine Synopsis über das entzündliche Geschehen der Atherosklerose liefert Abbildung 5.

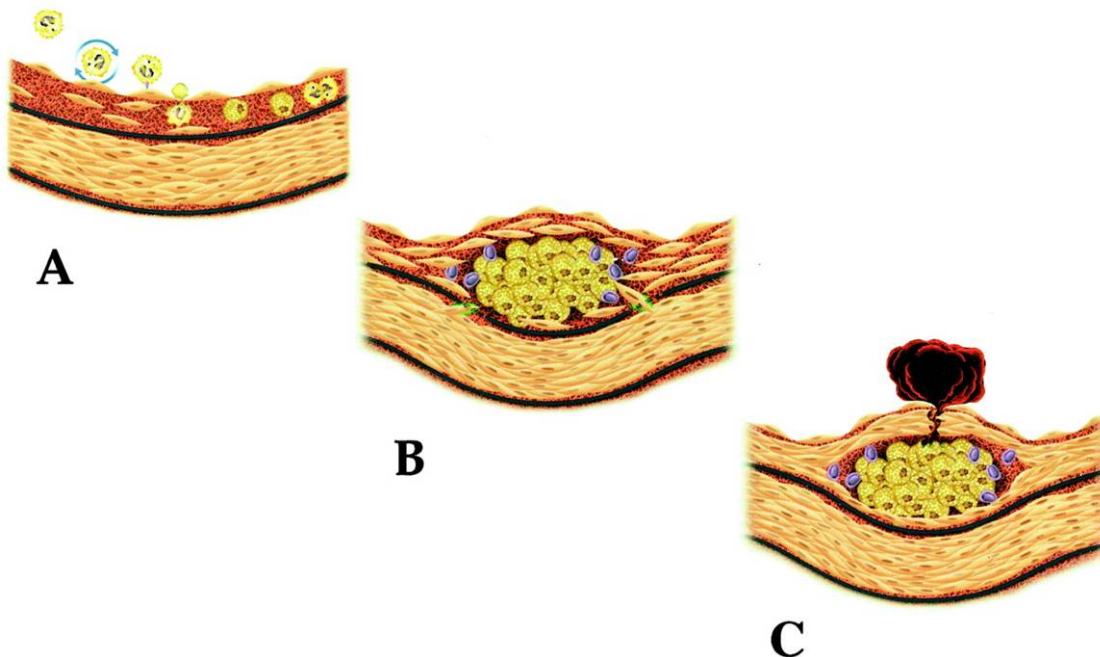


Abbildung 5: Inflammation ist bei allen Phasen der Atherosklerose beteiligt

A Rekrutierung von Leukozyten an eine entstehende atherosklerotische Läsion
Leukozyten binden über Liganden an Adhäsionsmoleküle des entzündeten Endothels. Selektine ermöglichen das Rollen entlang des Endothels, Integrine die festere Bindung. Proinflammatorische Zytokine, die im Atherom exprimiert werden, bewirken die Migration der Leukozyten in die Intima. Inflammatorische Mediatoren wie M-CSF können die Expression von Makrophagen-Scavenger-Rezeptoren erhöhen, was zu erhöhter Aufnahme von modifizierten Lipoproteinen und Bildung lipidgefüllter Makrophagen führt. Mediatoren wie M-CSF können darüber hinaus die Replikation der Makrophagen in der Intima fördern.

B T-Zellen wandern während der Läsionsentwicklung ebenfalls in die Intima ein. Diese Leukozyten sezernieren wie Endothelzellen Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche die Migration und Proliferation der SMCs (smooth muscle cells) vorantreiben. Diese exprimieren Enzyme, die in Folge einer inflammatorischen Stimulation Elastin und Kollagen abbauen können. Durch den Abbau der arteriellen extrazellulären Matrix wird das Eindringen der SMC in die elastische Lamina und kollagene Matrix der wachsenden Plaque ermöglicht.

C Inflammatorische Mediatoren können die Kollagensynthese stoppen und die Expression von Kollagenasen durch Schaumzellen in der Intima hervorrufen. Es kommt zum Abbau des Kollagens, die fibröse Kappe wird dünn und rupturgefährdet. Cross-talk zwischen T-Lymphozyten und Makrophagen erhöht die Expression des Gerinnungsfaktors TF. Rupturiert die Plaque, wie hier gezeigt, so bedingt jener Thrombus die meisten akuten Komplikationen, der durch TF in Folge einer inflammatorischer Kaskade entstanden ist [LIBBY et al., 2002].

2.2.5 Rolle der Thrombozyten in der Atherogenese

Thrombozyten spielen nicht nur bei der Progression und akuten Ereignissen, sondern auch, wie neue Studien zeigen konnten, bei der Initiation der Atherothrombose eine wichtige Rolle [DAUB et al., 2007; DOLE et al., 2005; GAWAZ et al., 2008; MASSBERG et al., 2002]. Zusätzlich gibt es eine wachsende Zahl an Daten, die die Bedeutung der Thrombozyten in der Regeneration unterstreicht [LANGER und GAWAZ, 2008].

Thrombozyten können wie Leukozyten an das intakte, entzündete Endothel adhären. Zunächst rollen sie – vermittelt durch das Adhäsionsmolekül P-Selektin (auch bekannt als CD62P, frühere Bezeichnungen: GMP-140 oder PADGEM Protein) - am aktivierten Endothel [FURMAN et al., 1998]. Diese lose Thrombozyten-Endothel-Bindung entsteht durch Interaktion der thrombozytären Oberflächenrezeptoren GPIb α (Glykoprotein Ib α) und PSGL-1 (platelet p-selectin glycoproteine ligand 1) mit endotheliale P-Selektin [GAWAZ et al., 2005]. Für die Thrombozytenadhäsion von großer Bedeutung ist vWF, besonders in Gefäßen, in denen hohe Scherkräfte wirken, wie Arterien und Arteriolen. Sowohl P-Selektin als auch vWF werden in den so genannten Weibel-Palade-bodies der Endothelzelle [WAGNER und BURGER, 2003] und den α -Granula von Thrombozyten gespeichert, vWF findet sich auch im Blutplasma. Über GPIb - vWF können die Thrombozyten vor allem in Rahmen von Verletzungen mit subendotheliale Kollagen interagieren. Allerdings kommt es bei hohen Scherkräften auch zu einem direkten, wenn auch losen Kontakt der Thrombozyten mit dem Endothel, vermittelt via vWF („Rollen“ der Thrombozyten) [VARGA-SZABO et al., 2008]. GPIIb/IIIa (auch Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ genannt) kann ebenfalls über GPIb durch vWF aktiviert werden [FUSEGAWA et al., 1999]. Sowohl P-Selektin als auch der GPIIb/IIIa-Komplex werden durch VASP reguliert, das damit eine wichtige Funktion in der Thrombozytenadhäsion und der Atherogenese hat [MASSBERG et al., 2004]. Phosphorylierung von VASP, ausgelöst z.B. durch erhöhte Bioverfügbarkeit von NO im Blut [PULA und KRAUSE, 2008], inhibiert die Aktinpolymerisation, verhindert so die Aktivierung der Thrombozyten [HARBECK et al., 2000] und steht mit einer

Hemmung der Thrombozytenaggregation in Verbindung [HORSTRUP et al., 1994].

Während die Thrombozyten entlang der Gefäßwand rollen, werden sie aktiviert und können an viele Oberflächen adhären. Durch Bindung an Integrine (weitere u.a. endotheliale Adhäsionsmoleküle) entsteht eine feste Adhäsion, die Thrombozyten werden maximal aktiviert, verlieren ihre diskoide Gestalt und bilden Pseudopodien aus [LINDEMANN et al., 2007]. Der aktivierte GPIIb/IIIa-Komplex bindet an Fibrinogen, vWF, Fibronectin, Vitronectin und ist damit für die Thrombozytenaggregation von großer Bedeutung [BENNETT, 2005; BODARY et al., 1989]. Die im Rahmen des inflammatorischen Geschehens aktivierten Endothelzellen exprimieren an der Oberfläche ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin, P-Selektin und setzen die Chemokine MCP-1, IL-8 (Interleukin-8) und andere frei [LINDEMANN et al., 2007]. Neben dem endothelialen P-Selektin, das für das Wachstum atherosklerotischer Läsionen entscheidend ist, exprimieren auch aktivierte Thrombozyten P-Selektin, welches zur Entwicklung atherosklerotischer Läsionen beiträgt [BURGER und WAGNER, 2003]. Aktivierte Thrombozyten und Endothelzellen exprimieren außerdem beide das Chemokin SDF-1 (stromal-derived factor-1), welches die Adhäsion von Progenitorzellen an die Oberfläche arterieller Thromben unterstützt [MASSBERG et al., 2006], das inflammatorische Zytokin IL-1 β und (zunächst) an der Oberfläche CD40L (CD40 ligand). RANTES und ENA-78 werden ausschließlich von Thrombozyten freigesetzt [LINDEMANN et al., 2007]. Ein hypothetisches Modell der durch Thrombozyten ausgelösten Atherogenese von Gawaz et al zeigt Abbildung 6.

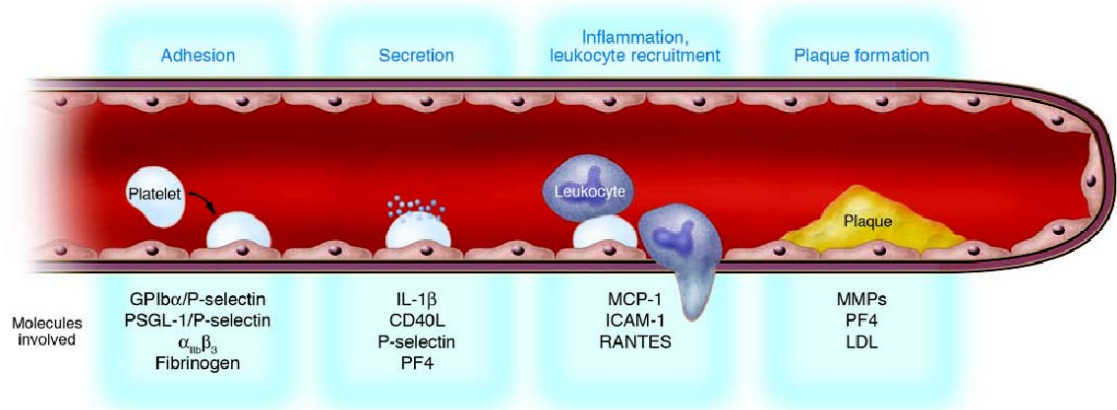


Abbildung 6: Hypothetisches Modell der durch Thrombozyten ausgelösten Atherogenese

Aktivierte Thrombozyten rollen entlang des Endothels via GPIIb/IIIa/P-Selektin oder PSGL-1/P-Selektin. Danach adhären die Thrombozyten via Integrine fester an das vaskuläre Endothel und setzen proinflammatorische Komponenten (IL-1β, CD40L) frei. Adhärenzte Thrombozyten rekrutieren zirkulierende Leukozyten, binden und aktivieren sie durch Rezeptorinteraktionen und parakrine Stoffwechselwege. Schließlich initiieren sie Leukozytentransmigration und Bildung von Schaumzellen. Thrombozyten bilden somit die Basis für Plaqueentstehung bevor ein Gefäßverschluss durch Thrombose in Folge von Plaqueruptur erfolgt [GAWAZ et al., 2005].

Aktivierte Thrombozyten lösen also bei verschiedenen Zellen der Gefäßwand eine Sekretion von Chemokinen aus. Es kommt zu einer Signalkaskade: Chemokine wie SDF-1α (stromal derived-factor-1α) oder Fractalkin (CX3CL1) verstärken im Sinne eines positiven Feed-back-Mechanismus die Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation, die von zumindest geringen Mengen primärer Agonisten wie ADP, Kollagen oder Thrombin abhängig ist. Die Rekrutierung vaskulärer Zellen mit atherogenen Wirkungen wird gesteigert [WEBER, 2005]. Das thrombozytäre Chemokin PF4 (Platelet-factor 4) verhindert den Abbau von LDL, was die Lipoproteinaggregation, -oxidation und die Bildung von Schaumzellen erleichtert [SACHAIS et al., 2002]. PF4 bewahrt Monozyten vor deren Abbau, bewirkt deren Transformation zu Makrophagen und löst die Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus [KASPER et al., 2007]. RANTES ist für die Entwicklung der Atherosklerose von großer Bedeutung. Es fördert z.B. P-Selektin abhängig die Monozytenaktivierung [SCHOBER et al., 2002]. Durch aktivierte Thrombozyten rekrutierte Monozyten binden an das entzündete Endothel und können in die Intima einwandern, wo ihre Umwandlung zu Makrophagen und schließlich zu Schaumzellen stattfindet [LINDEMANN et

al., 2007]. Durch Adhäsion der Thrombozyten am Endothel wird auch die Rekrutierung von Leukozyten verstärkt, was die Initiation der Atherogenese maßgeblich fördert [MASSBERG et al., 2002]. Die Interaktion von Thrombozyten mit Progenitorzellen kann zu vaskulärer Regeneration einerseits, zu verstärkter Inflammation und Atherogenese andererseits führen: Einwirkung kardiovaskulärer Risikofaktoren bedingt eine erhöhte Thrombozytenaktivität mit einer verstärkten Thrombozytenadhäsion; in einer proatherogenen Umgebung wird die Rekrutierung zirkulierender Progenitorzellen sowie deren Differenzierung zu Endothelzellen, Makrophagen und Schaumzellen ausgelöst [MAY et al., 2008; STELLOS et al., 2008]. Ist die Mikro-Umgebung hingegen nicht proatherogen, so können sich Progenitorzellen durch Interaktion mit den Thrombozyten zu reifen Endothelzellen entwickeln und vaskuläre Reparationsmechanismen in Gang setzen [LANGER und GAWAZ, 2008].

2.3 Risikofaktoren für die Entwicklung von Atherothrombose

In zahlreichen epidemiologischen Studien konnte eine Verbindung zwischen bestimmten Risikomarkern und CVD (cardiovascular disease, Kardiovaskuläre Erkrankungen) gezeigt werden.

Risikomarker können in 2 Kategorien eingeteilt werden:

1. Risikofaktoren, die nachweislich kausal wirken: Tabakkonsum, erhöhte LDL-Werte, verringerte HDL-Werte, hoher Blutdruck, erhöhte Blutglukosewerte, physische Inaktivität, Übergewicht und ungesunde Ernährung.
2. Risikomarker, die zwar eine Assoziation zu CVD gezeigt haben, wobei aber eine Verbindung zwischen Ursache und Effekt erst geprüft werden muss. Dazu zählen ein niedriger sozioökonomischer Status, erhöhte prothrombotische Faktoren (Fibrinogen, Plasminogen activator inhibitor-1), Infektions- und Inflammationsmarker, erhöhte Homozysteinwerte, erhöhte Lipoprotein(a)-Werte, psychologische Faktoren und Verlust sozialer Strukturen.

