

Institut für Ernährungswissenschaften
(Direktor: Prof. Dr. habil. oec. troph. Klaus Eder)
der Landwirtschaftlichen Fakultät
(Dekan: Prof. Dr.-Ing. habil. Peter Pickel)
der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

**„Modulation der Thrombozytenfunktion durch
bioaktive Substanzen
der Sojabohne (*Glycine max*[L]Merr.)“**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Trophologie (Dr. troph.)

vorgelegt von

Diplom-Ernährungswissenschaftlerin
Kerstin Borgwardt

Halle/Saale 2006

urn:nbn:de:gbv:3-000010316

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010316>]

Institut für Ernährungswissenschaften
(Direktor: Prof. Dr. habil. oec. troph. Klaus Eder)
der Landwirtschaftlichen Fakultät
(Dekan: Prof. Dr.-Ing. habil. Peter Pickel)
der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

**„Modulation der Thrombozytenfunktion durch
bioaktive Substanzen
der Sojabohne (*Glycine max*[L]Merr.)“**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Trophologie (Dr. troph.)

vorgelegt von

Diplom-Ernährungswissenschaftlerin

Kerstin Borgwardt

geb. am 22.05.1976

in Güstrow

Gutachter: Prof. Dr. habil. oec. troph. Klaus Eder
Prof. Dr. habil. oec. troph. Gabriele Stangl
Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Gardemann

Verteidigung am: 24.04.2006

Halle/Saale 2006

urn:nbn:de:gbv:3-000010316

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010316>]

Meinen Eltern gewidmet.

Der Leser mag dort,
Wo er ebenso sicher ist wie ich,
Mit mir weitergehen;
Wo er ebenso zögert,
Mich befragen;
Wo er bei sich einen Irrtum erkennt,
Sich an mich halten;
Wo er einen bei mir erkennt,
Mich zurückrufen.

A. Augustinus (354-430 nChr.)
in De Trinitate I,2,5

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K. Eder für die Unterstützung bei der Einreichung der Dissertation an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg sowie für die gute Kooperation im Rahmen des Netzwerkprojektes „Molekulare Ernährungsforschung“ bedanken.

Ein großer Dank gilt ferner Herrn Prof. Dr. Dr. A. Gardemann aus dem Institut der Pathologischen Biochemie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg für die sehr gute Betreuung während der Promotion.

Herrn PD. Dr. A. Götte und seinen Mitarbeitern aus der Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg möchte ich mich für die Blutentnahmen bei herzkranken Patienten sowie für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Für die Benutzung der technischen Geräte und für die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich bei der Abteilung Experimentelle Operative Medizin der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Halangk. Weiterhin danke ich den Mitarbeitern Frau Dr. B. Brandt-Nedelev aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. W. Halangk sowie Frau Dr. C. Schmidt aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. Außerdem danke ich Herrn Dr. A. Köster für die zahlreichen Blutabnahmen im Vertretungsfall.

Gleichzeitig bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Institutes der Pathologischen Biochemie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, insbesondere den technischen Mitarbeitern Frau S. Bonifatius, Frau E. Wölfel sowie Frau M. Lotzing für ihre Mitarbeit an diesem Projekt.

Meinen Eltern, Peter und Ingrid Borgwardt, gilt für ihre persönliche Unterstützung und für ihren Beistand ein ganz besonderer Dank. Ein weiterer Dank gilt Herrn cand. Dipl.-Pfleger (FH) Stefan Schöbel. Ferner möchte ich mich bei meinen Freunden und Bekannten bedanken, die mich unterstützt haben.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die finanzielle Unterstützung des Themas im Netzwerkprojekt „Molekulare Ernährungsforschung“.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
II	TABELLENVERZEICHNIS	VI
III	ERKLÄRUNG DER ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN	IX
1	EINLEITUNG	1
1.1	Sojabohne und Sojaprotein	1
1.1.1	Bioaktive Substanzen der Sojabohne	3
1.1.2	Resorption von Sojaproteinen und bioaktiven Substanzen der Sojabohne	3
1.1.3	Wirkungen des Isoflavons Genistein	7
1.2	Thrombozyten	10
1.2.1	Morphologie der Thrombozyten	11
1.2.2	Physiologie der Thrombozyten	14
1.2.3	Stimulatoren der Thrombozytenaktivierung	17
1.2.4	Rolle der Thrombozyten bei der Entstehung von Herz-Kreislaufkrankungen unter besonderer Berücksichtigung der koronaren Herzerkrankung (KHK) und des Vorhofflimmerns (VHF)	18
1.2.4.1	<i>Atherosklerose als eine Ursache der KHK und Rolle der Thrombozyten</i>	18
1.2.4.2	<i>Vorhofflimmern (VHF)</i>	20
2	ZIELSETZUNG	22
3	MATERIAL UND METHODEN	24
3.1	Material	24
3.1.1	Materialien der aggregometrischen Messungen	24
3.1.2	Materialien der durchflusszytometrischen Messungen	26
3.1.3	Sonstige Materialien	26
3.2	Methoden	27
3.2.1	Evaluierung der Probanden und Patienten	27
3.2.1.1	<i>Probanden</i>	27
3.2.1.2	<i>Patienten</i>	28

3.2.2	Bestimmung der Thrombozytenzahl	28
3.2.3	Aggregometrie	29
3.2.3.1	<i>Grundlagen der Aggregometrie</i>	29
3.2.3.2	<i>Probenaufbereitung und aggregometrische Analyse</i>	29
3.2.3.3	<i>Messung der Thrombozytenaggregation</i>	30
3.2.3.4	<i>Etablierung der aggregometrischen Messung</i>	35
3.2.4	Durchflusszytometrie	38
3.2.4.1	<i>Grundlagen der Durchflusszytometrie</i>	38
3.2.4.2	<i>Mehrfarbenfluoreszenzanalyse</i>	38
3.2.4.3	<i>Probenaufbereitung und durchflusszytometrische Analyse</i>	39
3.2.5	Statistische Methoden und statistische Auswertung	54
3.2.5.1	<i>Mittelwert und Standardabweichung</i>	54
3.2.5.2	<i>Mann-Whitney-U-Test und Test nach ANOVA</i>	54
4	ERGEBNISSE	55
4.1	Auswertung der Probanden und Patienten	55
4.1.1	Auswertung gesunder Probanden	55
4.1.2	Auswertung herzkranker Patienten	56
4.1.3	Thrombozyten	56
4.1.3.1	<i>Thrombozyten gesunder Probanden</i>	56
4.1.3.2	<i>Thrombozyten herzkranker Patienten</i>	58
4.2	Aggregometrische Vorversuche	58
4.2.1	Potenzieller Einfluss von Lösungsmitteln der Testsubstanzen auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen	58
4.2.1.1	<i>ADP-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	58
4.2.1.2	<i>Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	59
4.2.1.3	<i>Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	59
4.2.1.4	<i>Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	59
4.2.2	Vorinkubationszeit als ein möglicher Einflussfaktor auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen	59
4.2.3	Temperatur als ein möglicher Einflussfaktor auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen	61
4.3	Testsubstanzen in der aggregometrischen Analyse bei gesunden Probanden	62

4.3.1	Untersuchungen möglicher Wirkungen von Aminosäuren auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen	62
4.3.1.1	<i>ADP-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	62
4.3.1.2	<i>Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	63
4.3.1.3	<i>Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	63
4.3.1.4	<i>Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	63
4.3.2	Untersuchungen möglicher Wirkungen von Dipeptiden auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen	63
4.3.2.1	<i>ADP-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	63
4.3.2.2	<i>Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	64
4.3.2.3	<i>Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	64
4.3.2.4	<i>Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	64
4.3.3	Untersuchungen möglicher Wirkungen von Tripeptiden auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen	64
4.3.3.1	<i>ADP-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	65
4.3.3.2	<i>Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	65
4.3.3.3	<i>Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	65
4.3.3.4	<i>Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	65
4.3.4	Untersuchungen möglicher Wirkungen von Genistein auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen	65
4.3.4.1	<i>ADP-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	65
4.3.4.2	<i>Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	66
4.3.4.3	<i>Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	66
4.3.4.4	<i>Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	66
4.4	Untersuchungen zu potenziellen Wechselwirkungen zwischen den Testsubstanzen	71
4.4.1	Untersuchungen zu potenziellen Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren und dem Isoflavon Genistein	71
4.4.1.1	<i>ADP-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	71
4.4.1.2	<i>Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	72
4.4.1.3	<i>Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	72
4.4.1.4	<i>Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	72
4.4.2	Untersuchungen zu potenziellen Wechselwirkungen zwischen Dipeptiden und dem Isoflavon Genistein	73
4.4.2.1	<i>ADP-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	73
4.4.2.2	<i>Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	75
4.4.2.3	<i>Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	75
4.4.2.4	<i>Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	78