Die Risikofaktoren und -marker kann man auch in prädisponierende oder direkte Faktoren einteilen. Unter prädisponierenden Risikofaktoren versteht man Risikofaktoren, die zumindest zum Teil über die Beeinflussung anderer, direkter Risikofaktoren wirken, wobei auch direkte Effekte möglich sind [YUSUF et al., 2001].

In der INHEART Studie konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Rauchen, erhöhtem ApoB/ApoAI-Verhältnis (Apo = Apolipoproteine), Bluthochdruck, Diabetes mellitus, abdominalem Übergewicht, psychosozialen Faktoren, nicht ausreichendem Konsum von Obst und Gemüse, regelmäßigem Alkoholkonsum und fehlender physischer Aktivität zu akuten Myokardinfektionen gezeigt werden [YUSUF et al., 2004].

2.3.1 Auswirkungen von Rauchen auf Thrombozytenfunktion und Atherosklerose

Rauchen ist einer der wichtigsten Lebensstilfaktoren die die Gesundheit des Menschen maßgeblich negativ beeinflussen. Rauchen beschleunigt die Atherogenese und gilt als klassischer Risikofaktor für akute kardiovaskuläre Ereignisse [HJEMDAHL, 2001].

Ein einzelner Zigarettenzug enthält mehr als 10^{10} Radikale. Neben Nikotin werden zahlreiche andere Substanzen aufgenommen, die akute und chronische Wirkungen auf den Organismus haben. Viele dieser Stoffe, wie z.B. Kohlenoxide, Peroxinitrit, Phenole oder Nitrosamine, wirken pro-oxidativ, mit Auswirkungen auf eine Reihe lebenswichtiger Moleküle [HEITZER und MEINERTZ, 2005]. Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren der Zellmembranen in Folge der Aufnahme freier Radikale durch Zigarettenrauch verstärkt den oxidativen Stress noch zusätzlich. Im Rahmen einer systemischen inflammatorischen Reaktion kommt es zu einer Ausschüttung von inflammatorischen Mediatoren wie etwa Akute-Phase-Proteinen (z.B. Fibrinogen) und proinflammatorischen Zytokinen. Eine konsekutive Stimulation der Hämatopoiese führt zu einer erhöhten Anzahl von Thrombozyten und Leukozyten im Blut [YANBAEVA et al., 2007]. Nikotin stimuliert die Aktivität des Sympathikus, was erhöhte Herzschlagfrequenz und Blutdruck zur Folge hat. Besonders bei vulnerablen Personen, z.B. bei Personen mit einem vorangegangenen Herzinfarkt, scheint Rauchen die Thrombozytenaktivität zu erhöhen [HJEMDAHL, 2001]. Rångemark et al. konnten erhöhte Tx-M (2,3-dinor-Thromboxan B₂)-Werte, ein Metabolit von TxA₂ (Thromboxan A₂), bei Raucherinnen feststellen. Dies weist auf eine durch Tabakkonsum erhöhte Thrombozytenaktivität und vermehrte Interaktionen von Thrombozyten und Gefäßwand hin. Sogar eine Dosis-Wirkungsbeziehung von Rauchen und Thrombozytenfunktion wurde nachgewiesen [RANGEMARK et al., 1992]. Thrombin, ein wichtiger, thrombozytenabhängiger Faktor in der Atherogenese, ist bei Rauchern direkt nach dem Rauchen im Vergleich zu Nichtrauchern erhöht. Die durch das Rauchen erhöhten Nikotin- und Cotininwerte führen zu einer Modifikation der Thrombo-

zytenfunktion mit Entstehung eines prothrombotischen Zustandsbildes [HIOKI et al., 2001]. Auch Hung et al. konnten bei Probanden mit koronarer Erkrankung zeigen, dass Rauchen die Thrombin-induzierte Thrombozytenaggregation verstärkt und die Synthese von Thrombin erhöht [HUNG et al., 1995]. Die Ergebnisse der Studie von Fusegawa und Handa lassen auch auf eine erhöhte spontane Thrombozytenaggregation bei habituellen Rauchern schließen, wobei alle Aggregationen von der Aktivierung des GPIIb/IIIa-Komplexes ausgingen [FUSEGAWA und HANDA, 2000]. Fibrinogen, ein Ligand des GPIIb/IIIa-Komplexes, ist bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern erhöht und scheint die Thrombozytenaggregation – besonders die Bildung kleiner Thrombozytenaggregate - zu fördern [FUSEGAWA et al., 1999].

2.3.2 Physische Aktivität und kardiovaskuläre Erkrankungen

Physische Inaktivität gehört zu jenen Risikofaktoren die nachweislich in kausalem Zusammenhang zu kardiovaskulären Ereignissen stehen und modifizierbar sind [YUSUF et al., 2001]. Es scheint sogar, dass Personen, die körperlich fit sind, aber andere kardiovaskuläre Risikofaktoren aufweisen, ein niedrigeres Risiko für vorzeitigen Tod haben, als Menschen, die sich nicht körperlich betätigen und keine zusätzlichen kardiovaskulären Risikofaktoren haben. Körperliche Fitness und Aktivität werden oft synonym verwendet, haben jedoch unterschiedliche Bedeutung: Physische Fitness bezeichnet einen Zustand des Wohlbefindens, der es einem erlaubt, den Alltagtag zu bewältigen und/oder die Basis für sportliche Betätigung darstellt. Gesundheitsbezogene physische Fitness umfasst kardiovaskuläre Fitness, muskuloskeletale Fitness, Körperzusammensetzung und Stoffwechsel. Physische Aktivität hingegen beschreibt alle Aktivitäten, sowohl in der Freizeit als auch in der Arbeitszeit, die zu einem erhöhten Energieaufwand im Vergleich zum Ruhezustand führen [WARBURTON et al., 2006]. In zahlreichen Studien wurde eine inverse Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen physischer Aktivität und Gesamtmortalität [GIANNUZZI et al., 2003; LEE und SKERRETT, 2001], kardiovaskulären Erkrankungen sowie Inzidenz und Mortalität von koronarer Herzkrankheit

[HAENNEL und LEMIRE, 2002; HASKELL et al., 2007] gezeigt. Physische Aktivität bzw. Fitness hat einen positiven Einfluss auf zahlreiche andere Risikofaktoren der Atherosklerose: Sie verbessert die Körperzusammensetzung (vermindert Körperfett, erhöht Muskelmasse), das Lipoprotein-Profil (vermindertes LDL/HDL-Verhältnis, erhöhte HDL-Werte, verminderte Triglyceridwerte), die Glukosetoleranz und die Insulinsensitivität, reduziert den Blutdruck [KOKKINOS, 2008; THOMPSON et al., 2003] und systemische Inflammation, vermindert die Blutgerinnung, verbessert den koronaren Blutfluss, die Herzfunktion, die endotheliale Funktion sowie das psychische Wohlbefinden [WARBURTON et al., 2006]. Trotz dieser vielen, meist bekannten Vorteile von körperlicher Betätigung gaben in einer Studie in 15 Mitgliedsländern der Europäischen Union 27% der Männer und 37% der Frauen an, sich in der Freizeit in keiner Weise körperlich zu betätigen [MARGETTS et al., 1999]. Jene Personen, die am wenigsten Bewegung machen, weisen im Vergleich zu Personen, die sich körperlich am meisten betätigen, ein doppelt so hohes Risiko auf, Herz-Kreislaufkrankungen zu entwickeln [THOMPSON et al., 2003]. Das zur Verbesserung der Gesundheit minimal notwendige Bewegungsausmaß ist noch unklar, jedoch scheint physische Aktivität, die einen Energieaufwand von 4200 kJ (~1000 kcal) pro Woche bedeutet, positive Effekte zu haben [HAENNEL und LEMIRE, 2002; LEE und SKERRETT, 2001]: Bei diesem Ausmaß an körperlicher Betätigung wird eine Reduktion der Gesamtmortalität, der Mortalität von kardiovaskulären und koronarer Herzkrankheit um 20 - 30% erreicht, bei höherem Umfang ist die gesundheitliche Wirkung noch größer. Um dies zu erreichen, empfehlen die beiden größten kardiologischen Gesellschaften, AHA und die ESC (European Society of Cardiology), mindestens 30 Minuten moderate, aerobe Bewegung an den meisten, besser allen Tagen der Woche oder mindestens 20 Minuten anstrengende aerobe körperliche Aktivität an drei Tagen pro Woche, wobei die Einzeleinheiten auch kürzer sein können. Unter moderater körperlicher Bewegung versteht man Tätigkeiten bei 45 - 60% der Herzfrequenz- / Sauerstoffaufnahmereserve oder 50 - 70% der maximalen Herzfrequenz. Eine vereinfachte Methode zur Abschätzung der körperlichen Aktivität sind die METs (metabolischen Äquivalente). Ein MET

stellt den individuellen Energiebedarf bei Ruhe dar. Moderate körperliche Bewegung wie z.B. Spazieren gehen, Tanzen oder langsames Radfahren in der Ebene verbraucht 3 – 6 METs, während anstrengende Intensität (bei mehr als 60% der Herzfrequenz- / Sauerstoffaufnahmereserve) mehr als 6 METs verbraucht. Zu den anstrengenden körperlichen Betätigungen gehören z.B. flottes Marschieren, Joggen und Laufen [GIANNUZZI et al., 2003; HASKELL et al., 2007]. Anstrengende physische Aktivität führt im Vergleich zu moderater körperlicher Bewegung zu einem niedrigeren diastolischen Blutdruck, verbesserter Glukosetoleranz und aerober Kapazität. Auf den systolischen Blutdruck in Ruhe, das Lipidprofil oder den Körperfettgehalt scheint jedoch die Intensität keinen Einfluss zu haben [SWAIN und FRANKLIN, 2006]. Während einer anstrengenden Trainingseinheit ist jedoch das Risiko für ein koronar-vaskuläres Ereignis im Sinne eines akuten Herzinfarktes bei untrainierten Personen mit einer relativen Risiko-Erhöhung von 107% mehr als verdoppelt und bei trainierten Personen mit einem Anstieg des relativen Risiko um 2,4% nur noch gering erhöht [MITTLEMAN et al., 1993]. Das allgemeine Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses aber ist bei physisch fitten Personen – auch bei jenen die mit hoher Intensität trainieren, im Vergleich zu inaktiven Personen stark vermindert [BARTSCH, 1999].

Bei Betrachtung dieser (wie oben dargestellt zum Teil paradoxen) Effekte körperlicher Aktivität auf Atherogenese und kardiovaskuläre Erkrankungen ist das hämostasiologische System von großer Bedeutung: Die Trainingsintensität beeinflusst die Gerinnungsfaktoren (Koagulationspotential), die Thrombozyten-Aktivität / -Aggregation und das fibrinolytische Potential maßgeblich. Das Risiko für ein ischämisches Ereignis steigt durch eine erhöhte Aktivität der Gerinnungsfaktoren und ein vermindertes fibrinolytisches Potential an. Marker der Aktivität der Gerinnungsfaktoren (Fibrinogen, Faktor VII, Faktor VIII, vWF, Marker der Thrombinbildung) und des fibrinolytischen Potentials [tPA (Gewebs-Plasminogen-Aktivator), PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1)] sind mit kardiovaskulären Erkrankungen, ischämischen Ereignissen und kardiovaskulärer Mortalität assoziiert. Direkt nach einer körperlichen Belastung sind sowohl das fibrinolytische als auch das Koagulationspotential, abhängig von der

Trainingsintensität, erhöht. Bei regelmäßiger aerober physischer Aktivität kommt es sowohl bei Gesunden als auch bei Personen, die an kardiovaskulären Erkrankungen leiden, zu einem verbesserten fibrinolytischen Profil und zu einem verminderten Koagulationspotential in Ruhe, was das Risiko von ischämischen Ereignissen sowohl in Ruhe als auch während körperlicher Erüchtigung mindert [WOMACK et al., 2003].

Sowohl bei der Blutstillung als auch der Atherogenese spielen Thrombozyten, wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt, eine wichtige Rolle. Studien zur Auswirkung von physischer Aktivität auf die Thrombozytenfunktion ergeben widersprüchliche Resultate [EL-SAYED et al., 2004].

Direkt nach sportlicher Betätigung ist ein signifikanter Anstieg der Thrombozytenzahl, durch deren Freisetzung aus dem Gefäßbett der Milz, des Knochenmarks und aus dem intravaskulären Pool des Lungenkreislaufs, zu beobachten [EL-SAYED et al., 2005]. In einer Studie von Kestin et al. wurden die Auswirkungen von regelmäßigem, mindestens 30-minütigem Training dreimal pro Woche bei anstrengender Intensität auf die thrombozytären Parameter bei gesunden Personen untersucht. Während vor der Trainingsbelastung kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden konnte in Bezug auf die Thrombozytenfunktion, wurde direkt und 15 Minuten nach anstrengendem Training bei den viel sitzenden, nicht aber bei den körperlich aktiven Personen eine erhöhte Thrombozytenaktivierung und –reaktivität beobachtet. Diese Effekte konnten mit GPIIb/IIIa und GPIV, jedoch nicht GPIIb/IIIa und P-Selektin gezeigt werden. [KESTIN et al., 1993]. Wang konnte in einer Studie an untrainierten, gesunden Männern nach intensiver Trainingsbelastung ebenfalls eine, durch Scherkräfte induzierte, erhöhte Thrombozytenaggregation feststellen. Unmittelbar nach anstrengender körperlicher Belastung waren die vWF-Antigen-Plasmawerte, sowie die durch Scherkräfte induzierte Thrombozytenaggregation erhöht. Gleichzeitig kam es zur vermehrten Bindung von vWF an die Thrombozyten sowie zu einer durch vWF ausgelösten Aktivierung von GPIIb/IIIa bei hoher Schubspannung. Auch die P-Selektin Expression steigerte sich durch intensive Belastung [WANG, 2004]. Hilberg et al. stellten bei untrainierten Personen sowohl unmittelbar nach intensiver (bei ungefähr 69% der

maximalen Sauerstoffaufnahme), als auch unmittelbar nach moderater (bei ungefähr 57% der maximalen Sauerstoffaufnahme) Trainingsbelastung eine erhöhte Thrombozytenaktivität und -reaktivität fest. Die P-Selektin-Expression und die Anzahl der Thrombozytenaggregate war durch TRAP (thrombin receptor activating peptide = Thrombinrezeptor aktivierendes Peptid) Stimulation bei beiden Intensitäten signifikant erhöht. Die Anzahl der Aggregate zwischen Thrombozyten und Granulozyten, Lymphozyten oder Monozyten war nach moderater Trainingsbelastung weniger stark erhöht als nach intensiver Trainingsbelastung [HILBERG et al., 2008]. Im Gegensatz dazu stellten Wang et al. eine Senkung der Thrombozytenadhäsion und -aggregabilität durch moderates Training fest. Nach einem achtwöchigen Trainingsprogramm (30 Minuten an fünf Tagen pro Woche, bei etwa 60% der maximalen Sauerstoffaufnahme) wurde eine verminderte Thrombozytenadhäsion sowohl in Ruhe als auch direkt nach Trainingsbelastung bis zur Erschöpfung festgestellt. Die nach hoher Trainingsbelastung durch verschiedene ADP-Konzentrationen induzierte Thrombozytenaggregabilität verringerte sich nach achtwöchigem Training. Die halbmaximale Wirkungs-dosis der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation nahm in der Trainingsgruppe sowohl in Ruhe als auch nach körperlicher Anstrengung zu [WANG et al., 1995]. Auch in einer neueren Studie konnten Wang et al. zeigen, dass Training bei moderater Intensität (30 Minuten an fünf Tagen pro Woche, bei etwa 60% der maximalen Sauerstoffaufnahme) die durch wechselnde Scherkräfte induzierte Thrombozytenaggregation (alternating shear-induced platelet aggregation, ASIPA) reduziert. Dieser Effekt ist vermutlich auf eine verminderte Bindungsfähigkeit von vWF an Thrombozyten und verringerte P-Selektin-Expression der Thrombozyten zurückzuführen. Kurzzeitige anstrengende körperliche Belastung erhöhte hingegen das Ausmaß der ASIPA und ging sowohl bei Trainierten als auch Untrainierten mit einer erhöhten Bindung von vWF an Thrombozyten und P-Selektin-Expression der Thrombozyten einher. Die Steigerung der Thrombozytenfunktion nach der Belastung war jedoch bei den trainierten Personen nicht so deutlich. Nach Absolvierung des Trainingsprogramms waren also ASIPA und Bindungsfähigkeit von vWF und die P-Selektin-Expression der Thrombozyten in Ruhe und direkt nach Belastung im

Vergleich zu den Werten zu Studienbeginn weniger stark erhöht, bei Untrainierten blieben diese unverändert. Trainingsabstinenz machte die Trainingseffekte rückgängig [WANG et al., 2005].

Generell scheint es von Bedeutung zu sein, zwischen kurzzeitigen Effekten einer Trainingsbelastung und Langzeiteffekten von Training und physischer Fitness zu differenzieren. Während einer Trainingseinheit ist das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse zwar erhöht, physisch fitte und Ausdauertrainierte weisen jedoch im Vergleich zu wenig und gar nicht trainierten Personen ein bis zu 50% verringertes Gesamtrisiko kardiovaskuläre Erkrankungen zu entwickeln auf [HASKELL et al., 2007].

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Studienkollektiv

An der Studie nahmen 22 offensichtlich gesunde Probanden im Alter zwischen 20 und 30 Jahren teil. Die mehrheitlich weiblichen Probanden (17 Frauen, 3 Männer) rauchten im Durchschnitt 10 bis 20 Zigaretten pro Tag. Die Mehrheit rauchte schon länger als 5 Jahre. Die Probanden durften vor Beginn der Studie nicht mehr als maximal zweimal pro Woche Sport ausgeübt haben und verpflichteten sich, für die Dauer der Studie (mindestens zwölf Wochen) dreimal pro Woche für mindestens 30 min Ausdauertraining zu betreiben. 15 Probanden (13 Frauen, 2 Männer) absolvierten das gesamte Lauftraining und beendeten die Studie. Damit ist die Drop-out Quote mit 31,8% relativ hoch, was wohl auf die hohe Probandenbelastung zurückzuführen ist.

3.2 Blutabnahme

Zu Beginn und am Ende der Studie wurde den Probanden Venenblut aus der Armbeuge mit einer 20-G Nadel in Citratröhrchen mit einer finalen Konzentration von 0,38% Natriumcitrat (9 Teile Vollblut, 1 Teil Trinatriumcitrat 0,108 mol/L) entnommen. Die Probanden durften vor der Blutabnahme keine Medikamente eingenommen haben, welche die Thrombozytenfunktion beeinflussen könnten.

3.3 Durchflusszytometrie

Die Proben wurden mit einem FACSCalibur Durchflusszytometer (Becton Dickinson Austria, Wien, Österreich) gemessen. Die Daten wurden mittels CellQuest Software, Version 4.2, akquiriert und analysiert.

3.3.1 Bestimmung der VASP-Phosphorylierung

Zur Gewinnung des plättchenreichen Plasmas (PRP) wurde antikoaguliertes Vollblut (Citratpuffer) bei 125xg für 20 min zentrifugiert und der Überstand abgehoben.

30 µl PRP wurden sowohl mit 5 µl des Thrombozyten-Inhibitors PGE_1 in verschiedenen Konzentrationen (finale Konzentration = f.K.: 0 µM, 2,5 nM, 5 nM, 12,5 nM, 25 nM, sowie 25 µM PGE_1) als auch mit 5 µl Thrombozyten-Aktivator ADP (f.K.: 125 µM ADP) inkubiert. Nach 2 min PGE_1 - bzw. 5 min ADP-Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Formaldehyd (f.K.: 1%) gestoppt und mindestens 15 min inkubiert. Nun wurden die Proben mit 500 µl Triton (f.K.: 0,2%) versetzt. Nach 10 min Permeabilisierung der Zellen bei Raumtemperatur wurde für 90 sec bei 3000xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 70 µl PBS (Phosphatpuffer in Kochsalzlösung) resuspendiert, 5 µl vorverdünnter, primärer muriner Antikörper, Anti-phospho-VASP (Ser 239) (NanoTools, clone 22E11) (f.K.: 10 µg/ml), zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation für 90 sec bei 3000xg wurde das Pellet erneut in 35 µl PBS resuspendiert und als sekundärer Antikörper 4 µl Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) – markiertes Goat Anti-Mouse IgG (Becton Dickinson) zugegeben. Nach 15 – 30 min Inkubation im Dunkeln wurde mit 500 µl PBS verdünnt und die Proben in FACS-Röhrchen überführt.

3.3.2 Bestimmung des PRI

Zur Bestimmung des PRI (Platelet Reactivity Index = Thrombozytenreaktivitätsindex) wurde der PLT-VASP/P2Y12-Kit (Biocytex, Marseille, France) verwendet.

5 µl antikoaguliertes Vollblut (Citratpuffer) wurden zunächst mit 5 µl Reagens 2a (PGE_1) oder mit 5 µl Reagens 2b (PGE_1 bzw. ADP) inkubiert, nach 10 min wurden 5 µl Reagens 3 (Fixans) zugegeben. Nach 5-minütiger Fixierung wurde 5 µl Reagens 4a [spezifischer monoklonaler anti-VASP-P Maus-Antikörper (Klon 16C2)] bzw. Reagens 4b (Isotypenkontrolle), beides

enthielt Permeabilisierungsmittel, zugegeben und 5 min inkubiert um die Zellen zu permeabilisieren und phosphoryliertes VASP zu markieren. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmarkierung mit 5 µl Reagens 5 (polyklonaler, FITC-konjugierter Anti-IgG-Maus-Antikörper, Anti-CD61-PE zur Gegenfärbung der Thrombozyten sowie Permeabilisierungsmittel). Nach 5 min wurden die Proben mit je 1 ml Reagens 1 (Verdünnungsmittel) verdünnt. Die Röhrchen wurden bis zur Durchflusszytometrie (innerhalb von 2 Stunden) kühl aufbewahrt.

Der PRI wird unter Verwendung der korrigierten mittleren Fluoreszenzintensitäten (MIFc), die für PGE_1 (PGE_1) alleine oder in Anwesenheit von PGE_1 und ADP (PGE_1+ADP) getestet wurden, nach folgender Formel berechnet:

$$\text{PRI} = [(\text{MIFc}_{(\text{PGE}_1)} - \text{MIFc}_{(\text{PGE}_1+\text{ADP})}) / \text{MIFc}_{(\text{PGE}_1)}] \times 100$$

3.3.3 Bestimmung der CD62P-Expression

Zur Gewinnung des plättchenreichen Plasmas (PRP) wurde antikoaguliertes Vollblut (Citratpuffer) bei 125xg für 20 min zentrifugiert und der Überstand abgehoben.

30 µl PRP wurden mit 10 µl des Antagonisten PGE_1 (f.K.: kein, 12,5 nM und 25 nM PGE_1) 2 min inkubiert, danach wurden 5 µl ADP in verschiedenen Konzentrationen (f.K.: kein, 1,43 µM, 3,57 µM, 7,14 µM, sowie 71,4 µM ADP) zugegeben und 5 min inkubiert. Anschließend wurden alle Proben mit 5 µl Formaldehyd (f.K.: 1%) fixiert und mindestens 15 min inkubiert. Schließlich erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei 2000xg. Die Pellets wurden in 47 µl PBS resuspendiert und mit 3 µl Anti-CD62P-PE (Becton Dickinson) für 1 h inkubiert. Nach Vorlage von 350 µl PBS in FACS-Röhrchen wurden die Proben überführt und im Durchflusszytometer gemessen.

3.4 Bestimmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation

Zur Bestimmung funktioneller Eigenschaften der Thrombozyten unter annähernd physiologischen Bedingungen wurde das Gerät DiaMed Impact-R (Cressier/Morat, Schweiz) verwendet. Es testet die Thrombozytenadhäsion und -aggregation im antikoagulierten Vollblut (Citratpuffer) bei simulierten arteriellen Flussgeschwindigkeiten.

130 µl Citrat-Vollblut wurden dazu auf ein Polystyrol-Well pipettiert, ein Acrylnitril-Butadien-Styrol Konus aufgesetzt und durch Rotation des Konus (1800/s, 2 min) eine schubspannungs-induzierte Thrombozytenaktivierung mit konsekutiver Thrombozytenadhäsion und -aggregation auslöst. Nach dem Waschen und Färben mit May-Grünwald-Färbelösung erfolgte eine automatische Bilderfassung und -Auswertung der Proben. Die Resultate werden in Prozent der Welloberfläche angegeben, die durch Thrombozyten bedeckt ist (Prozent SC) als Parameter für die Thrombozytenadhäsion und die durchschnittliche Größe der Aggregate (AS in μm^2) als Parameter für die Thrombozytenaggregation.

3.5 Spiroergometrie

Die Spiroergometrie wurde vor Beginn und am Ende der Trainingsintervention durchgeführt. Sie erfolgte am Fahrradergometer in sitzender Position. Die Belastung wurde stufenförmig alle 2 min gesteigert, die Probanden wurden aufgefordert, bei einer gleich bleibenden Umdrehungszahl von 60 - 70 U/min bis zur subjektiven Ausbelastungsgrenze zu gehen. Die Herzfrequenz wurde über Elektroden (Elektrodengurt) kontinuierlich abgeleitet. Zur Messung der Atemgase trugen die Probanden eine Gesichtsmaske, an die ein Volumensensor zur Messung des ventilierten Luftvolumens sowie ein dünner Schlauch angebracht sind. Über den Schlauch wird ein Teil der Expirationsluft zu den Gassensoren geleitet, wo ihre Zusammensetzung analysiert wird. Durch die Atemgasanalyse kann der Respiratorische Quotient sowie die maximale Sauerstoffaufnahme (VO_2max) berechnet werden. Der Respiratorische Quotient (RQ) gibt Auskunft über die Art des verstoffwechselten Substrats. Bei einem $\text{RQ} = 0,7$ werden ausschließlich Fette, bei einem $\text{RQ} = 1$ Kohlenhydrate verstoffwechselt. Die VO_2max dient zur Beurteilung der kardiorespiratorischen Fitness. Durch Bestimmung der ventilatorischen Schwelle (anaerobic threshold, AT) und des Respiratory compensation point (RCP) wurde die aerobe-anaerobe Übergangszone und damit eine Empfehlung für den Trainingsbereich des jeweiligen Probanden bestimmt. Da Laufen das Herzkreislaufsystem um etwa 10% stärker belastet als Radfahren [WONISCH et al., 2003], wurde der empfohlene Trainingsbereich entsprechend höher angesetzt.

3.6 Lauftraining

Die Probanden trainierten für mindestens 12 Wochen im aeroben Bereich (Laufen bei 65 bis 75% der maximalen Sauerstoffaufnahme = Grundlagenausdauer GA1) dreimal pro Woche für mindestens 30 min und führten ein Trainingstagebuch. Zur Kontrolle des empfohlenen Trainingsbereichs wurden den Probanden Pulsfrequenzmesser in Form von Pulsuhren (Polar) zur Verfügung gestellt. Es wurde an fünf Tagen die Woche ein begleitetes Lauftraining angeboten, das vor allem den Trainingseinstieg erleichtern sollte.

3.7 Auswertung und Statistik

Die Datenauswertung erfolgte mittels Excel 2002 sowie SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Die gemessenen Parameter wurden zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Da alle Daten auf 5% Signifikanzniveau normalverteilt waren, wurde zum Vergleich der Werte zu Studienbeginn und Studienende der zweiseitige gepaarte T-Test angewandt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Epidemiologische Eckdaten

An der Studie nahmen 22 Probanden teil, wobei 15 Probanden (3 männlich, 12 weiblich) das vereinbarte Laufprogramm für eine Dauer von 12 Wochen durchführten und auch die Abschlussuntersuchung absolvierten, die Studie also vollständig durchführten. Die wichtigsten epidemiologischen Eckdaten dieser Probanden sind in Tabelle 1 dargestellt.