4.4.3	Untersuchungen zu potenziellen Wechselwirkungen zwischen Tripeptiden und dem Isoflavon Genistein	87
4.4.3.1	<i>ADP-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	87
4.4.3.2	<i>Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	87
4.4.3.3	<i>Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	87
4.4.3.4	<i>Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	88
4.5	Testsubstanzen in den aggregometrischen Analysen bei herzkranken Patienten	97
4.5.1	Untersuchungen der Testsubstanzen auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen bei herzkranken Patienten	97
4.5.1.1	<i>Dipeptid Glu-Glu und Tripeptid Glu-Glu-Glu</i>	97
4.5.1.2	<i>Genistein</i>	97
4.5.2	Untersuchungen zu potenziellen Wechselwirkungen der Testsubstanzen auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen bei herzkranken Patienten	98
4.5.2.1	<i>ADP-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	98
4.5.2.2	<i>Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	98
4.5.2.3	<i>Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation</i>	99
4.6	Thrombozytärer Aktivierungszustand von gesunden Probanden und herzkranken Patienten anhand durchflusszytometrischer Untersuchungen	99
4.6.1	CD 62PE	99
4.6.2	CD 41PE/CD 45FITC	101
4.6.3	CD 41PerCP/PAC-1FITC/CD 62 PE	101
5	DISKUSSION	102
5.1	Methodendiskussion	102
5.1.1	Probanden- und Patientenkollektiv	102
5.1.2	Aggregometrie	103
5.1.3	Lösungsmittel	103
5.1.4	Inkubationszeit und Inkubationstemperatur	104
5.1.5	Agonisten	104
5.1.6	Durchflusszytometrie	105
5.2	Produkte der Sojabohne und Sojabohneninhaltsstoffe	107

5.3	Zielsetzung der Studie	110
5.4	Physiologie der Flavonoide	111
5.5	Wirkungen der Flavonoide	113
5.5.1	Wirkungen des Isoflavons Genistein auf die Thrombozyten	114
5.5.1.1	<i>Wirkungen des Genisteins auf die ADP- und Adrenalin-induzierten Thrombozytenaggregationen</i>	115
5.5.1.2	<i>Wirkungen des Genisteins auf die Kollagen- und Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregationen</i>	117
5.5.2	Vergleich der eingesetzten Genisteinkonzentrationen mit anderen publizierten Studien	119
5.6	Physiologie der Proteine	122
5.6.1	Allgemeine Vorbemerkungen	122
5.6.2	Resorption und Metabolisierung der Sojaproteine	124
5.7	Wirkungen der Sojaproteine	126
5.7.1	Wirkungen von Peptiden auf die Thrombozyten	126
5.7.2	Vergleich der eingesetzten Peptidkonzentrationen mit anderen publizierten Studien	129
5.8	Wechselwirkungen zwischen Genistein und Aminosäuren bzw. Peptiden	130
5.9	Übertragbarkeit der <i>in vitro</i> erhobenen Befunde auf <i>in vivo</i> Bedingungen	131
6	ZUSAMMENFASSUNG	136
6	SUMMARY	139
7	ANHANG	143
8	LITERATURVERZEICHNIS	163
	Lebenslauf	
	Eidesstattliche Erklärung	

I ABBILDUNGSVERZEICHNIS

	Seite
Abbildung 1. Globale Sojaproduktion und die internationale Einordnung der Sojabohne als Proteinquelle mit a) der Sojaproduktion im Jahr 2003 weltweit und b) Anteil der Sojabohne am weltweiten Proteinverzehr 2003.	2
Abbildung 2. Verdauung und Resorption von Proteinen im Dünndarm.	4
Abbildung 3. Di- und Tripeptidtransport (3) mit schematisierter Struktur des humanen Peptidtransporters hPEPT 1 an der epithelialen Bürstensaummembran des Dünndarms und dessen Bezug zu dem apikalen Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher (2) und der basolateralen Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (1).	5
Abbildung 4. Schematische Präsentation des intestinalen Metabolismus von Genisteinverbindungen ausgehend von einer Tofudiat am Modell des perfundierten Rattendünndarms.	6
Abbildung 5. Verlauf der Sterblichkeit aller Altersgruppen an der koronaren Herzerkrankung in der europäischen Region seit 1970.	9
Abbildung 6. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Thrombozyten mit a) inaktivierten Thrombozyten, b) aktivierter Thrombozyt mit Spreizung und c) aktivierter Thrombozyt mit Pseudopodien.	12
Abbildung 7. Thrombozytenkohäsion über Ausbildung einer Fibrinogenbrücke nach Aktivierung.	17
Abbildung 8. Signalkaskade der Thrombozytenaktivierung und Rolle der G-Proteine.	19
Abbildung 9. Beschreibung der Erregungsleitung am Herzen mit dargestellten Elektrokardiogrammen.	21
Abbildung 10. Prinzip der aggregometrischen Messungen.	31
Abbildung 11. Aggregationskurven der verwendeten Induktoren eines gesunden Probanden im Originalausdruck des Aggregometers.	32
Abbildung 12. Auswertung einer Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation.	37
Abbildung 13. Messprinzip eines Durchflusszytometers.	41
Abbildung 14. Probenaufbereitung zur funktionellen Charakterisierung der Thrombozyten in der Einfarben- und Zweifarbenimmunfluoreszenzanalyse.	44
Abbildung 15. Probenaufbereitung zur funktionellen Charakterisierung der Thrombozyten in der Dreifarbenimmunfluoreszenzanalyse.	46

Abbildung 16.	Auswahl einer unmarkierten, unaktivierten Thrombozytenpopulation in der Vollblutprobe im DotPlot.	47
Abbildung 17.	Darstellung einer quantitativen Einfarbenimmunfluoreszenz mittels DotPlot-Analyse und dazugehöriger Quadrantenstatistik anhand unaktivierter Thrombozyten mit a) unaktivierte Thrombozyten, CD 62PE-markiert b) TRAP-aktivierte Thrombozyten, CD 62PE-markiert.	48
Abbildung 18.	Darstellung einer quantitativen Zweifarbenimmunfluoreszenz mittels DotPlot-Analyse und dazugehöriger Quadrantenstatistik anhand unaktivierter Thrombozyten mit a) FSC vs. SSC, b) CD 41PE vs. SSC, c) CD 45FITC vs. CD 41PE und d) Histogrammdarstellung der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate.	49
Abbildung 19.	Darstellung einer quantitativen Zweifarbenimmunfluoreszenz mittels DotPlot-Analyse und dazugehöriger Quadrantenstatistik anhand TRAP-aktivierter Thrombozyten mit a) FSC vs. SSC, b) CD 41PE vs. SSC, c) CD 45FITC vs. CD 41PE und d) Histogrammdarstellung der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate.	50
Abbildung 20.	Darstellung einer quantitativen Dreifarbenimmunfluoreszenz mittels DotPlot-Analyse und dazugehöriger Quadrantenstatistik anhand unaktivierter Thrombozyten mit a) FSC vs. SSC, b) CD 41aPerCP vs. SSC und c) PAC-1FITC vs. CD 62PE.	51
Abbildung 21.	Darstellung einer quantitativen Dreifarbenimmunfluoreszenz mittels DotPlot-Analyse und dazugehöriger Quadrantenstatistik anhand ADP-aktivierter Thrombozyten mit a) FSC vs. SSC, b) CD 41aPerCP vs. SSC und c) PAC-1FITC vs. CD 62PE.	52
Abbildung 22.	Potenzielle Einflüsse von Dimethylsulfoxid und isotonischer Kochsalzlösung als Lösungsmittel der Testsubstanzen auf die Thrombozytenaggregationen mit a) ADP b) Adrenalin, c) Kollagen und d) Arachidonsäure als Agonisten.	60
Abbildung 23.	Aggregationsverläufe in Abhängigkeit unterschiedlicher Vorinkubationszeiten der ADP-, Adrenalin-, Kollagen- und Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregationen.	61
Abbildung 24.	Vergleich zwischen 23 °C und 37 °C auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen mit ADP, Adrenalin, Kollagen und Arachidonsäure als Agonisten.	62
Abbildung 25.	Einfluss ausgewählter Aminosäuren auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen mit a) ADP, b) Adrenalin, c) Kollagen und d) Arachidonsäure als Agonisten.	67
Abbildung 26.	Einfluss ausgewählter Dipeptide auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen mit a) ADP, b) Adrenalin, c) Kollagen und d) Arachidonsäure als Agonisten.	68
Abbildung 27.	Einfluss ausgewählter Tripeptide auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen mit a) ADP, b) Adrenalin, c) Kollagen und d) Arachidonsäure als Agonisten.	69