Variablen	Interventionsgruppe
Anzahl der Probanden (n), welche die Studie vollständig abgeschlossen haben	n = 15
Alter - Mittelwert ($\pm$ SD) - Minimum – Maximum	23,3 ($\pm$ 3,2) Jahre 20 Jahre – 29 Jahre
Geschlecht	n = 3 (20%) männlich n = 12 (80%) weiblich
Größe - Mittelwert ($\pm$ SD) - Minimum – Maximum	170 ($\pm$ 10,6) cm 160 cm – 192 cm
Gewicht - Mittelwert ($\pm$ SD) - Minimum – Maximum	64 ($\pm$ 12,7) kg 50 kg – 94 kg
Body Mass Index - Mittelwert ($\pm$ SD) - Minimum – Maximum	21,9 ($\pm$ 2,7) kg/m ² 27,6 kg/m ² – 18,8 kg/m ²
Kardiovaskuläre Risikofaktoren: Bluthochdruck Hypercholesterinämie Diabetes Tabakkonsum	n = 0 (0%) n = 0 (0%) n = 0 (0%) n = 15 (100%)
Tabakkonsum: 1-10 Zigaretten/Tag 10-20 Zigaretten/Tag > 20 Zigaretten/Tag	n = 3 (20%) n = 10 (66,7%) n = 2 (13,3%)
Tabakkonsum (n) seit < 5 Jahren 5-10 Jahren > 10 Jahren	n = 3 (20%) n = 9 (60%) n = 3 (20%)
Medikamenteneinnahme Keine Pille Andere Medikamente	n = 8 (53,3%) n = 5 (33,3%) n = 2 (13,3%)

Tabelle 1: Epidemiologische Eckdaten – Übersicht über die Interventionsgruppe

4.2 Effekt des Trainingsprogramms auf den Leistungszustand

Vor Beginn der Studie übte die Mehrheit der Probanden überhaupt keine sportliche Betätigung aus. Durch Teilnahme an der Studie erhöhten die Probanden ihr Bewegungspensum auf mehrheitlich 2 - 4 mal pro Woche (siehe Tabelle 2).

sportliche Aktivität zu Studienbeginn:	
Keine	n = 11 (73,3%)
1-2 mal/Woche	n = 4 (26,7%)
2-4 mal/Woche	n = 0 (0%)
sportliche Aktivität zu Studienende:	
Keine	n = 0 (0%)
1-2 mal/Woche	n = 2 (13,3%)
2-4 mal/Woche	n = 13 (86,7%)

Tabelle 2: Sportliche Aktivität vor und nach der Studienintervention

Zur Ermittlung des Trainingseffekts wurden Leistungsparameter sowohl zu Beginn (siehe Tabelle 3) als auch am Ende (siehe Tabelle 4) der Studie erhoben.

Leistung - Mittelwert ($\pm$ SD)	172,33 ($\pm$ 36,44) Watt
Aerobe Schwelle - Mittelwert ($\pm$ SD)	75,33 ($\pm$ 32,37) Watt
Anaerobe Schwelle - Mittelwert ($\pm$ SD)	121,67 ($\pm$ 33,20) Watt
VO ₂ max - Mittelwert ($\pm$ SD)	36,24 ($\pm$ 5,43) ml/kg/min

Tabelle 3: Leistungsparameter, gemessen zu Studienbeginn

Die durchschnittliche maximale Sauerstoffaufnahme stieg, wie Abbildung 7 zeigt, in Folge des regelmäßigen Lauftrainings von 36,24 ml/kg/min zu Beginn der Studie auf 40,20 ml/kg/min am Ende der Studie an.

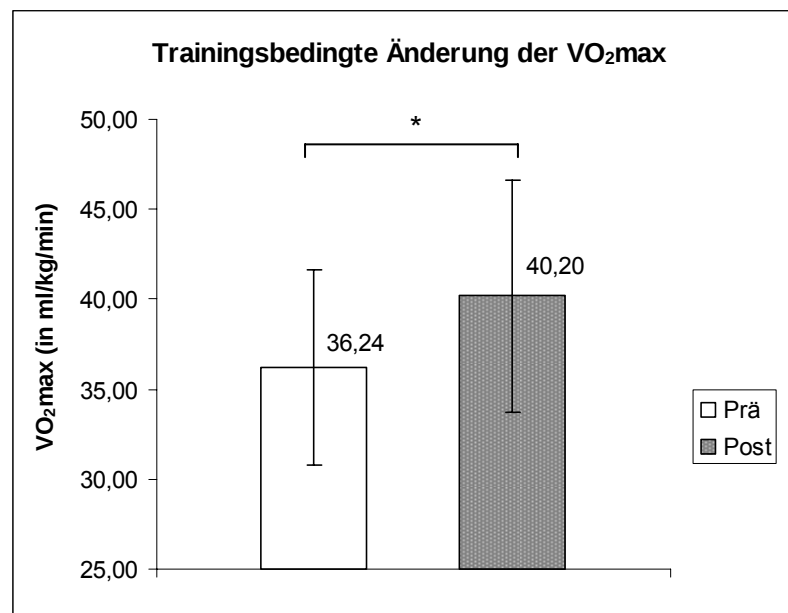


Abbildung 7: Trainingsbedingte Änderung der VO₂max

Auswirkung des regelmäßigen aeroben Trainings auf die durchschnittliche maximale Sauerstoffaufnahme (VO₂max in ml/kg/min) gemessen zu Beginn (Prä) der Studie und nach 12 Wochen Lauftraining (Post).

* $p < 0,05$

Diese 10,9%ige Steigerung zeigt eine starke Signifikanz ($p < 0,001$) und beweist die erfolgreiche Leistungssteigerung der Probanden im Studienverlauf, die in Abbildung 8 auch für Männer und Frauen getrennt dargestellt ist.

Bei den Frauen stieg die VO₂max von 35,89 ($\pm 5,56$ SD) ml/kg/min um 10,5% [3,76 ($\pm 1,95$ SD) ml/kg/min] auf 39,65 ($\pm 5,88$ SD) ml/kg/min stark signifikant ($p < 0,001$). Die Männer konnten ihre VO₂max mit + 12,7% [4,77 ($\pm 3,92$ SD) ml/kg/min] noch stärker (die Steigerung ist aufgrund der geringen Fallzahl jedoch statistisch nicht signifikant) verbessern, von 37,63 ($\pm 5,73$ SD) ml/kg/min zu Studienbeginn auf 42,4 ($\pm 9,61$ SD) ml/kg/min zu Studienende.

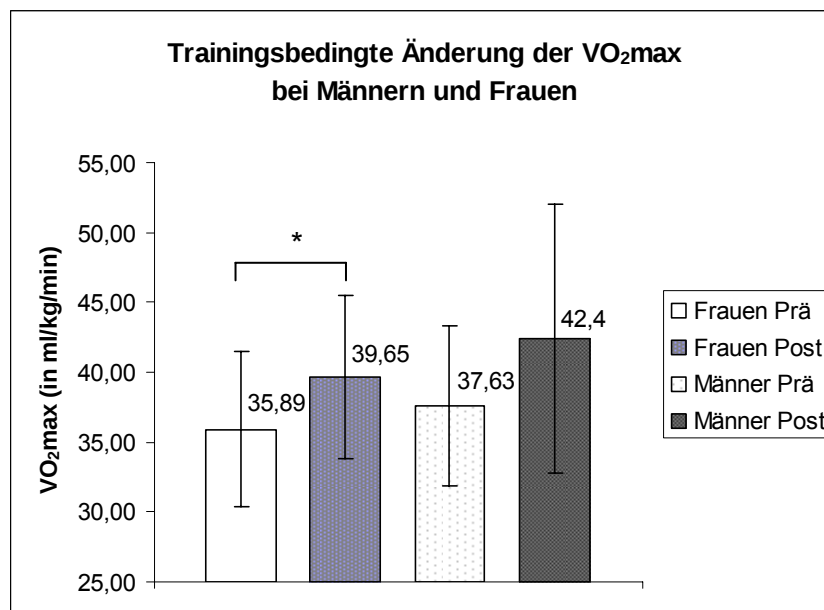


Abbildung 8: Trainingsbedingte Änderung der VO₂max bei Männern und Frauen

Durch das Lauftraining bedingte Änderung der maximalen Sauerstoffaufnahme – für Männer und Frauen getrennt dargestellt

* $p < 0,05$

Eine stark signifikante Steigerung der Maximalleistung (im Mittel + 22,5 Watt, $p < 0,001$), der aeroben (im Mittel + 13,3 Watt, $p = 0,005$) und anaeroben Schwelle (im Mittel + 24,3 Watt, $p < 0,001$) bei der Spiroergometrie untermauert die Verbesserung der physischen Leistungsfähigkeit noch zusätzlich.

Maximalleistung - Mittelwert ($\pm$ SD)	194,87 ($\pm$ 49,24) Watt
Aerobe Schwelle - Mittelwert ($\pm$ SD)	88,67 ($\pm$ 32,65) Watt
Anaerobe Schwelle - Mittelwert ($\pm$ SD)	146,00 ($\pm$ 46,03) Watt
VO ₂ max - Mittelwert ($\pm$ SD)	40,20 ($\pm$ 6,46) ml/kg/min

Tabelle 4: Leistungsparameter, gemessen zu Studienende

Die ermittelten Parameter dienen auch zur Validierung der Trainingsprotokolle und zeigen, dass sich die kardiorespiratorische Fitness nach zwölf Wochen regelmäßigen Lauftraining verbessert hat.

4.3 Auswirkungen des Lauftrainings auf die Thrombozytenfunktion

4.3.1 CD62P-Expression

Die Grundaktivierung der Thrombozyten (ohne Zugabe von Thrombozyten-Agonisten oder -Inhibitoren) sank, wie in Abbildung 9 gezeigt, stark signifikant ($p = 0,004$) um 56,9% [$4,87 (\pm 5,51 \text{ SD})$ Prozentpunkte] von 8,56% ($\pm 5,9\% \text{ SD}$) zu Studienbeginn auf 3,69% ($\pm 2,06\% \text{ SD}$) CD62P-exprimierender Zellen zu Studienende.

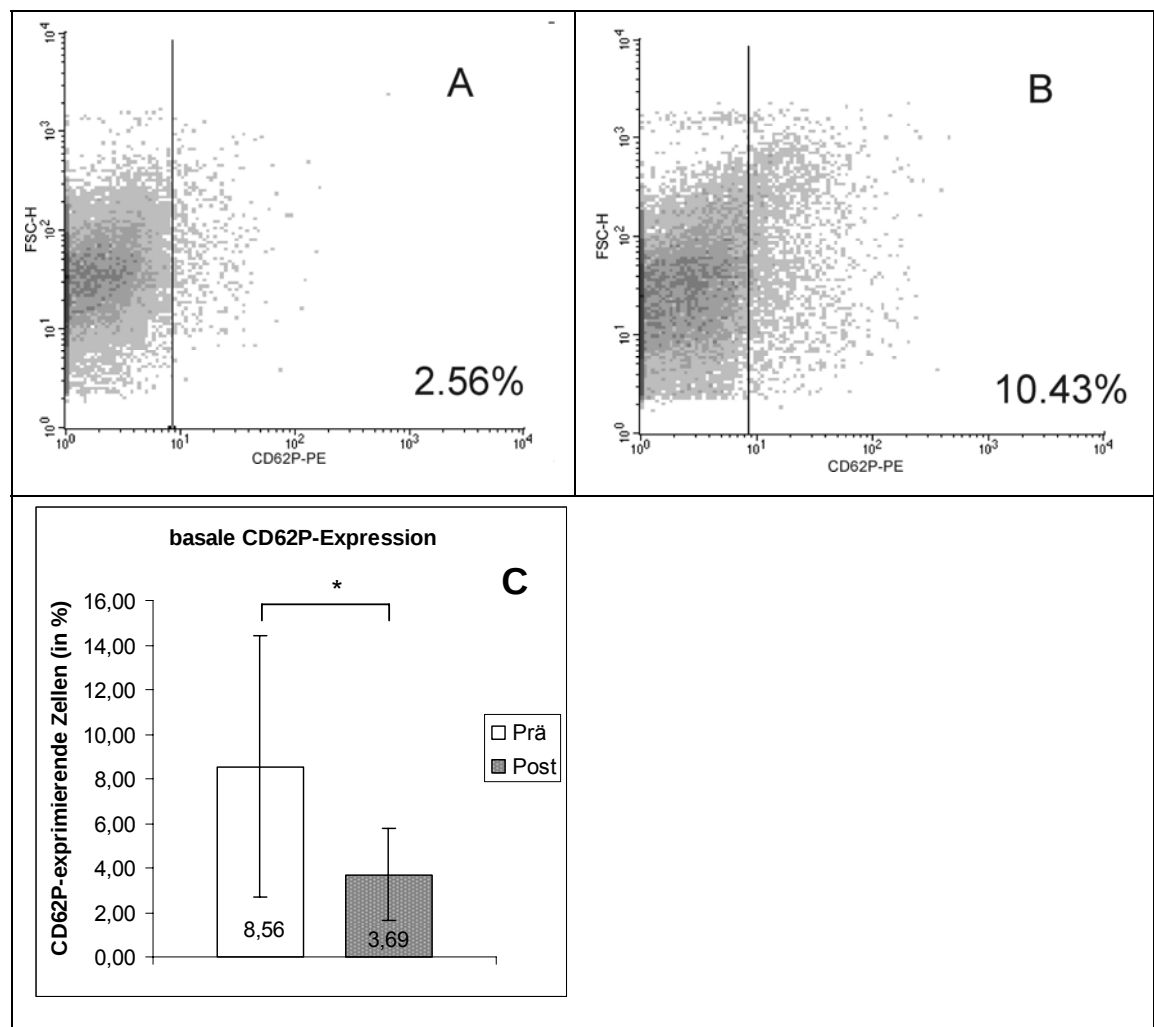


Abbildung 9: Basale CD62P-Expression vor und nach Training

A, B Dot plot, erhalten durch durchflusszytometrische Bestimmung der basalen CD62P-Expression eines Probanden zu Studienbeginn (B) und zu Studienende (A)
C basale CD62P-Expression in der Studienpopulation, gemessen vor (Prä) und nach (Post) dem Trainingsprogramm. * $p < 0,05$

Abbildung 10 zeigt den Verlauf der Änderung der CD62P-Expression bei alleiniger Zugabe des Thrombozyten-Agonisten ADP in steigender Konzentration sowohl zu Studienbeginn als auch zu Studienende.