Abbildung 28.	Wirkung des Genisteins auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen mit a) ADP, b) Adrenalin, c) Kollagen und d) Arachidonsäure als Agonisten.	70
Abbildung 29.	Darstellung der synergistischen Wechselwirkung zwischen Genistein und Asparagin in der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation.	72
Abbildung 30.	Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Glutamat auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) kein synergistischer Effekt, b) synergistischer Effekt und c) Volleffekt durch Genistein.	74
Abbildung 31.	Darstellung der synergistischen Wechselwirkungen zwischen Genistein und Dipeptiden in der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation mit a) Glutamat-Glutamat, b) Aspartat-Glutamat und c) Glutamat-Aspartat als Dipeptide.	76
Abbildung 32.	Darstellung der synergistischen Wechselwirkungen zwischen Genistein und Dipeptiden in der Adrenalin-induzierten Thrombozytenaggregation mit a) Glutamat-Aspartat als Dipeptid und die synergistische Wechselwirkung in der Kollagen-induzierten Aggregation mit b) Glutamat-Glutamat und c) Glutamat-Aspartat als Dipeptide.	77
Abbildung 33.	Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Glutamat-Glutamat auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.	80
Abbildung 34.	Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Glutamat-Glutamat auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.	81
Abbildung 35.	Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Aspartat-Glutamat auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.	82
Abbildung 36.	Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Aspartat-Glutamat auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.	83
Abbildung 37.	Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Aspartat-Aspartat auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.	84
Abbildung 38.	Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Serin-Glutamat auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.	85

Abbildung 39.	Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Valin-Aspartat auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.	86
Abbildung 40.	Darstellung der synergistischen Wechselwirkungen zwischen Genistein und Tripeptiden auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) Valin-Prolin-Leucin, b) Aspartat-Aspartat-Aspartat und c) Lysin-Lysin-Lysin als Tripeptide.	90
Abbildung 41.	Darstellung der synergistischen Wechselwirkungen zwischen Genistein und Tripeptiden auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) Glutamat-Glutamat-Glutamat und b) Aspartat-Aspartat-Aspartat als Tripeptide.	91
Abbildung 42.	Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Glutamat-Glutamat-Glutamat in der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.	92
Abbildung 43.	Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Glutamat-Glutamat-Glutamat in der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.	93
Abbildung 44.	Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Glutamat-Glutamat-Glutamat in der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.	94
Abbildung 45.	Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Aspartat-Aspartat-Aspartat in der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischen Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.	95
Abbildung 46.	Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Aspartat-Aspartat-Aspartat in der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischen Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.	96
Abbildung 47.	Wirkung des Genisteins auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen herzkranker Patienten mit ADP, Adrenalin, Kollagen und Arachidonsäure als Agonisten.	98
Abbildung 48.	Darstellung der synergistischen Wechselwirkungen bei herzkranken Patienten zwischen Genistein und Peptiden in den Adrenalin- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregationen mit a) Glutamat-Glutamat und b), c) Glutamat-Glutamat-Glutamat als Peptide.	100
Abbildung 49.	Verschiedene Produkte aus Sojabohnen.	108
Abbildung 50.	Vergleich der Bioverfügbarkeit verschiedener Flavonoide.	114
Abbildung 51.	Ein möglicher Angriffspunkt des Genisteins in der ADP-vermittelten Thrombozytenaggregation.	116

Abbildung 52.	Die Hemmung der Syk-Phosphorylierung in der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation (Aktivierung des GP VI Rezeptors) durch Genistein.	118
Abbildung 53.	Arachidonsäurekaskade mit Bildung von Thromboxan A ₂ .	118
Abbildung 54.	Schema nach KOTTRA et al. für den Transport von Dipeptiden durch den humanen Transporter PEPT 1 vom Darmlumen (extrazellulär) in die Mukosazelle (intrazellulär).	124
Abbildung 55.	Probandeninformation.	143
Abbildung 56.	Einverständniserklärung der Probanden.	144
Abbildung 57.	Fragebogen.	145
Abbildung 58.	Patienteninformation.	146
Abbildung 59.	Einverständniserklärung der Patienten.	147

II TABELLENVERZEICHNIS

	Seite
Tabelle 1. Bewertung proteinreicher Lebensmittel nach PDCAAS sowie Darstellung der Aminosäurezusammensetzung von Sojabohnenschrot	2
Tabelle 2. Relevanz der Studien, die sich mit ausgewählten Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankung beschäftigen	11
Tabelle 3. Speichersubstanzen der thrombozytären Granula	15
Tabelle 4. Isoflavon mit Firmenherkunft	24
Tabelle 5. Aminosäuren, Di- und Tripeptide mit Firmenherkunft	24
Tabelle 6. Physiologische Induktoren mit Firmenherkunft	25
Tabelle 7. Antikörper mit Firmenherkunft	26
Tabelle 8. Ausgewählte technische Parameter des PAP 4ff	30
Tabelle 9. Konzentrationen der Induktoren und deren Einsatzmenge in den aggregometrischen Messungen nach Angaben des Herstellers	33
Tabelle 10. Untersuchte Prüfsubstanzen in der Aggregometrie	34
Tabelle 11. Pipettierolumina und Lösungsmittel der Aminosäuren und Peptide	36
Tabelle 12. Aggregationsreferenzbereiche physiologischer Induktoren	37
Tabelle 13. Charakterisierung der Fluoreszenzfarbstoffe in der Durchflusszytometrie	39
Tabelle 14. Anzahl der gesunden Probanden und Anzahl der Blutentnahmen	55
Tabelle 15. Studienrelevante Merkmale der gesunden Probanden	55
Tabelle 16. Anzahl der herzkranken Patienten	56
Tabelle 17. Alter der herzkranken Patienten	56
Tabelle 18. Die häufigsten Diagnosen des Patientenkollektivs und Auflistung häufig verabreichter Medikamente	57
Tabelle 19. Thrombozyten gesunder Probanden nach Anzahl und Mittlerem Plättchenvolumen	57
Tabelle 20. Thrombozyten herzkranker Patienten nach Anzahl und Mittlerem Plättchenvolumen	58
Tabelle 21. Synergistische Wechselwirkungen unterschiedlicher Substanzen mit Genistein auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen	89

Tabelle 22.	Anteil positiv-markierter Thrombozyten bei gesunden Probanden und herzkranken Patienten mit CD 62PE, CD 41PE/CD 45FITC und CD 62 PE/PAC-1FITC/CD 41PerCP als Marker.	101
Tabelle 23.	Vergleich der eingesetzten Agonistenkonzentrationen mit denen anderer aggregometrischen Studien.	106
Tabelle 24.	Gesamtisoflavongehalt und Genisteinkonzentrationen in verschiedenen Nahrungsmitteln.	109
Tabelle 25.	Übersicht der Inhaltsstoffe in Sojabohnensamen.	109
Tabelle 26.	Hauptklassen der Flavonoide mit ausgewählten Beispielen.	112
Tabelle 27.	Serumkonzentration an Daidzein und Genistein.	119
Tabelle 28.	Verhältnis zwischen eingesetzter Genistein- und Agonistenkonzentrationen in der vorliegenden Studie.	120
Tabelle 29.	Verhältnis zwischen eingesetzter Genistein- und Agonistenkonzentrationen in anderen publizierten Studien.	121
Tabelle 30.	Humane Plasmakonzentrationen ausgewählter Aminosäuren.	125
Tabelle 31.	Synergistische Wechselwirkungen unterschiedlicher Substanzen mit Genistein auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen.	131
Tabelle 32.	Theoretischer Aufbau einer nachfolgenden <i>in vivo</i> Studie zur Überprüfung der <i>in vitro</i> erhaltenen Befunde bioaktiver Substanzen.	134
Tabelle 33.	Zusammenfassende Darstellung der <i>in vitro</i> thrombozytenhemmenden bioaktiven Substanzen (eingeteilt nach Agonisten)	137
Tabelle 34.	Influence of bioactive amino acids or peptides \pm genistein on agonist induced platelet aggregation <i>in vitro</i>	142
Tabelle 35.	Häufig vorkommende Dipeptide in den Sojaproteinen β -Conglycinin und Glycinin	148
Tabelle 36.	Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Aminosäuren in den ADP-induzierten Thrombozytenaggregationen	149
Tabelle 37.	Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Dipeptide in den ADP-induzierten Thrombozytenaggregationen	150
Tabelle 38.	Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Tripeptide in den ADP-induzierten Thrombozytenaggregationen	151
Tabelle 39.	Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Aminosäuren in den Adrenalin-induzierten Thrombozytenaggregationen	152
Tabelle 40.	Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Dipeptide in den Adrenalin-induzierten Thrombozytenaggregationen	153