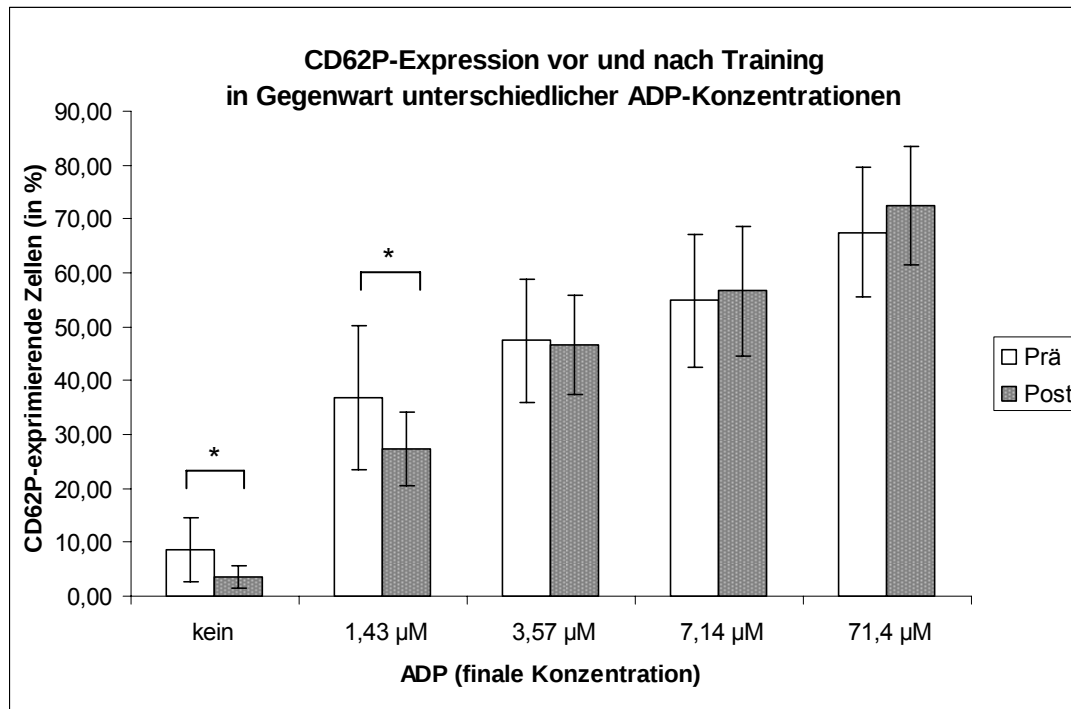


Abbildung 10: CD62P-Expression vor und nach Training in Gegenwart unterschiedlicher ADP-Konzentrationen

Veränderung der CD62P-Expression bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des Agonisten ADP, gemessen vor (Prä) und nach (Post) der Trainingsintervention. * $p < 0,05$

Die CD62P-Expression war bei Zugabe einer finalen Konzentration von 71,4 µM ADP mit 67,56% ($\pm 11,91\%$ SD) prä bzw. 72,52% ($\pm 11,1\%$ SD) post am höchsten und sank mit abnehmender Konzentration des Agonisten: Bei Zugabe von 7,14 µM ADP betrug die Anzahl CD62P-exprimierender Zellen 54,91% ($\pm 12,29\%$ SD) prä bzw. 56,59% ($\pm 11,93\%$ SD) post. Bei 3,57 µM ADP betrug die P-Selektin-Expression 47,44% ($\pm 11,50\%$ SD) prä bzw. 46,52% ($\pm 9,18\%$ SD) post. Die niedrigste Konzentration des Agonisten (1,43 µM ADP) führte auch zur niedrigsten CD62P-Expression: 36,8% ($\pm 13,46\%$ SD) prä bzw. 27,37% ($\pm 6,87\%$ SD) post. Eine signifikante Änderung der CD62P-Expression im Studienverlauf konnte bei der niedrigsten ADP-Konzentration festgestellt werden: Die mittlere Abnahme CD62P-exprimierender Zellen betrug 25,6%

[9,43 ($\pm 14,32$ SD) Prozentpunkte] und war mit $p = 0,023$ signifikant. Auch gemeinsam mit dem Antagonisten PGE_1 bewirkte ADP in submaximaler Konzentration eine signifikante Änderung der Thrombozytenaktivierung, wie auch in Abbildung 11 dargestellt.

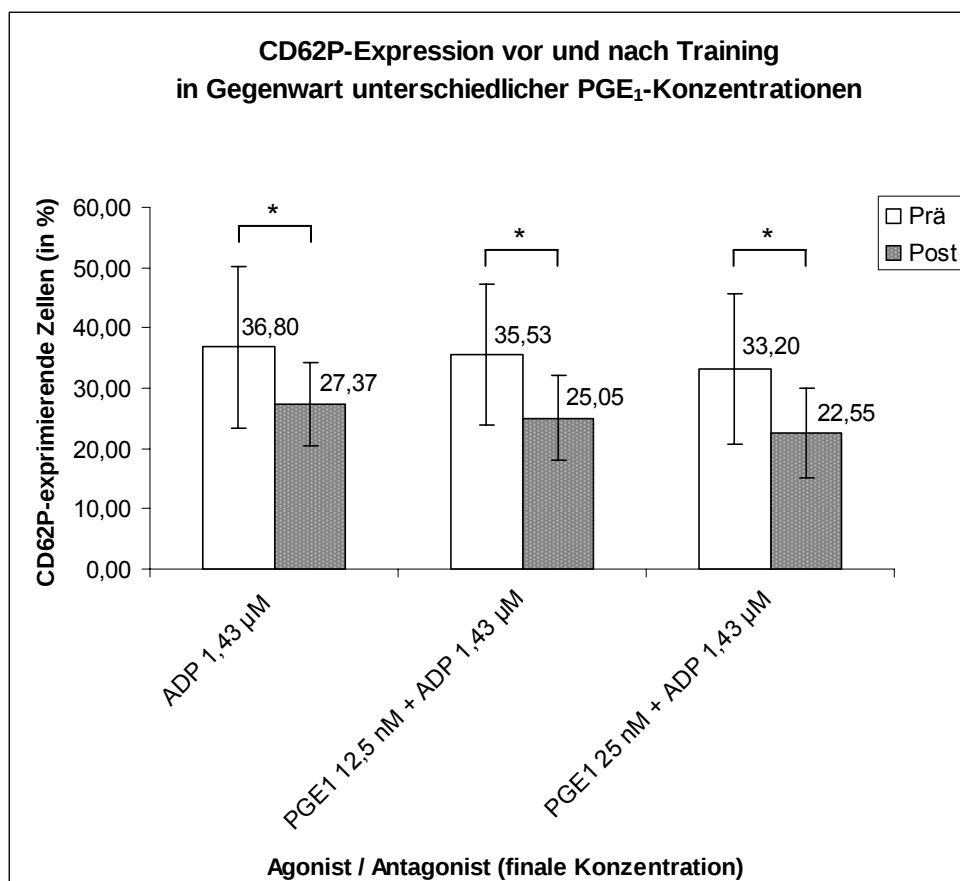


Abbildung 11: CD62P-Expression vor und nach Training in Gegenwart unterschiedlicher PGE_1 -Konzentrationen

Änderung der CD62P-Expression vor (Prä) und am Ende (Post) des regelmäßigen Trainings bei Zugabe des Agonisten ADP mit einer finalen Konzentration von 1,43 μM und des Antagonisten PGE_1 in unterschiedlichen Konzentrationen. * $p < 0,05$

Eine finale Konzentration von 1,43 μM ADP und 25 nM PGE_1 ergab zu Studienbeginn 33,20% ($\pm 12,42\%$ SD) CD62P-exprimierender Zellen, welche sich im Studienverlauf stark signifikant ($p = 0,006$) um 32,1% [10,65 ($\pm 12,89$ SD) Prozentpunkte] auf 22,55% ($\pm 7,39\%$ SD) CD62P-exprimierende Zellen verringerte. Stark signifikant ($p = 0,007$) nahm auch die CD62P-Expression bei einer Koinkubation von 1,43 μM ADP mit 12,5 nM PGE_1

ab: von 35,53% ($\pm 11,75\%$ SD) zu Studienbeginn sank die Anzahl CD62P-exprimierender Zellen um 29,5% [10,48 ($\pm 12,79$ SD) Prozentpunkte] auf 25,05% ($\pm 7,08\%$ SD) zu Studienende.

4.3.2 Thrombozytenadhäsion

Die Surface Coverage, dargestellt in Abbildung 12, sank durch das Training signifikant ($p = 0,027$) um 36% [$1,8 (\pm 2,6 \text{ SD})$ Prozentpunkte] von 5,0% ($\pm 1,5 \text{ SD}$) auf 3,1% ($\pm 1,7 \text{ SD}$). Die Average Size sank von 27 ($\pm 14,5 \text{ SD}$) auf 26 ($\pm 3,8 \text{ SD}$), allerdings nicht signifikant.

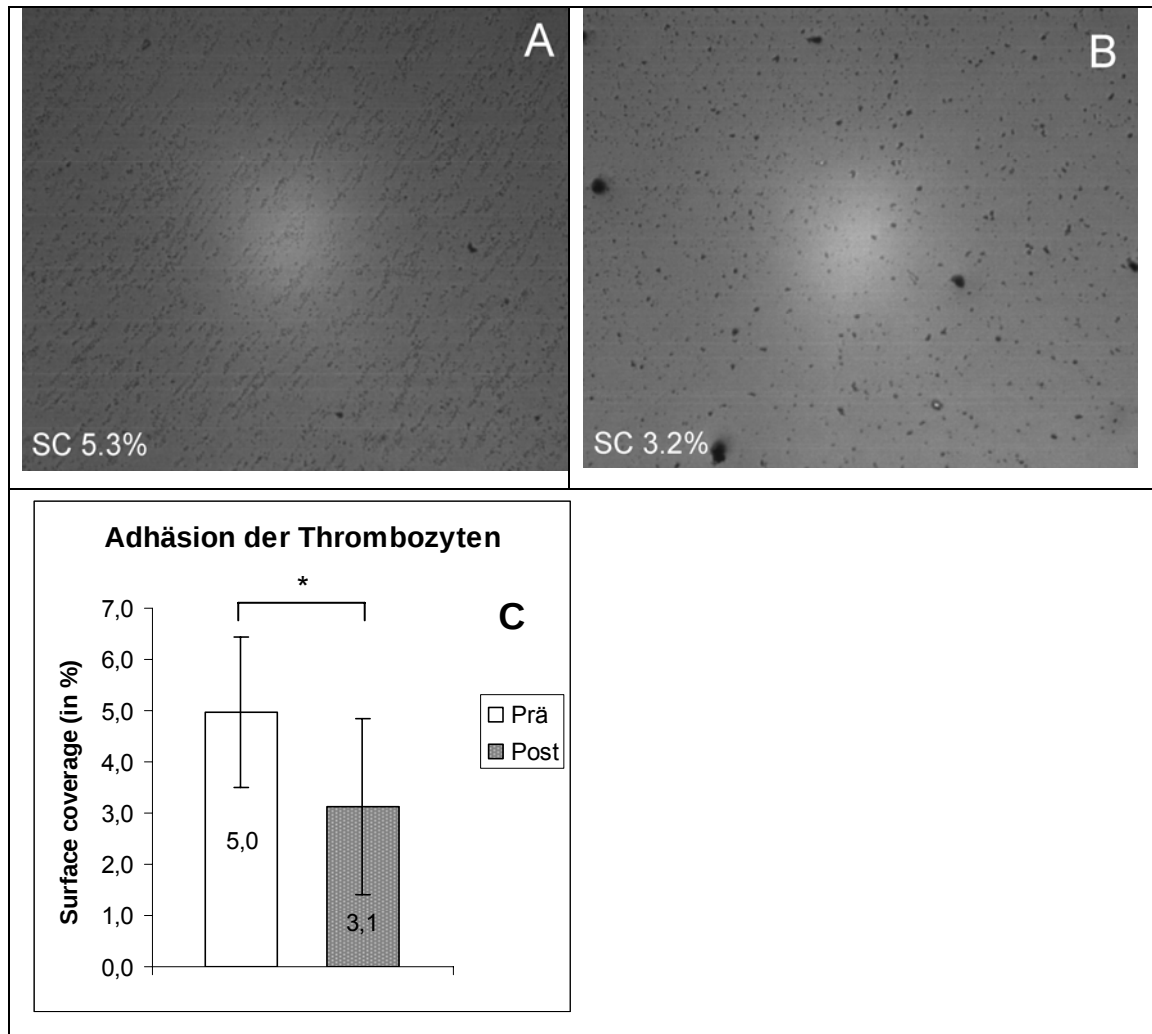


Abbildung 12: Adhäsion der Thrombozyten vor und nach Training

Thrombozytenadhäsion gemessen mittels Plate and Cone Analyzer:

A, B Bilderfassung der SC eines Probanden zu Studienbeginn (A) und -ende (B)

C Surface Coverage (SC) zu Studienbeginn (Prä) und -ende (Post). * $p < 0,05$

4.3.3 VASP-Phosphorylierung

Die VASP-Phosphorylierung zeigte in Folge der Trainingsintervention eine stark signifikante Änderung bei Zugabe von den finalen Konzentrationen 2,5 nM, 5 nM sowie 12,5 nM PGE₁, 125 µM ADP sowie ohne PGE₁. Die VASP-Phosphorylierung der Thrombozyten sank durch Training sowohl bei der Grundaktivierung als auch bei PGE₁- und ADP-Zugabe signifikant, wie in Abbildung 13 dargestellt.

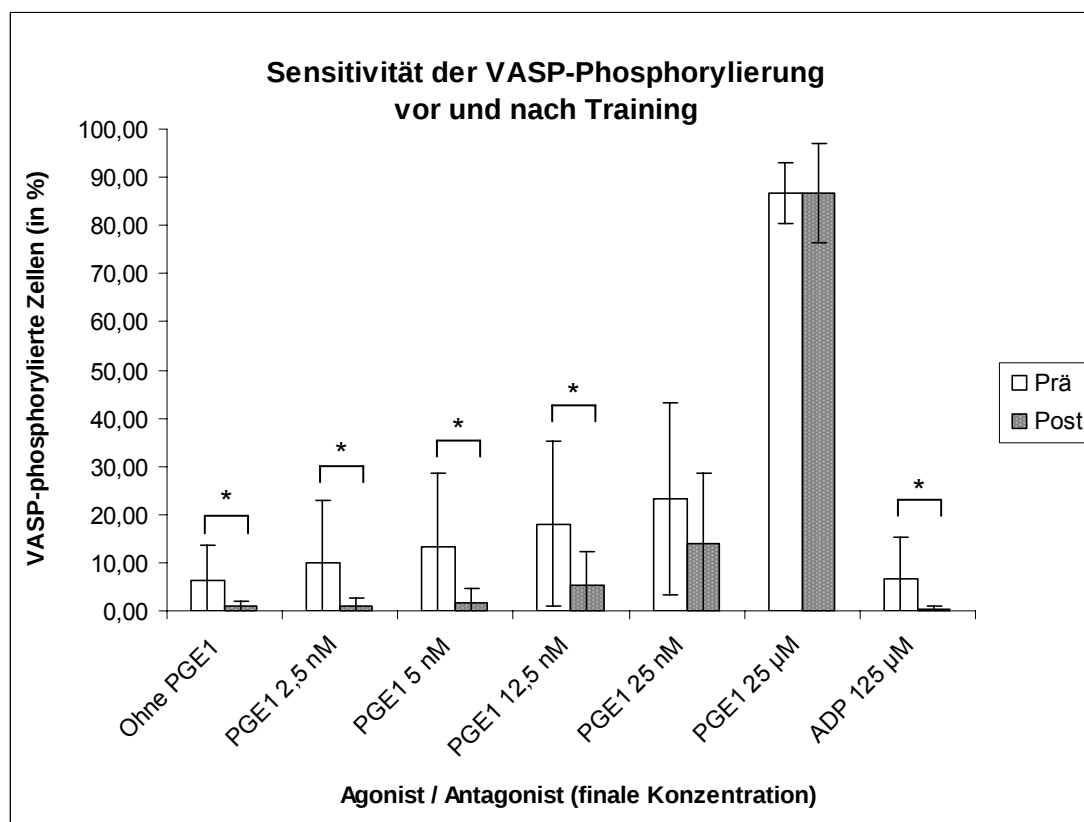


Abbildung 13: Sensitivität der VASP-Phosphorylierung vor und nach Training

Auswirkungen des regelmäßigen Ausdauertrainings auf die VASP-Phosphorylierung der Thrombozyten nach Zugabe von PGE₁ und ADP, gemessen zu Beginn (Prä) und am Ende (Post) des zwölfwöchigen Lauftrainings. * p < 0,05

Die Anzahl VASP-phosphorylierter Zellen sank im Grundzustand der Thrombozyten (das heißt ohne Zugabe von Agonisten oder Antagonisten) um 85% [5,23 (± 7,32 SD) Prozentpunkte] stark signifikant (p = 0,019) von 6,15% (± 7,33% SD) vor Beginn des Lauftrainings auf 0,92% (± 0,98% SD) nach

Absolvierung des Trainingsprogramms. Bei der Zugabe der höchsten finalen PGE₁-Konzentration von 25 µM blieb die Zahl der VASP-phosphorylierten Zellen mit einer Zunahme um lediglich 0,1% [0,07 (± 13,46 SD) Prozentpunkte] nahezu unverändert: 86,67% (± 6,21% SD) zu Studienbeginn versus 86,74% (± 10,38% SD) zu Studienende. Um 40,37% [9,41 (± 24,56 SD) Prozentpunkte] nicht signifikant (p = 0,160) sank die Anzahl VASP-phosphorylierter Zellen bei Inkubation mit 25 nM PGE₁ von 23,31% (± 19,95% SD) auf 13,90% (± 14,69% SD). Die Zugabe von PGE₁ in submaximalen Dosen hingegen zeigte eine signifikante Abnahme der VASP-Phosphorylierung der Thrombozyten: Bei 12,5 nM PGE₁-Zugabe sank diese um 70,5% [12,73 (± 20,07 SD) Prozentpunkte] stark signifikant (p = 0,028) von 18,07% (± 17,08% SD) zu Studienbeginn auf 5,34% (± 6,91% SD) zu Studienende. Ebenfalls stark signifikant reduzierte sich die Anzahl VASP-phosphorylierter Zellen bei Inkubation mit 5 nM PGE₁ (p = 0,013) von 13,42% (± 15,22% SD) um 87,6% [11,75 (± 15,91 SD) Prozentpunkte] auf 1,67% (± 3,11% SD), sowie bei 2,5 nM PGE₁ von 10% (± 2,81% SD) mit p = 0,016 um 90,6% [9,06 (± 12,76 SD)] Prozentpunkte auf 0,93% (± 1,59% SD). Auch die Zugabe von ADP zeigte eine signifikante Abnahme (p = 0,018) der VASP-phosphorylierten Zellen um 93,6% [6,12 (± 8,81 SD) Prozentpunkte]: Von 6,54% (± 8,68% SD) vor Beginn des Lauftrainings auf 0,42% (± 0,51% SD) nach zwölf Wochen Training.

4.3.4 Thrombozytenreaktivitätsindex

Der mittels VASP-Kit gemessene Thrombozytenreaktivitätsindex (dargestellt in Abbildung 14) sank um 15,9% [11,54 (± 22,91) Prozentpunkte] nicht signifikant (p = 0,082) von 72,62% (± 14,05% SD) zu Studienbeginn auf 61,08% (± 20,39% SD) am Studienende.

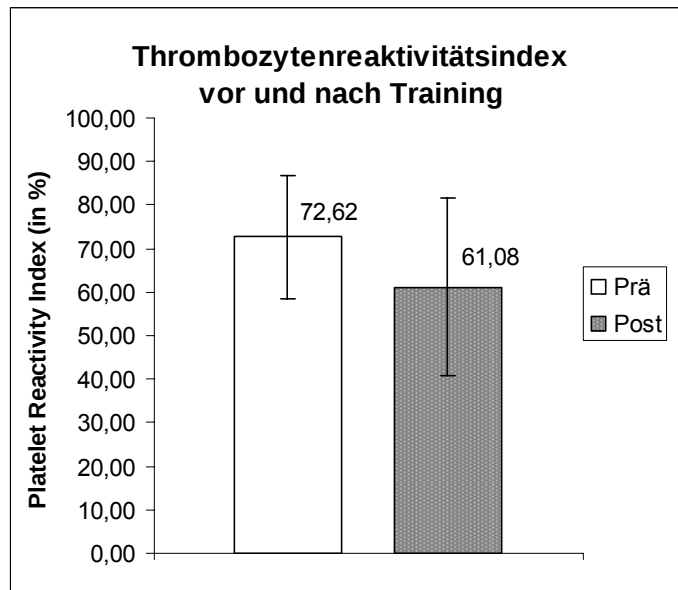


Abbildung 14: Thrombozytenreaktivitätsindex vor und nach Training

Mittels VASP-Kit gemessener Thrombozytenreaktivitätsindex (Platelet Reactivity Index in %) vor (Prä) und nach (Post) Trainingsintervention.

5 DISKUSSION

Mit der vorliegenden Studie sollte die Auswirkung von regelmäßigem, aerobem Training über eine Dauer von zwölf Wochen auf die Thrombozytenfunktion bei Rauchern festgestellt werden.

5.1 Änderung der Leistungsparameter

Um eine Trainingsempfehlung der idealen Herzfrequenz für das aerobe Training geben zu können und zur Validierung der von den Probanden geführten Trainingsprotokolle wurde vor Beginn und am Ende des zwölfwöchigen Lauftrainings eine Spiroergometrie durchgeführt.

Die maximale Sauerstoffaufnahme gilt als objektives Beurteilungskriterium der physischen Leistungsfähigkeit [WONISCH et al., 2003] und verbesserte sich in der vorliegenden Studie stark signifikant. Sowohl Männer als auch Frauen steigerten ihre kardiorespiratorische Fitness nach dem Klassifizierungsschema der AHA [THOMPSON, 2001] im Mittel von "durchschnittlich" auf "gut". Bei den Frauen war diese Änderung stark signifikant, bei den Männern konnte wohl wegen der geringen Probandenzahl keine Signifikanz nachgewiesen werden. Die maximal erreichte Leistung sowie die aerobe und anaerobe Schwelle stiegen im Mittel ebenfalls stark signifikant.

Diese Daten belegen eindrucksvoll die erfolgreiche Leistungssteigerung der Probanden und die Einhaltung des Trainingsprogramms. Die Grundvoraussetzung der Studie, nämlich ein Effekt des regelmäßigen Trainings auf das Herzkreislaufsystem, ist damit gewährleistet.

5.2 Auswirkungen auf die Thrombozytenfunktion

Thrombozyten beziehungsweise deren gesteigerte Adhäsionsfähigkeit und ihr erhöhter Aktivierungszustand spielen, wie bereits in Kapitel 2.2.5 dargestellt, bei der Entstehung und Manifestation atherosklerotischer Erkrankungen eine wichtige Rolle.

Rauchen erhöht nachweislich das kardiovaskuläre Risiko und führt, wie zahlreiche Studien belegen konnten, zu einer gesteigerten Thrombozytenaktivität; es konnte sogar ein dosisabhängiger Zusammenhang zwischen Rauchen und Thrombozytenfunktion gefunden werden (siehe Kapitel 2.3.1). Zudem scheint es, wie neuere Studien belegen, geschlechtsspezifische Unterschiede zu geben: Frauen weisen im Vergleich zu Männern eine höhere thrombozytäre Empfindlichkeit gegenüber Tabakrauch auf [BUTKIEWICZ et al., 2006].

Regelmäßiges Ausdauertraining übt zahlreiche positive Effekte auf die Gesundheit aus und reduziert das Risiko thrombembolischer Ereignisse und schützt vor kardiovaskulären Erkrankungen (siehe Kapitel 2.3.2).

Inwiefern regelmäßige aerobe Bewegung einen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion hat, wurde bisher in nur wenigen Studien untersucht: Bei moderatem Ausdauertraining konnten Wang et al eine reduzierte Thrombozytenadhäsion und -aggregation in Ruhe sowohl bei Männern als auch bei Frauen feststellen [WANG et al., 1995; WANG et al., 1997]. Die zugrunde liegenden Mechanismen, wie regelmäßiger, moderater Ausdauersport die Thrombozytenfunktion beeinflusst, sind noch nicht vollständig bekannt, möglicherweise kommt es aber über einen Anstieg der Thrombozyteninhibitoren Prostazyklin und/oder Stickstoffmonoxid zu verminderter Aggregation der Thrombozyten [EL-SAYED et al., 2005]. Allerdings gibt es zahlreiche Studien, die die Auswirkungen von akuter anstrengender körperlicher Betätigung auf die Thrombozytenaktivität und -reaktivität insbesondere bei Untrainierten (wobei in den wenigsten Studien zwischen Rauchern und Nichtrauchern unterschieden wurde) untersuchen. Hier kommt es zu einer erhöhten Thrombozytenaktivierung und Hyperreaktivität, was für Sport als kardiovaskulären Stressor sprechen würde (siehe Kapitel 2.3.2).

Da jedoch moderater Ausdauersport nachweislich kardioprotektive Effekte hat und sogar eine lineare Relation zwischen physischer Aktivität und Gesundheitszustand zu bestehen scheint [WARBURTON et al., 2006], hat die vorliegende Studie die Auswirkungen von regelmäßiger körperlicher Betätigung im aeroben Bereich auf die Thrombozytenfunktion bei überwiegend weiblichen Rauchern anhand verschiedener Funktionsparameter, nämlich P-Selektin Expression und Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierenden Phosphoproteins bei

Zugabe von Agonisten und Antagonisten, sowie Thrombozytenadhäsion und -aggregation untersucht. Die in Kapitel 4.3 dargestellten Ergebnisse sind größtenteils eindeutig zu interpretieren, jedoch teilweise widersprüchlich und sollen nachfolgend diskutiert werden:

5.2.1 CD62P-Expression

Sowohl thrombozytäres als auch endotheliales P-Selektin (auch CD62P genannt) vermitteln die Adhäsion der Thrombozyten an die Endothelwand und ermöglichen in Interaktion mit weiteren Faktoren das Rollen der Thrombozyten entlang des Endothels (siehe Kapitel 2.2.5). Expression von P-Selektin ist somit ein Parameter für die Thrombozytenaktivierung [DOLE et al., 2005].

Nach Absolvierung des zwölfwöchigen, aeroben Lauftrainings konnte eine signifikant verminderte basale P-Selektin-Expression festgestellt werden, was für eine geringere Grundaktivierung der Thrombozyten spricht. Auch bei Zugabe submaximaler ADP-Konzentrationen (f.K. 1,43 μM) war die P-Selektin-Expression und folglich die Thrombozytenaktivierung signifikant geringer als zu Beginn des Trainingsprogramms. Die Koinkubation mit ADP und dem Thrombozyten-Inhibitor PGE_1 zeigte keine große Änderung im CD62P-Expressionsverhalten der Thrombozyten im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit ADP: die zu erwartende gesteigerte Inhibierung der Thrombozyten trat nicht ein, scheinbar wirkt ADP stärker auf die Thrombozyten als PGE_1 in diesen Konzentrationsbereichen. ADP in höheren Konzentrationen (f.K. 3,57 μM , 7,14 μM , 71,4 μM ,) induzierte eine konzentrationsabhängige Steigerung der CD62P-Expression, welche durch das 12 wöchige Trainingsprogramm nicht modifiziert wurde. Möglicherweise überspielen diese hohen Konzentrationen des Agonisten ADP den bei geringeren Konzentrationen festgestellten positiven Effekt des Lauftrainings auf die Thrombozyten.

Zusammenfassend konnte anhand der CD62P-Expression statistisch signifikant eine verminderte Thrombozytenaktivierung in Folge des regelmäßigen Ausdauertrainings festgestellt werden. Dass bei ADP-induzierter Thrombozytenaktivierung (verwendete ADP-Konzentrationen: 0,5, 1, 2, 5, 10 und 20 μM)

die CD62P-Expression, gemessen mittels Durchflusszytometrie, in linearem Zusammenhang mit der, bei optischer Aggregometrie gemessenen, Thrombozytenaggregation steht, konnten Sbrana et al 2008 in einer Studie an 12 Probanden zeigen [SBRANA et al., 2008]. Somit decken sich die hier dargestellten Resultate mit jenen von Wang et al, die mittels Lichttransmissionsaggregometrie eine verminderte ADP-induzierte Thrombozytenaggregation bei geringen Agonisten-Konzentrationen nach acht Wochen Ausdauertraining zeigen [WANG et al., 1995; WANG et al., 1997]. Darüber hinaus unterstützen die statistisch signifikanten Ergebnisse unserer Messung der CD62P-Expression – insbesondere die hochsignifikant gesunkene Grundaktivierung der Thrombozyten – die Vermutung, dass regelmäßige moderate Bewegung über eine verminderte Thrombozytenreaktivität zum Schutz des Herzkreislaufsystems beiträgt und somit präventiv gegen atherosklerotisches Geschehen wirken könnte.

5.2.2 Thrombozytenadhäsion

Die gemessene Surface Coverage ist ein Parameter für die Thrombozytenadhäsion. Impact-R ist eine kommerziell erhältliche Weiterentwicklung des Plate and Cone Analyzers [VARON et al., 1997]. Es ermöglicht die Messung der Thrombozytenfunktion unter annähernd physiologischen Bedingungen [MATIS MEDICAL, 2009].

Das signifikante Absinken der SC im Studienverlauf zeigt eine Verringerung der Thrombozytenadhäsion in Folge des regelmäßigen aeroben Ausdauertrainings. Die Adhäsion von Thrombozyten an das aktivierte Endothel steht zu Beginn der Atherogenese und trägt auch zur Progression atherosklerotischer Erkrankungen bei (siehe Kapitel 2.2.5). Moderates Ausdauertraining könnte somit möglicherweise über die verminderte Thrombozytenadhäsion als Schutzfaktor vor Atherosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen wirken.

Bekräftigt wird dieses Resultat durch die, nach Absolvierung des Trainingsprogrammes, verminderte Expression des wichtigen Adhäsionsmoleküls CD62P.

Die bisher dokumentierten akuten Auswirkungen von Trainingsbelastungen auf die Thrombozytenfunktion, nämlich erhöhte Aktivierung der Thrombozyten *in vivo*, einhergehend mit einer erhöhten Thrombozytenaggregation, Anstieg von P-Selektin, sowie einer gesteigerten Thrombozytensensitivität bei *in vitro* Stimulation mit Thrombozytenagonisten wie ADP [EL-SAYED et al., 2005] scheinen somit nur eine kurzfristige Reaktion auf Training darzustellen. Dies stimmt mit der Tatsache überein, dass insbesondere anstrengendes, körperliches Training während der Ausübung mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse einhergeht, physische Fitness jedoch langfristig zu einem stark verminderten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen führt (siehe Kapitel 2.3.2).