Tabelle 41.	Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Tripeptide in den Adrenalin-induzierten Thrombozytenaggregationen	154
Tabelle 42.	Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Aminosäuren in den Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregationen	155
Tabelle 43.	Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Dipeptide in den Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregationen	156
Tabelle 44.	Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Tripeptide in den Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregationen	157
Tabelle 45.	Darstellung der Aminosäuren als Einzelsubstanzen in der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation	158
Tabelle 46.	Darstellung der Dipeptide als Einzelsubstanzen in der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation	159
Tabelle 47.	Darstellung der Tripeptide als Einzelsubstanzen in der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation	159
Tabelle 48.	Darstellung der Messergebnisse der synergistisch wirksamen Gemische aus Aminosäuren, Di- und Tripeptiden und Genistein in den Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregationen bei gesunden Probanden mit Darstellung der jeweiligen Genisteinkonzentrationsbereiche	160
Tabelle 49.	Darstellung der Signifikanzniveaus der synergistisch wirksamen Gemische aus Aminosäuren, Di- und Tripeptiden in den Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen bei gesunden Probanden	161
Tabelle 50.	Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus in den Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen	162

III ERKLÄRUNG DER ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN

A

ADP	<u>A</u> denosin <u>d</u> iphosphat
AMP	<u>A</u> denosin <u>m</u> onophosphat
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
ATPase	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat <u>a</u> se
Arg	<u>A</u> rginin
Asn	<u>A</u> sparagin
Asp	<u>A</u> spartat
AV-Knoten	<u>A</u> trioventrikulär <u>k</u> noten
ASS	<u>A</u> zetyl <u>s</u> alizyl <u>s</u> äure

B

BcL	<u>B</u> - <u>C</u> ell- <u>L</u> ymphoma
bzw.	<u>b</u> eziehungs <u>w</u> eise
BMI	<u>B</u> ody <u>M</u> ass <u>I</u> ndex
BGS	<u>B</u> undesgesundheits <u>s</u> urveys

C

C	<u>C</u> arbon
CL ⁻	<u>C</u> hloridionen
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiations
Caco	<u>C</u> olon- <u>C</u> arcinom
CASS	<u>C</u> oronary <u>A</u> rtery <u>S</u> urgery <u>S</u> tudy
cAMP	<u>c</u> yklic <u>A</u> denosine <u>M</u> onophosphat
Ca ²⁺	<u>K</u> alziumionen
c	<u>K</u> onzentration

D

d.h.	<u>d</u> as <u>h</u> eißt
DAG	<u>D</u> iacyl <u>g</u> lycerol
DTS	<u>D</u> ense <u>T</u> ubular <u>S</u> ystem
DNA	<u>D</u> eoxyribonucleic <u>a</u> cid
DMDE	<u>D</u> imethyl <u>d</u> iisoeugenol
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid

E

EKG	<u>E</u> lektro <u>k</u> ardiogramm
EGF	<u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> aktor
et al	<u>e</u> t <u>a</u> lteri
EU	<u>E</u> uropäische <u>U</u> nion
EMBL-EBI	<u>E</u> uropean <u>M</u> olekular <u>B</u> iology <u>L</u> aboratory- <u>E</u> uropean <u>B</u> ioinforma- <u>t</u> ics <u>I</u> nstitute
EAAT	<u>E</u> xitatory <u>A</u> mino <u>A</u> cid <u>T</u> ransporter

F

fL	<u>F</u> emtoliter
FGF	<u>F</u> ibroblast <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
FL	<u>F</u> luoreszenz
FACS	<u>F</u> luorescence <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orter
FITC	<u>F</u> luoreszein <u>i</u> s <u>o</u> thiocyanat
FDA	<u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> dmistration
FSC	<u>F</u> orward <u>S</u> catter

G

GC-MS	<u>G</u> as <u>C</u> hromatography- <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry
GUS	<u>G</u> emeinschaft <u>u</u> nabhängiger <u>S</u> tstaaten
Glu	<u>G</u> lutamat
Gln	<u>G</u> lutamin
Gly	<u>G</u> lycin
GP (Gp)	<u>G</u> lykoprotein
G	<u>G</u> -Protein
g	<u>G</u> ramm
g/Tag	<u>G</u> ramm pro <u>T</u> ag
G-Proteine	<u>G</u> uaninnukleotid-bindendes <u>P</u> rotein
GMP	<u>G</u> uanosinmonophat
GTP	<u>G</u> uanosintriphosphat

H

HDL	<u>H</u> igh <u>D</u> ensity <u>L</u> ipoprotein
HMWK	<u>H</u> igh <u>M</u> olekular <u>W</u> eight <u>K</u> ininogen
HPLC	<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
hPEPT	<u>h</u> umaner <u>P</u> eptidtransporter
PEPT	<u>P</u> eptidtransporter
h	<u>S</u> tunde
H ⁺	<u>W</u> asserstoffprotonen
H ₂ O	<u>W</u> asser

I

IP ₃	<u>I</u> nositol-1,4,5-triphosphat
ICAM	<u>I</u> ntercellular <u>A</u> dhesion <u>M</u> olecule
Ile	<u>I</u> soleucin
IK	<u>I</u> otonische <u>K</u> ochsalzlösung

J

J	<u>J</u> ahre
---	---------------

K

K ⁺	<u>K</u> aliumionen
Kat.-Nr.	<u>K</u> atalognummer
kg	<u>K</u> ilogramm
kg/m ²	<u>K</u> ilogramm pro <u>Q</u> adratmeter
KG	<u>K</u> örpergewicht
KHK	<u>K</u> oronare <u>H</u> erzerkrankung

L

Leu	<u>L</u> euцин
LED	<u>L</u> ight <u>E</u> mitting <u>D</u> iode
L	<u>L</u> iter
LDL	<u>L</u> ow <u>D</u> ensity <u>L</u> ipoprotein
Lys	<u>L</u> ysin

M

MlgG	<u>M</u> aus- <u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
Mrd	<u>M</u> illiarden
mg	<u>M</u> illigramm
mg/mL	<u>M</u> illigramm pro <u>M</u> illiliter
mm	<u>M</u> illimeter
mmol/L (mM)	<u>M</u> illimol pro <u>L</u> iter (millimolar)
mm/min	<u>M</u> illimeter pro <u>M</u> inute
Mio	<u>M</u> illionen
mL	<u>M</u> illiliter

	min	Minute
	MPV	<u>M</u> ittleres <u>P</u> lättchen <u>v</u> olumen
	m	mol
	M	molar (Mol pro Liter)
	mol/L	Mol pro Liter (molar)
	MONICA	<u>M</u> onitoring <u>T</u> rends and <u>D</u> eterminants in <u>C</u> ardiovascular <u>D</u> isease
	MCP	<u>M</u> onocyte <u>C</u> hemoattractant <u>P</u> rotein
	MLCK	<u>M</u> yosin <u>L</u> ight <u>C</u> hain <u>K</u> inase
	MRP	<u>M</u> ultidrug- <u>R</u> esistance- <u>P</u> rotein
<u>N</u>		
	n	Anzahl der Messungen
	ng	Nanogramm
	ng/mL	Nanogramm pro Milliliter
	nm	Nanometer
	nmol	Nanomol
	Na ⁺	Natriumionen
	NO	<u>N</u> itrogen <u>o</u> xid
	NFκB	<u>N</u> uclear <u>F</u> actor <u>K</u> appa <u>B</u>
<u>Q</u>		
	OCS	<u>O</u> pen <u>C</u> analicular <u>S</u> ystem
<u>P</u>		
	PEPT	<u>P</u> eptid <u>t</u> ransporter
	PHT	<u>P</u> eptid <u>H</u> istidin <u>T</u> ransporter
	PerCP	<u>P</u> eridin- <u>C</u> hlorophyll- <u>P</u> rotein
	Phe	<u>P</u> henylalanin
	P	Phosphat
	PBS	<u>P</u> hosphat <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
	PI-3-K	<u>P</u> hosphoinositol- <u>3</u> - <u>K</u> inase
	PLC	<u>P</u> hospholipase <u>C</u>
	P-MLC	<u>P</u> hosphorylated <u>M</u> yosin <u>L</u> ight <u>C</u> hain
	PE	<u>P</u> hycoerythrin
	PADGEM	<u>P</u> latelet <u>A</u> ctivation <u>D</u> ependent <u>G</u> ranule <u>E</u> xternal <u>M</u> embrane
	PAI	<u>P</u> lasminogen <u>A</u> ctivator <u>I</u> nhibitor
	PAF	<u>P</u> lättchenaktivierender <u>F</u> aktor
	PAP	<u>P</u> lättchenarmes <u>P</u> lasma
	PRP	<u>P</u> lättchenreiches <u>P</u> lasma
	PDGF	<u>P</u> latelet <u>D</u> erived <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
	PDR	Poly-Aspartoyl-L-Arginin im Ein-Buchstaben-Code
	pH	pondus <u>H</u> ydrogenii (pH-Wert)
	Pro	<u>P</u> rolin
	PG	<u>P</u> rostaglandin
	PDCAAS	<u>P</u> rotein <u>D</u> igestibility <u>C</u> orrected <u>A</u> mino <u>A</u> cid <u>S</u> core
	PKC	<u>P</u> roteinkinase <u>C</u>
	POT	<u>P</u> rotonen-gekoppelter <u>O</u> ligopeptid <u>T</u> ransporter
<u>Q/R</u>		
	RGDS	Arginin-Glycin-Aspartat-Serin im Ein-Buchstaben-Code
	RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
	RNA	<u>R</u> ibonucleic <u>a</u> cid
<u>S</u>		
	Sar	<u>S</u> arcosin
	s	Sekunde
	Ser	<u>S</u> erin
	SSC	<u>S</u> ide <u>S</u> catter

	SGLT	<u>S</u> odium- <u>G</u> lucose- <u>C</u> o <u>t</u> ransporter
	S	Svedberg-Einheit
<u>I</u>		
	TRAP	<u>T</u> hrombin <u>R</u> ezeptor <u>A</u> ktivierendes <u>P</u> eptid
	TxA	Thromboxan
	Thr/L	Thrombozyten pro Liter
	TPO	<u>T</u> hyreoidale <u>P</u> eroxidase
	TGF	<u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
	TS	<u>T</u> rockens <u>u</u> bstanz
	Tyr	<u>T</u> yrosin
<u>U</u>		
	U/L	Units pro Liter
	U/min	Umdrehungen pro Minute
	UDP	<u>U</u> ridin-5- <u>D</u> iphosphat
<u>V</u>		
	Val	Valin
	VEGF	<u>V</u> ascular <u>E</u> ndothelial <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
	VCAM	<u>V</u> ascular <u>C</u> ell <u>A</u> dhesion <u>M</u> olecule
	vs	<u>v</u> ers <u>u</u> s
	vWF	<u>v</u> on <u>W</u> illebrand <u>F</u> aktor
	VHF	<u>V</u> or <u>h</u> off <u>f</u> immern
<u>W</u>		
	WOSCOP	<u>W</u> est of <u>S</u> cotland <u>C</u> oronary <u>P</u> revention
	WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganisation
<u>XYZ</u>		
	z.B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel
<u>Andere</u>		
	°C	Grad Celsius
	µg	Mikrogramm
	µg/mL	Mikrogramm pro Milliliter
	µL	Mikroliter
	µM	Mikromol pro Liter (mikromolar)
	%	Prozent

1 EINLEITUNG

Die Nahrungszufuhr liefert dem Organismus nicht nur die nötige Energie und die notwendigen Aufbaustoffe für seinen Erhalt, sondern sie spielt ebenso eine große Rolle für die Leistungsfähigkeit, sowie für die Gesundheit des Körpers und kann ferner Krankheitsverläufe und Prophylaxen entscheidend beeinflussen. Schätzungen gehen davon aus, dass viele Erkrankungen durch eine optimierte Nahrungsaufnahme um 25 % bis 70 % reduziert werden könnten (HOLM, 2003). Eine intensive Erforschung aller Nahrungskomponenten hinsichtlich ihrer Wirkung auf *in vitro* und *in vivo* Systeme und deren Beeinflussbarkeit kann neue Ansätze zur Vorbeugung und Therapie ernährungsbedingter Krankheiten schaffen.

1.1 Sojabohne und Sojaprotein

Die Sojabohne zählt zu den ältesten Kulturpflanzen der Erde und wird vermehrt auf Grund ihres gesundheitlichen Nutzens angebaut und konsumiert. Weltweit wurden im Jahr 2004 etwa 225 Mio. Tonnen Sojabohnen geerntet ¹. Die wichtigsten Erzeugerländer sind derzeit die Vereinigten Staaten von Amerika (36 %), Brasilien (27 %), Argentinien (18 %) und China (8 %; Abbildung 1, S. 2) ^{2a}.

Auf Grund ihrer Nährstoffzusammensetzung trägt die Sojabohne effizient zur weltweiten Proteinversorgung bei und gehört zu den Leguminosen mit dem höchsten Eiweißgehalt (MESSINA, 1999).

Zu den Speicherproteinen gehören β -Conglycinin (7S-Protein) und Glycinin (11S-Protein) (Gruppe Globuline) der Sojabohne, die ein Aminosäurereservoir für Keimung und Entwicklung der Pflanze darstellen. Sie weisen deshalb sowohl ein hohes Stickstoff-Kohlenstoff-Verhältnis, als auch einen erhöhten Anteil saurer Aminosäuren und Amide auf (SCHLERETH, 2001). Die Aminosäurezusammensetzung des Sojaproteins ist je nach Herstellungsverfahren schwankend, im Prinzip jedoch äußerst ausgewogen, sodass der Bedarf an essenziellen Aminosäuren durch den Konsum gedeckt werden kann (Ausnahme: Methionin). Tabelle 1 (S. 2) zeigt die Aminosäurezusammensetzung von Sojaproteinschrot und die Einordnung sojaproteinreicher Nahrungsmittel hinsichtlich ihrer Verdaulichkeit entsprechend der Einteilung nach PDCAAS (*Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score*).

Nach dieser Bewertung gilt Sojaprotein ebenso wie Milch- oder Hühnereineiweiß als ideale Proteinquelle und hat einen höheren PDCAAS-Wert als Fleischprotein (MESSINA, 1999).

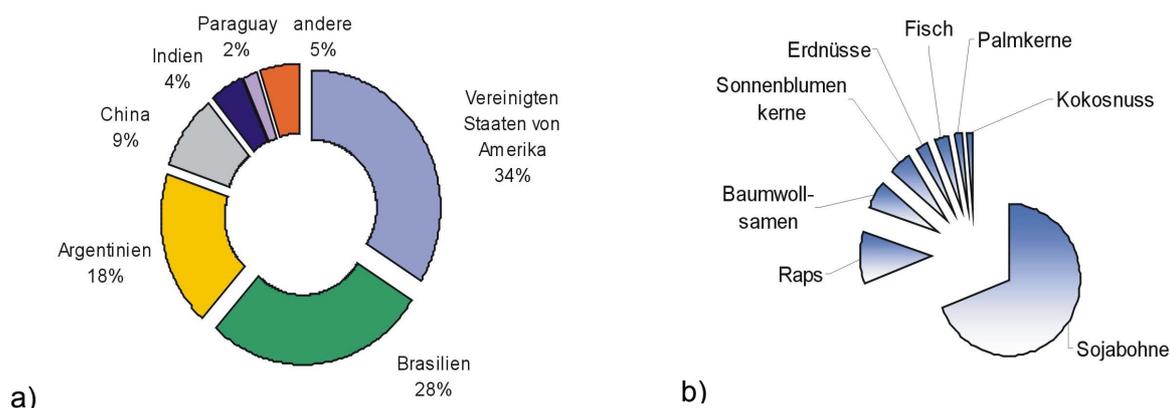


Abbildung 1. Globale Sojaproduktion und die Einordnung der Sojabohne als Proteinquelle international mit a) der Sojaproduktion im Jahr 2003 weltweit und b) Anteil der Sojabohnen am weltweiten Proteinverzehr 2003.