5.2.3 VASP-Phosphorylierung

Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierenden Phosphoproteins, zum Beispiel als Reaktion auf Stickstoffmonoxid oder PGE_1 , verhindert die Thrombozytenaktivierung und –aggregation (siehe Kapitel 2.2.5) und stellt somit einen Marker der Thrombozyteninhibierung dar [SCHWARZ et al., 1999]. Massberg et al konnten anhand VASP-defizienter Mäuse zeigen, dass VASP sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen an der Down-Regulierung der Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwand beteiligt ist [MASSBERG et al., 2004].

Nach Absolvierung des Lauftrainings wäre daher eine gesteigerte VASP-Phosphorylierung, auch in Hinblick auf die statistisch signifikanten Änderungen der CD62P-Expression, zu erwarten gewesen. Das Gegenteil trat ein: Sowohl die PGE_1 - als auch die ADP-induzierte VASP-Phosphorylierung sank stark signifikant. Die nach Absolvierung des Trainingsprogramms durch den Antagonisten PGE_1 ausgelöste reduzierte VASP-Phosphorylierung spricht für eine erhöhte Thrombozytenaktivierung und steht somit im Widerspruch zu den restlichen im Rahmen dieser Studie erhobenen Ergebnissen. Das stärkere Ansprechen der Thrombozyten auf den Agonisten ADP spricht für eine erhöhte Thrombozytensensitivität, die aber mit CD62P nicht beobachtet werden kann.

Da VASP eine wichtige regulierende Funktion auf P-Selektin ausübt (siehe Kapitel 2.2.5), ist dieses Ergebnis nicht mit jenem der CD62P-Expression kongruent. Auch alle anderen im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführten Messergebnisse und damit einhergehende Konklusionen widersprechen den Resultaten der VASP-Messung. Möglicherweise sind noch unbekannte Regulationsmechanismen im Spiel, weitere Untersuchungen sind hier notwendig.

5.2.4 Thrombozytenreaktivitätsindex

Messung einer erhöhten VASP-Phosphorylierung von Thrombozyten korreliert mit der Inhibierung des ADP-Rezeptors P2Y₁₂, ausgelöst zum Beispiel durch Clopidogrel [CAYLA et al., 2008].

Die, wenn auch nicht signifikante, Abnahme des Thrombozytenreaktivitätsindex PRI deutet auf eine niedrigere funktionelle Bandbreite der Thrombozyten hin, das Ansprechen sowohl auf den Agonist ADP als auch auf den Antagonisten PGE₁ ist möglicherweise vermindert. Die Abnahme des PRI in Folge des regelmäßigen moderaten Lauftrainings ist eine Tendenz, die jener des Medikaments Clopidogrel entspricht: Dieses wird zur medikamentösen Behandlung postinterventioneller Komplikationen nach einer perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie eingesetzt und führt bei gesunkenem PRI zu einem verringerten Risiko ein kardiovaskuläres Ereignis zu entwickeln. Zur Vorhersage von akuten Koronarsyndromen scheint ein PRI von 70% ein guter Cut-off Point zu sein, der allerdings noch in großen randomisierten Studien zu validieren ist [CAYLA et al., 2008]. Die Probanden der im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführten Studie waren im Mittel vor Beginn des regelmäßigen Trainings oberhalb dieses, von Cayla erstmals vorgestellten Cut-off Points zur Erhebung des kardiovaskulären Risikos, und nach zwölf Wochen Training unterhalb des Cut-off Werts. Schon 3 Monate aerobes Training könnte also möglicherweise einen kardioprotektiven Effekt haben.

5.3 Schlussfolgerungen

Das im Rahmen dieser Studie über zwölf Wochen durchgeführte moderate Lauftraining bewirkte eine deutliche Verbesserung der physischen Fitness der Raucher. Auch die meisten Thrombozytenfunktionsparameter zeigten eine positive Entwicklung: Scheinbar führt regelmäßiges, aerobes Lauftraining bei Rauchern zu einer verringerten Thrombozytenaktivität. Messung des Thrombozytenreaktivitätsindex PRI, sowie von P-Selektin und Surface Coverage, beides Parameter der Thrombozytenadhäsion, zeigten hier schlüssige Ergebnisse. Bei Messung des wichtigen Regulationsproteins VASP wurden jedoch adverse Effekte festgestellt. Weitere Untersuchungen sind hier notwendig.

Zusammenfassend scheint regelmäßiges, moderates Ausdauertraining die Thrombozytenfunktion zu hemmen bzw. zu normalisieren. In Anbetracht der zentralen Rolle der Thrombozyten(aktivierung) im atherogenen Geschehen könnte damit auch bei Rauchern der Atherosklerose präventiv entgegengewirkt und das Herzkreislaufsystem positiv beeinflusst werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Diplomarbeit war, die Auswirkung von regelmäßigem, aerobem Ausdauertraining auf thrombozytäre Parameter von Rauchern festzustellen.

Von den an der Studie teilnehmenden Probanden absolvierten 15 (3 männlich, 12 weiblich) die vereinbarten zwölf Wochen Lauftraining vollständig. Untersucht wurde die Veränderung der Grundaktivierung der Thrombozyten sowie die Sensitivitätsveränderung gegenüber klassischen Agonisten (ADP) und Antagonisten (PGE_1). Des Weiteren wurde die Beeinflussung des Adhäsions- und Aggregationsverhaltens der Thrombozyten bestimmt.

Die Steigerung der Leistungsfähigkeit in Folge des Lauftrainings wurde mit Hilfe der Spiroergometrie erhoben: Alle Leistungsparameter (wie maximale Sauerstoffaufnahme, (an-)aerobe Schwelle) steigerten sich signifikant und lassen somit auf eine Steigerung des kardiopulmonalen Leistungsniveaus schließen.

Die mit Hilfe der Durchflusszytometrie und des Plate and Cone Analyzer Impact-R bestimmten thrombozytären Parameter zeigten folgende Resultate:

Der Aktivierungszustand der Thrombozyten gemessen an der Expression von P-Selektin sank im Studienverlauf. Die Thrombozyten wiesen besonders bei submaximalen ADP-Konzentrationen eine ADP-Resistenz auf und ihre Aktivierbarkeit sank signifikant. Auch die Grundaktivierung der Thrombozyten nahm in Folge des Lauftrainings signifikant ab.

Das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten zeigte eine stark signifikante Abnahme im Studienverlauf, was auf eine niedrigere Aktivierung der Thrombozyten hinweist und die Messung der Thrombozytenaktivität durch P-Selektin bekräftigt.

Der PRI gemessen mittels VASP-Kit nahm (nicht signifikant) ab und deutet auf eine niedrigere funktionelle Bandbreite der Thrombozyten hin, das Ansprechen sowohl auf ADP als auch auf PGE_1 ist möglicherweise vermindert.

Die mittels VASP-Phosphorylierung gemessene Hemmbarkeit der Thrombozyten nahm im Studienverlauf jedoch ab, was in Widerspruch zu den anderen im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten steht.

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführten Studie weisen darauf hin, dass regelmäßig durchgeführtes, aerobes Ausdauertraining sowohl die Grundaktivierung der Thrombozyten als auch die Thrombozytenreaktivität senkt und damit möglicherweise das kardiovaskuläre Risiko von Rauchern reduzieren könnte.

7 SUMMARY

The objective of this diploma was to assess the effects of regularly, aerobic endurance training on platelet function in smokers.

15 (12 female, 3 male) of the participating volunteers completed twelve weeks of training and finished the study.

Change of platelet basal activation and agonist- (ADP) and antagonist- (PGE_1) induced changes of platelet-sensitivity in succession of training were measured; as well as the effects of training on platelet adhesion and aggregation.

Improvement of physical performance due to training was determined by spirometry: All performance parameters (for example maximum oxygen vital capacity, aerobic and anaerobic threshold) showed significant improvement and prove an increase in cardiopulmonary performance level.

Platelet parameters were determined by flow cytometry and plate and cone analyzer Impact-R. The following results were obtained:

Platelet activation measured by P-Selectin-expression was decreased after training. In particular, exercise induced platelet-resistance, especially at submaximal ADP-levels and platelet activation decreased significantly. Basal activation of platelets was also significantly attenuated by training.

Adhesion of platelets was diminished by training in a statistically significant way. This indicates lower platelet activation and affirms the results of P-Selectin-measured platelet function.

Platelet Reactivity Index was reduced after training and indicates lower platelet reactivity; there may be a reduced response of platelets to ADP and PGE_1 .

In contrast to the results expected from the above mentioned effects, a statistically significant reduction of VASP phosphorylation after training (in principle indicating decreased platelet inhibition) was observed.

The data of this study suggest that regularly performed aerobic endurance training reduces basal and induced platelet activation and might thereby prevent cardiovascular disease in smokers.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ANICHKOV N, CHALATOV S. Ueber experimentelle Cholesterinsteatose und ihre Bedeutung fuer die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. Zentrbl Allg Pathol Pathol Anat 1913; 24:21-29.
- BARTSCH P. Platelet activation with exercise and risk of cardiac events. Lancet 1999; 354: 1747-1748.
- BENNETT JS. Structure and function of the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. J Clin Invest 2005; 115: 3363-3369.
- BODARY SC, NAPIER MA, MCLEAN JW. Expression of recombinant platelet glycoprotein IIb/IIIa results in a functional fibrinogen-binding complex. J Biol Chem 1989; 264: 18859-18862.
- BONETTI PO, LERMAN LO, LERMAN A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23: 168-175.
- BURGER PC, WAGNER DD. Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. Blood 2003; 101: 2661-2666.
- BUTKIEWICZ AM, KEMONA-CHETNIK I, DYMICKA-PIEKARSKA V, MATOWICKA-KARNA J, KEMONA H, RADZIOWON P. Does smoking affect thrombocytopoiesis and platelet activation in women and men? Adv Med Sci 2006; 51: 123-126.
- CAYLA G, MACIA JC, RABESANDRATANA H, ROUBILLE F, GERVASONI R, PASQUIE JL, BARBOTTE E, SCHVED JF, LECLERCQ F. Flow cytometric assessment of vasodilator-stimulated phosphoprotein: prognostic value of recurrent cardiovascular events after acute coronary syndromes. Arch Cardiovasc Dis 2008; 101: 743-751.
- CHAER RA, GRAHAM JA, MUREEBE L. Platelet function and pharmacologic inhibition. Vasc Endovascular Surg 2006; 40: 261-267.
- CORTI R, HUTTER R, BADIMON JJ, FUSTER V. Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. J Thromb Thrombolysis 2004; 17: 35-44.
- DAUB K, LINDEMANN S, LANGER H, SEIZER P, STELLOS K, SIEGEL-AXEL D, GAWAZ M. The evil in atherosclerosis: adherent platelets induce foam cell formation. Semin Thromb Hemost 2007; 33: 173-178.
- DOLE VS, BERGMEIER W, MITCHELL HA, EICHENBERGER SC, WAGNER DD. Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin. Blood 2005; 106: 2334-2339.
- EL-SAYED MS, ALI N, EL-SAYED ALI Z. Aggregation and activation of blood platelets in exercise and training. Sports Med 2005; 35: 11-22.
- EL-SAYED MS, EL-SAYED ALI Z, AHMADIZAD S. Exercise and training effects on blood haemostasis in health and disease: an update. Sports Med 2004; 34: 181-200.
- FAXON DP, FUSTER V, LIBBY P, BECKMAN JA, HIATT WR, THOMPSON RW, TOPPER JN, ANNEX BH, RUNDBACK JH, FABUNMI RP, ROBERTSON RM, LOSCALZO J. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. Circulation 2004; 109: 2617-2625.

- FURMAN MI, BENOIT SE, BARNARD MR, VALERI CR, BORBONE ML, BECKER RC, HECHTMAN HB, MICHELSON AD. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 352-358.
- FUSEGAWA Y, GOTO S, HANDA S, KAWADA T, ANDO Y. Platelet spontaneous aggregation in platelet-rich plasma is increased in habitual smokers. *Thromb Res* 1999; 93: 271-278.
- FUSEGAWA Y, HANDA S. Platelet aggregation induced by ADP or epinephrine is enhanced in habitual smokers. *Thromb Res* 2000; 97: 287-295.
- FUSTER V, MORENO PR, FAYAD ZA, CORTI R, BADIMON JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 937-954.
- GAWAZ M, LANGER H, MAY AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115: 3378-3384.
- GAWAZ M, STELLOS K, LANGER HF. Platelets modulate atherogenesis and progression of atherosclerotic plaques via interaction with progenitor and dendritic cells. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 235-242.
- GIANNUZZI P, MEZZANI A, SANER H, BJORNSTAD H, FIORETTI P, MENDES M, COHEN-SOLAL A, DUGMORE L, HAMBRECHT R, HELLEMANS I, MCGEE H, PERK J, VANHEES L, VERESS G. Physical activity for primary and secondary prevention. Position paper of the Working Group on Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology of the European Society of Cardiology. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2003; 10: 319-327.
- HADI HA, CARR CS, AL SUWAIDI J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag* 2005; 1: 183-198.
- HAENNEL RG, LEMIRE F. Physical activity to prevent cardiovascular disease. How much is enough? *Can Fam Physician* 2002; 48: 65-71.
- HANSSON GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1876-1890.
- HARBECK B, HUTTELMAIER S, SCHLUTER K, JOCKUSCH BM, ILLENBERGER S. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J Biol Chem* 2000; 275: 30817-30825.
- HASKELL WL, LEE IM, PATE RR, POWELL KE, BLAIR SN, FRANKLIN BA, MACERA CA, HEATH GW, THOMPSON PD, BAUMAN A. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation* 2007; 116: 1081-1093.
- HEITZER T, MEINERTZ T. Rauchen und koronare Herzkrankheit. *Z Kardiol* 2005; 94 Suppl 3: III/30-42.
- HILBERG T, MENZEL K, GLASER D, ZIMMERMANN S, GABRIEL HH. Exercise intensity: platelet function and platelet-leukocyte conjugate formation in untrained subjects. *Thromb Res* 2008; 122: 77-84.
- HIOKI H, AOKI N, KAWANO K, HOMORI M, HASUMURA Y, YASUMURA T, MAKI A, YOSHINO H, YANAGISAWA A, ISHIKAWA K. Acute effects of

- cigarette smoking on platelet-dependent thrombin generation. *Eur Heart J* 2001; 22: 56-61.
- HJEMDAHL P. Smoking, nicotine and thrombotic risk--a role for platelet dependent thrombin generation? *Eur Heart J* 2001; 22: 16-18.
- HORSTRUP K, JABLONKA B, HONIG-LIEDL P, JUST M, KOCHSIEK K, WALTER U. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem* 1994; 225: 21-27.
- HUNG J, LAM JY, LACOSTE L, LETCHACOVSKI G. Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. *Circulation* 1995; 92: 2432-2436.
- JURK K, KEHREL BE. Die Rolle von Thrombozyten bei Hämostase, Thrombose, Immunabwehr und Entzündung. *Dtsch Med Wochenschr* 2008; 133: 1130-1135.
- KASPER B, BRANDT E, BRANDAU S, PETERSEN F. Platelet factor 4 (CXC chemokine ligand 4) differentially regulates respiratory burst, survival, and cytokine expression of human monocytes by using distinct signaling pathways. *J Immunol* 2007; 179: 2584-2591.
- KEHREL BE. Blutplättchen: Biochemie und Physiologie. *Hamostaseologie* 2003; 23: 149-158.
- KENFIELD SA, STAMPFER MJ, ROSNER BA, COLDITZ GA. Smoking and smoking cessation in relation to mortality in women. *JAMA* 2008; 299: 2037-2047.
- KESTIN AS, ELLIS PA, BARNARD MR, ERRICHETTI A, ROSNER BA, MICHELSON AD. Effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity. *Circulation* 1993; 88: 1502-1511.
- KIKANO GE, BROWN MT. Antiplatelet therapy for atherothrombotic disease: an update for the primary care physician. *Mayo Clin Proc* 2007; 82: 583-593.
- KOKKINOS P. Physical activity and cardiovascular disease prevention: current recommendations. *Angiology* 2008; 59: 26-29.
- LANGER HF, GAWAZ M. Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. *Thromb Haemost* 2008; 99: 480-486.
- LASNE D, JUDE B, SUSEN S. From normal to pathological hemostasis. *Can J Anaesth* 2006; 53: 2-11.
- LEE IM, SKERRETT PJ. Physical activity and all-cause mortality: what is the dose-response relation? *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33: 459-471; discussion 493-494.
- LIBBY P, RIDKER PM, MASERI A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143.
- LINDEMANN S, KRAMER B, DAUB K, STELLOS K, GAWAZ M. Molecular pathways used by platelets to initiate and accelerate atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 2007; 18: 566-573.
- LUSIS AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407: 233-241.
- MACCALLUM PK. Markers of hemostasis and systemic inflammation in heart disease and atherosclerosis in smokers. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 34-43.