Die Grafiken wurden nach ^{2a, 2b} modifiziert.

Tabelle 1. Bewertung proteinreicher Lebensmittel nach PDCAAS sowie Darstellung der Aminosäurezusammensetzung von Sojabohnenschrot

Lebensmittel	Proteingehalt (in % TS)	PDCAAS
Hühnereiweiß	87	1,00
Milch	38	1,00
Sojamehl, entölt	53	1,00
Sojakonzentrat	70	0,99
Sojaproteinisolat	92	0,92
Rindfleisch	95	0,92
Schweinefleisch	89	0,89
Reis	8	0,66
Kartoffeln	9	0,62
Mais	10	0,51
Weizen	16	0,40

Sojabohnenschrot			
Aminosäure	g/100 g Protein	Aminosäure	g/100 g Protein
Alanin	4,0	Lysin	6,4
Arginin	7,0	Methionin	1,4
Asparaginsäure	11,3	Phenylalanin	5,3
Cystein	1,6	Prolin	4,7
Glutaminsäure	17,0	Serin	5,0
Glycin	4,0	Threonin	4,2
Histidin	2,7	Tryptophan	1,2
Isoleucin	4,9	Tyrosin	3,9
Leucin	8,0	Valin	5,3

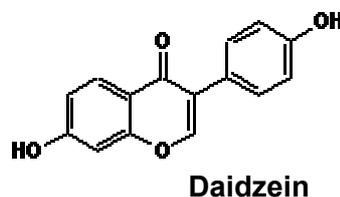
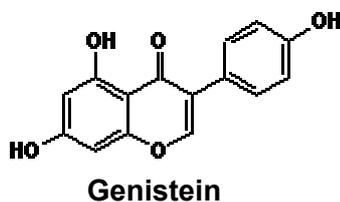
Es wurden die Proteingehalte der Lebensmittel als prozentuale Anteile der Trockensubstanz (in % TS) angegeben und die Bewertung anhand der Einteilung des PDCAAS (*Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score*) aufgelistet (AMERICAN SOYBEAN ASSOCIATION, 2001). Zusätzlich wurden ausgewählte Produkte der Sojabohne (Sojamehl, Sojakonzentrat, Sojaproteinisolat) hinsichtlich ihres Proteingehaltes und ihrer Verfügbarkeit nach PDCAAS aufgeführt. Dargestellte Aminosäuren beziehen sich auf die Aminosäurezusammensetzung von Sojaproteinschrot (ZELLER, 1999). Essenzielle Aminosäuren wurden hellgrau unterlegt.

1.1.1 Bioaktive Substanzen der Sojabohne

Unter bioaktiven Substanzen werden Bestandteile zusammengefasst, die in geringen Konzentrationen in einem Lebensmittel vorkommen und deren Verwendung auf Grund ihrer biologischen Wirksamkeit von medizinischem und/oder therapeutischem Interesse sind.

Die Sojabohne enthält eine Vielzahl dieser bioaktiven Substanzen, zum Beispiel Isoflavone, Saponine, Lignane oder Phytosterole. Insbesondere wurden die Wirkungen der Isoflavone erforscht, die zu der Gruppe der ubiquitär vorkommenden Flavonoide gehören, aber nur in der Sojabohne in extrem hohen Konzentrationen vorkommen (KULLING und WATZEL, 2003). Isoflavone liegen glykosidisch gebunden, das heißt mit Zuckerresten kondensiert, in der Sojabohne vor, die je nach Verarbeitungsgrad oder Resorptionsmechanismus in Aglykone umgewandelt werden können (MESSINA, 1999; KULLING und WATZEL, 2003). Als die wissenschaftlich interessantesten Isoflavone der Sojabohne gelten:

- **Genistein** (Aglykon) + **Genistin** (Glykosid)
- **Daidzein** (Aglykon) + **Daidzin** (Glykosid)
- **Glycitein** (Aglykon) + **Glycitin** (Glykosid)



Genistein kommt zusammen mit dem Daidzein anteilmäßig am häufigsten in Sojabohnen vor. Bei einer normalen und ausgewogenen Ernährung wird die tägliche Isoflavonaufnahme in westlichen Industrienationen auf bis zu 5 mg pro Tag geschätzt, während in asiatischen Ländern, auf Grund einer sehr sojareichen Ernährung, Mengen bis zu 40 mg täglich aufgenommen werden können und sich entsprechend höhere Isoflavonplasmaspiegel in der asiatischen Bevölkerung nachweisen lassen (ADLERCREUTZ et al., 1993).

1.1.2 Resorption von Sojaproteinen und bioaktiven Substanzen der Sojabohne

Im Magen bereits enzymatisch durch Pepsin vorgespaltene Sojaproteine gelangen in den gastrointestinalen Verdauungstrakt, wo die eigentliche Spaltung der Nahrungsproteine durch Pankreaspeptidasen (Endo- und Exopeptidasen) in Peptidbruchstücke unterschiedlicher Größe und zu freien Aminosäuren stattfindet.

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass der enzymatische Abbau der Proteine und Peptide nicht bis auf die Grundbausteine (Aminosäuren) erfolgt, sondern bereits niedermolekulare Di- und Tripeptide durch spezifische Transportsysteme in die Epithelzellen aufgenommen und entweder intrazellulär durch enzymatische Hydrolyse in Aminosäuren gespalten werden oder als intakte Peptide das Blut erreichen (Abbildung 2). Diese Untersuchungen wurden *ex vivo* bzw. *in vitro* am Tiermodell durchgeführt (MATTHEWS und LASTER, 1965; ADDISON et al., 1975; GARDNER, 1975; MATTHEWS, 1987). Man nimmt an, dass mehr Di- und Tripeptide als Aminosäuren in die Epithelzelle des Darms aufgenommen werden (WEBB, 1990; ADIBI, 1997).

Im Gegensatz zu Aminosäuren, die auf unterschiedlichen Wegen (passiver und aktiver Transport) in die Mukosazelle gelangen können, sind für Peptide eigene Transportsysteme (Klasse der Peptidtransporter 1, PEPT 1; Abbildung 2 und Abbildung 3, S. 5) bekannt (WEBB, 1990; DANIEL und KOTTRA, 2004; KLANG et al., 2005).

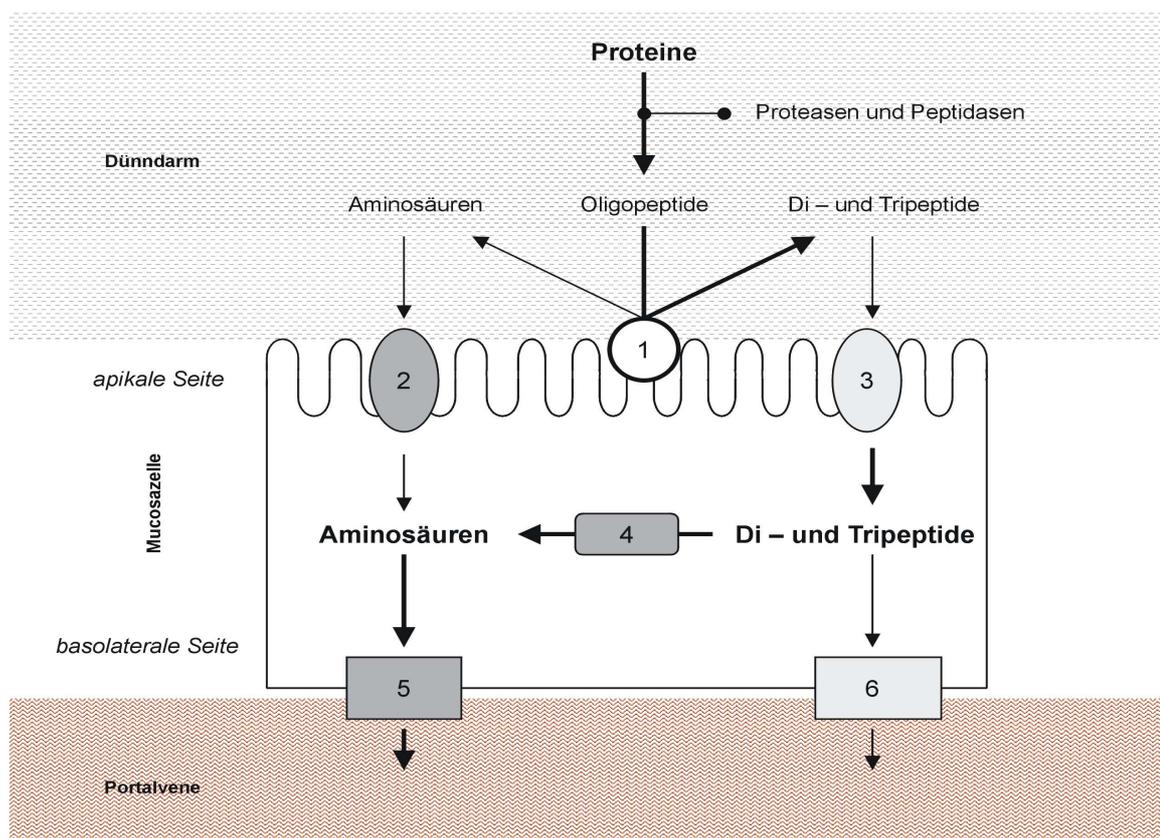


Abbildung 2. Verdauung und Resorption von Proteinen im Dünndarm.

Die Bedeutung der einzelnen Ziffern: (1) apikale Peptidasen, (2) apikale Aminosäure-Transportsysteme, (3) apikale(s) Peptidtransportersystem(e), (4) zytoplasmatische Peptidasen, (5) basolaterale Aminosäuretransportsysteme, (6) basolaterale(s) Peptidtransportersystem(e).

Die Grafik wurde modifiziert nach GANAPATHY et al. (1994).

Die treibende Kraft für die Aufnahme über die apikale Membran der Epithelzelle liefert ein

Protonen-Peptidsympporter (PEPT 1), das heißt sowohl Protonen (H^+) als auch das Substrat werden gleichzeitig in die Epithelzelle aufgenommen (THWAITES et al., 1994; IRIE et al., 2005). Die nötige Energie für diesen Transport liefert eine Zusammenarbeit zwischen einem auf der apikalen Seite der Zelle bestehenden Protonengradienten (entsteht durch einen Natrium(Na^+)-Protonen(H^+)-Austauscher) und der auf der basolateralen Seite lokalisierten Natrium(Na^+)-Kalium(K^+)-ATPase (GANAPATHY und LEIBACH, 1985; GANAPATHY et al., 1987; Abbildung 3). Dieser Peptidtransporter, der im Dünndarm, in der Niere und im Pankreas vorkommt, ist ein integrales Membranprotein, mit 12 Transmembrandomänen und 708 Aminosäuren und gehört zur Gruppe der protonengekoppelten Oligopeptidtransporter (POT-Familie; FEI et al., 1998). Studien belegen die Existenz weiterer Peptidtransporter (PHT 1, PHT 2), die neben Di- und Tripeptiden sowie Protonen, auch Histidine transportieren können (DANIEL und KOTTRA, 2004).

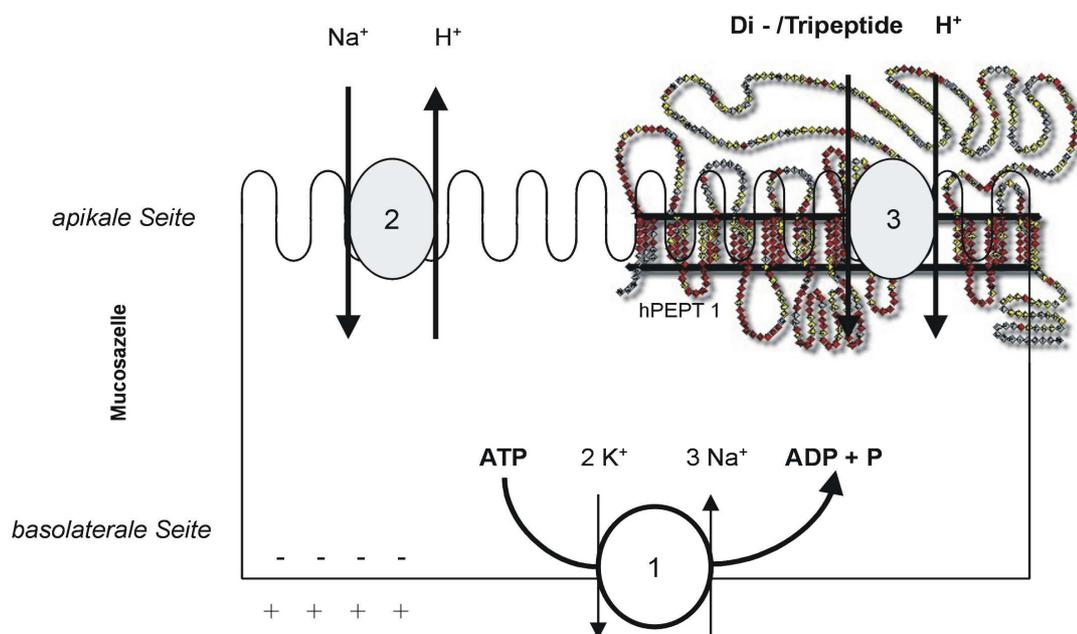


Abbildung 3. Di- und Tripeptidtransport (3) mit schematisierter Struktur des humanen Peptidtransporters hPEPT 1 an der epithelialen Bürstensaummembran des Dünndarms und dessen Bezug zu dem apikalen Na^+ - H^+ -Austauscher (2) und der basolateralen Na^+ - K^+ -ATPase (1). Die Abbildung wurde nach GANAPATHY et al. (1987) modifiziert.

Passieren Di- und Tripeptide die apikale Membran und gelangen in die Mukosazelle, unterliegen sie zum Teil einer erneuten enzymatischen Hydrolyse und werden zu Aminosäuren abgebaut. Es ist jedoch davon auszugehen, dass auch auf der basolateralen Seite der Mukosazelle aktive Transportsysteme existieren (SAITO und INUI, 1993; ADIBI, 1997), die intakte Di- oder Tripeptide an das Blut abgeben (Abbildung 2, S. 4).

Neuere Erkenntnisse weisen am Tiermodell darauf hin, dass weitere, vom PEPT 1 strukturell unabhängige, unter bestimmten Bedingungen asymmetrisch transportierende Peptid-

transporter auf der basolateralen Seite lokalisiert sind (SHEPHERD et al., 2002). Mithilfe abbaustabiler Dipeptidverbindungen (z.B. Glycin-Sarcosin, Gly-Sar) wurden anhand der Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2 basolaterale Transfersysteme untersucht, wonach eine pH-Abhängigkeit sowie eine Substratspezifität für einen asymmetrischen Transport auf der basolateralen Seite postuliert wurde (IRIE et al., 2004).

Die Frage, in welcher Form Isoflavone oder Flavonoide, speziell das Genistein resorbiert werden, wird seit Jahren widersprüchlich diskutiert. Der Grund hierfür ist vermutlich in der Vielfalt der unterschiedlichen Flavonoidverbindungen zu suchen.

Konkrete Resorptionsstudien zum Genistein wurden von ANDLAUER et al. (2000a, 2000b) am perfundierten Rattendünndarm durchgeführt (Abbildung 4).