- MALLIKA V, GOSWAMI B, RAJAPPA M. Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinicobiochemical perspective. *Angiology* 2007; 58: 513-522.
- MARGETTS BM, ROGERS E, WIDHAL K, REMAUT DE WINTER AM, ZUNFT HJ. Relationship between attitudes to health, body weight and physical activity and level of physical activity in a nationally representative sample in the European Union. *Public Health Nutr* 1999; 2: 97-103.
- MASSBERG S, BRAND K, GRUNER S, PAGE S, MULLER E, MULLER I, BERGMEIER W, RICHTER T, LORENZ M, KONRAD I, NIESWANDT B, GAWAZ M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 2002; 196: 887-896.
- MASSBERG S, GRUNER S, KONRAD I, GARCIA ARGUINZONIS MI, EIGENTHALER M, HEMLER K, KERSTING J, SCHULZ C, MULLER I, BESTA F, NIESWANDT B, HEINZMANN U, WALTER U, GAWAZ M. Enhanced in vivo platelet adhesion in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)-deficient mice. *Blood* 2004; 103: 136-142.
- MASSBERG S, KONRAD I, SCHURZINGER K, LORENZ M, SCHNEIDER S, ZOHLNHOEFER D, HOPPE K, SCHIEMANN M, KENNERKNECHT E, SAUER S, SCHULZ C, KERSTAN S, RUDELIUS M, SEIDL S, SORGE F, LANGER H, PELUSO M, GOYAL P, VESTWEBER D, EMAMBOKUS NR, BUSCH DH, FRAMPTON J, GAWAZ M. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med* 2006; 203: 1221-1233.
- MATIS MEDICAL. Impact-R™ System for Research Laboratories. 2009; Internet: http://www.matis-medical.com/impact-r_system_for_research_laboratories.html, letzter Zugriff: 12.6.2009.
- MAY AE, SEIZER P, GAWAZ M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 5-10.
- MCNICOL A, ISRAELS SJ. Platelets and anti-platelet therapy. *J Pharmacol Sci* 2003; 93: 381-396.
- MEADOWS TA, BHATT DL. Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation. *Circ Res* 2007; 100: 1261-1275.
- MEHTA NJ, KHAN IA. Cardiology's 10 greatest discoveries of the 20th century. *Tex Heart Inst J* 2002; 29: 164-171.
- MITTLEMAN MA, MACLURE M, TOFLER GH, SHERWOOD JB, GOLDBERG RJ, MULLER JE. Triggering of acute myocardial infarction by heavy physical exertion. Protection against triggering by regular exertion. Determinants of Myocardial Infarction Onset Study Investigators. *N Engl J Med* 1993; 329: 1677-1683.
- NAGHAVI M, LIBBY P, FALK E, CASSCELLS SW, LITOVSKY S, RUMBERGER J, BADIMON JJ, STEFANADIS C, MORENO P, PASTERKAMP G, FAYAD Z, STONE PH, WAXMAN S, RAGGI P, MADJID M, ZARRABI A, BURKE A, YUAN C, FITZGERALD PJ, SISCOVICK DS, DE KORTE CL, AIKAWA M, AIRAKSINEN KE, ASSMANN G, BECKER CR, CHESEBRO JH, FARB A, GALIS ZS, JACKSON C, JANG IK, KOENIG W, LODDER RA, MARCH K, DEMIROVIC J, NAVAB M, PRIORI SG, REKHTER MD, BAHR R, GRUNDY SM, MEHRAN R, COLOMBO A, BOERWINKLE E,

- BALLANTYNE C, INSULL W, JR., SCHWARTZ RS, VOGEL R, SERRUYS PW, HANSSON GK, FAXON DP, KAUL S, DREXLER H, GREENLAND P, MULLER JE, VIRMANI R, RIDKER PM, ZIPES DP, SHAH PK, WILLERSON JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation* 2003; 108: 1772-1778.
- PACKARD RR, LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 2008; 54: 24-38.
- PEREZ-GOMEZ F, BOVER R. [The new coagulation cascade and its possible influence on the delicate balance between thrombosis and hemorrhage]. *Rev Esp Cardiol* 2007; 60: 1217-1219.
- PULA G, KRAUSE M. Role of Ena/VASP proteins in homeostasis and disease. *Handb Exp Pharmacol* 2008: 39-65.
- RANGEMARK C, BENTHIN G, GRANSTROM EF, PERSSON L, WINELL S, WENNMALM A. Tobacco use and urinary excretion of thromboxane A2 and prostacyclin metabolites in women stratified by age. *Circulation* 1992; 86: 1495-1500.
- ROSS R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
- ROSS R, GLOMSET J, HARKER L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 1977; 86: 675-684.
- SACHAIS BS, KUO A, NASSAR T, MORGAN J, KARIKO K, WILLIAMS KJ, FELDMAN M, AVIRAM M, SHAH N, JARETT L, PONCZ M, CINES DB, HIGAZI AA. Platelet factor 4 binds to low-density lipoprotein receptors and disrupts the endocytic machinery, resulting in retention of low-density lipoprotein on the cell surface. *Blood* 2002; 99: 3613-3622.
- SBRANA S, DELLA PINA F, RIZZA A, BUFFA M, DE FILIPPIS R, GIANETTI J, CLERICO A. Relationships between optical aggregometry (type born) and flow cytometry in evaluating ADP-induced platelet activation. *Cytometry B Clin Cytom* 2008; 74: 30-39.
- SCHOBBER A, MANKA D, VON HUNDELSHAUSEN P, HUO Y, HANRATH P, SAREMBOCK IJ, LEY K, WEBER C. Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury. *Circulation* 2002; 106: 1523-1529.
- SCHWARZ UR, GEIGER J, WALTER U, EIGENTHALER M. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1145-1152.
- STARY HC, BLANKENHORN DH, CHANDLER AB, GLAGOV S, INSULL W, JR., RICHARDSON M, ROSENFELD ME, SCHAFFER SA, SCHWARTZ CJ, WAGNER WD, ET AL. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 120-134.
- STARY HC, CHANDLER AB, DINSMORE RE, FUSTER V, GLAGOV S, INSULL W, JR., ROSENFELD ME, SCHWARTZ CJ, WAGNER WD,

- WISSLER RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1512-1531.
- STARY HC, CHANDLER AB, GLAGOV S, GUYTON JR, INSULL W, JR., ROSENFELD ME, SCHAFFER SA, SCHWARTZ CJ, WAGNER WD, WISSLER RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994; 89: 2462-2478.
- STATISTIK AUSTRIA. Herz-Kreislaferkrankung häufigste Todesursache im höheren Erwachsenenalter. 9.154-123/08 2008; Internet: http://www.statistik.at/web_de/dynamic/statistiken/gesundheit/031448, letzter Zugriff: 14.04.2009.
- STEINBERG D, PARTHASARATHY S, CAREW TE, KHOO JC, WITZTUM JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915-924.
- STELLOS K, GNERLICH S, KRAEMER B, LINDEMANN S, GAWAZ M. Platelet interaction with progenitor cells: vascular regeneration or inquiry? *Pharmacol Rep* 2008; 60: 101-108.
- STOCKER R, KEANEY JF, JR. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84: 1381-1478.
- SWAIN DP, FRANKLIN BA. Comparison of cardioprotective benefits of vigorous versus moderate intensity aerobic exercise. *Am J Cardiol* 2006; 97: 141-147.
- SZMITKO PE, WANG CH, WEISEL RD, DE ALMEIDA JR, ANDERSON TJ, VERMA S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation* 2003; 108: 1917-1923.
- THIM T, HAGENSEN MK, BENTZON JF, FALK E. From vulnerable plaque to atherothrombosis. *J Intern Med* 2008; 263: 506-516.
- THOMPSON PD. *Exercise & Sports Cardiology*. McGraw-Hill Professional, New York, 2001; 10.
- THOMPSON PD, BUCHNER D, PINA IL, BALADY GJ, WILLIAMS MA, MARCUS BH, BERRA K, BLAIR SN, COSTA F, FRANKLIN B, FLETCHER GF, GORDON NF, PATE RR, RODRIGUEZ BL, YANCEY AK, WENGER NK. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation* 2003; 107: 3109-3116.
- THOMPSON PD, FRANKLIN BA, BALADY GJ, BLAIR SN, CORRADO D, ESTES NA, 3RD, FULTON JE, GORDON NF, HASKELL WL, LINK MS, MARON BJ, MITTLEMAN MA, PELLICCIA A, WENGER NK, WILLICH SN, COSTA F. Exercise and acute cardiovascular events placing the risks into perspective: a scientific statement from the American Heart

- Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism and the Council on Clinical Cardiology. *Circulation* 2007; 115: 2358-2368.
- VARGA-SZABO D, PLEINES I, NIESWANDT B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 403-412.
- VARON D, DARDIK R, SHENKMAN B, KOTEV-EMETH S, FARZAME N, TAMARIN I, SAVION N. A new method for quantitative analysis of whole blood platelet interaction with extracellular matrix under flow conditions. *Thromb Res* 1997; 85: 283-294.
- VILES-GONZALEZ JF, FUSTER V, BADIMON JJ. Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *Eur Heart J* 2004; 25: 1197-1207.
- VORCHHEIMER DA, BECKER R. Platelets in atherothrombosis. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 59-68.
- WAGNER DD, BURGER PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 2131-2137.
- WANG JS. Intense exercise increases shear-induced platelet aggregation in men through enhancement of von Willbrand factor binding, glycoprotein IIb/IIIa activation, and P-selectin expression on platelets. *Eur J Appl Physiol* 2004; 91: 741-747.
- WANG JS, JEN CJ, CHEN HI. Effects of exercise training and deconditioning on platelet function in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1668-1674.
- WANG JS, JEN CJ, CHEN HI. Effects of chronic exercise and deconditioning on platelet function in women. *J Appl Physiol* 1997; 83: 2080-2085.
- WANG JS, LI YS, CHEN JC, CHEN YW. Effects of exercise training and deconditioning on platelet aggregation induced by alternating shear stress in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 454-460.
- WARBURTON DE, NICOL CW, BREDIN SS. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ* 2006; 174: 801-809.
- WEBER C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res* 2005; 96: 612-616.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANISATION). Cardiovascular diseases. Fact sheet N°317 2007; Internet: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>, letzter Zugriff: 14.04.2009.
- WILLIAMS KJ, TABAS I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 551-561.
- WILLIAMS PT. Vigorous exercise, fitness and incident hypertension, high cholesterol, and diabetes. *Med Sci Sports Exerc* 2008; 40: 998-1006.
- WOMACK CJ, NAGELKIRK PR, COUGHLIN AM. Exercise-induced changes in coagulation and fibrinolysis in healthy populations and patients with cardiovascular disease. *Sports Med* 2003; 33: 795-807.
- WONISCH M, FRUHWALD F, HÖDL R, HOFMANN P, KLEIN W, KRAXNER W, MAIER R, POKAN R, SMEKAL G, WATZINGER N. Spiroergometrie in der Kardiologie - Grundlagen der Physiologie und Terminologie. *Journal für Kardiologie* 2003; 10 (9): 383 - 390.
- YANBAEVA DG, DENTENER MA, CREUTZBERG EC, WESSELING G, WOUTERS EF. Systemic effects of smoking. *Chest* 2007; 131: 1557-1566.

- YUSUF S, HAWKEN S, OUNPUU S, DANS T, AVEZUM A, LANAS F, MCQUEEN M, BUDAJ A, PAIS P, VARIGOS J, LISHENG L. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; 364: 937-952.
- YUSUF S, REDDY S, OUNPUU S, ANAND S. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 2001; 104: 2746-2753.

9 LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 05.01.1983
Geburtsort: Linz
Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung:

seit WS 2002	Studium der Ernährungswissenschaften, Wien
2001 / 2002	Studium der molekularen Biologie, Wien
1993 – 2001	BG/BRG Linz, Peuerbachstr. 35; Matura 9.6.2001
1989 – 1993	Volksschule Puchenu

Berufserfahrung:

08/2007 - 09/2007	Praktikum am IMSB (Institut für medizinische Sportbetreuung): Verfassen von Fachartikeln, Auswerten von Ernährungsprotokollen, Ernährungsberatung für Sportler, Erstellen von Speiseplänen
07/2007, 07/2006	Praktikum in der Küche der SVAdgW, Wien: Essenszubereitung, Menüzusammenstellung, HACCP-Bestimmungen
seit 11/2008	Gesundheitstrainerin bei BBRZ Reha GmbH Wien
seit 02/2006	Fitnesstrainerin an der VHS Wien

Weiterbildung:

2008/09	Ausbildung zum Gesund- und Vitalcoach (USI)
2004/05	Ausbildung zur Aerobic- und Fitnesslehrerin (USI)