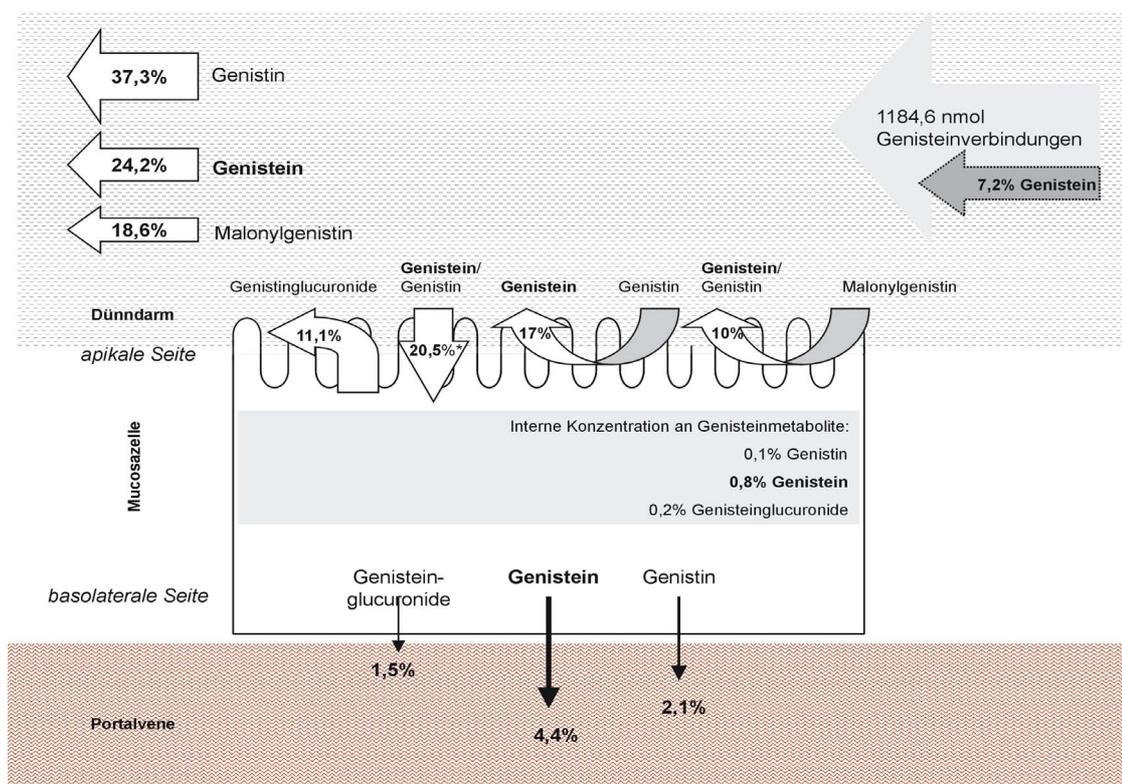


Abbildung 4. Schematische Präsentation des intestinalen Metabolismus von Genisteinverbindungen ausgehend von einer Tofudiet am Modell des perfundierten Rattendünndarms.

Prozentuale Werte ergaben sich auch den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten (ANDLAUER et al., 2000a). Die Wiederfindung der Genisteinverbindungen betrug $100,6 \pm 0,6 \%$. *Das Ergebnis errechnet sich aus absorbierten, sekretierten und lokalen Zellkonzentrationen von Genisteinverbindungen. Die Grafik wurde nach ANDLAUER et al. (2000a) modifiziert.

Auf Grund dieser Daten wurde vermutet, dass nicht hydrolysiertes Genistin entweder von der Mukosazelle über spezifische Transporter aufgenommen oder durch eine intrazellulär stattfindende Hydrolyse gespalten und als Genistein, welches mit Glucuronsäure konjugiert wurde, aktiv an die Blutbahn abgegeben wird. Auf Grund der starken Hydrophilie der Glucuronide scheint eine passive Diffusion ausgeschlossen (ANDLAUER et al., 2000a).

Maximale Plasmakonzentrationen von Genistein und Daidzein werden nach ungefähr 6 h bis 8 h erreicht (SETCHELL, 2000; ZUBIK und MEYDANI, 2003) und liefern je nach aufgenommener Isoflavonmenge unterschiedliche Plasmakonzentrationen von 50 ng/mL bis 800 ng/mL (SETCHELL und CASSIDY, 1999; BUSBY et al., 2002). Nicht resorbierbare Isoflavone werden durch die Bakterienflora des Dickdarms reduziert und unterliegen, je nach Isoflavon, unterschiedlichen Abbaumechanismen. So kann in Abhängigkeit von der Bakterienzusammensetzung Daidzein zu Equol und Genistein über Dihydrogenistein zu 6-Hydroxy-odemethylangolensin umgewandelt werden.

1.1.3 Wirkungen des Isoflavons Genistein

Für das Isoflavon Genistein der Sojabohne wurden eine Vielzahl an biologischen Wirkungen nachgewiesen:

Karzinogenese: Zahlreiche *in vitro*, tierexperimentelle und epidemiologische Studien haben einen Effekt durch Genistein auf den Prozess der Karzinogenese belegt, wobei neuere Studien eindeutige Wirkungen nicht aufzeigen können (KULLING und WATZEL, 2003).

Genistein gilt als ein starker Inhibitor der Angiogenese (FOTSIS et al., 1993) des Mammakarzinoms (INGRAM et al., 1997; TOULLAUD et al., 2005; VANTYGEM et al., 2005) und des Prostatakarzinoms (PETERSON und BARNES, 1993; POLLARD und LUCKERT, 1997; HILLMANN et al., 2004). ZÄNKER et al. (2001) beschrieben *in vitro* den hemmenden Einfluss des Genisteins auf die Zellbewegung von Tumorzellen (KROTT et al., 2000; LIU et al., 2002). SANTELL et al. (2000) konnten zwar einen inhibierenden Effekt des Genisteins auf eine Brustkrebszelllinie beschreiben, jedoch nicht im Rahmen tierexperimenteller Studien. Auf der anderen Seite sind Studien bekannt, die eine Beschleunigung des Tumorwachstums von Brustkrebszellen durch Verfütterung von Sojaproteinisolat nachweisen konnten (KULLING und WATZEL, 2003). In diesen Experimenten erzielten niedrige Isoflavonkonzentrationen von < 10 µg eine Proliferation der Tumorzellen, wobei eine Hemmung dieser erst durch Konzentrationen von > 10 mg erzielt werden konnte.

Genistein kann ferner Hitzwallungen, die vorrangig im Klimakterium auftreten minimieren (ALBERTAZZI et al., 1998; FINKEL, 1998), wobei eine weitere Untersuchung hierzu diesen Effekt des Genisteins nicht belegen konnte (KULLING und WATZEL, 2003).

Osteoporose: Frauen erkranken auf Grund des sinkenden Östrogenspiegels häufig an Osteoporose. Genistein und andere Isoflavone können vermutlich durch ihre phytoöstrogenartigen Wirkungen durch Bindung an den Östrogenrezeptor diesen Prozess vermindern (SETCHELL und LYDEKING-OLSEN, 2003; ATKINSON et al., 2004). Eine allgemein gültige Aus-

sage lässt sich noch nicht treffen, da sich Design und Probandenkollektive zwischen den Studien stark unterscheiden und keine oder nur positive Effekte nachgewiesen wurden (KULLING und WATZEL, 2003; ANUPONGSANUGOOL et al., 2005).

Kardioprotektive Effekte: Zur Beurteilung der Isoflavonwirkung hinsichtlich kardiovaskulärer Effekte wurden besonders die Konzentrationsveränderungen des atherosklerotischen Risikofaktors Cholesterin untersucht (ANDERSON et al., 1995), wobei Genistein über die Hemmung der Lipidoxidation wirkte. Die meisten Studien wurden hierzu sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführt (KIRK et al., 1998; POTTER, 1998; WONG, et al., 1998; FRIEDMANN und BRANDON, 2001). Es ist derzeit nicht ausreichend untersucht, inwiefern Sojainhaltsstoffe auf die Thrombozytenfunktion wirken. Einige Studien belegen *in vitro* eine antikoagulatorische Wirkung des Genisteins durch eine Hemmung der durch Kollagen- oder Thrombin-induzierten Thrombozytenaggregationen (NAKASHIMA et al., 1990; LIU et al., 1998; KONDO et al., 2002; GOTTSTEIN et al., 2003). Allerdings wurde in keiner Studie verschiedene Agonisten gleichzeitig eingesetzt, um potenzielle Wechselwirkungen der Isoflavone auf die Thrombozytenfunktion erfassen zu können.

Andere Wirkungen: Es ist bekannt, dass Flavonoide antioxidativ wirken (RICE-EVANS und SPENCER, 2004). Diese Eigenschaft wurde auch für Genistein beschrieben (ZIELONKA et al., 2003). Flavonoide sind außerdem in der Lage, den Vitamin C-Transport zu hemmen sowie den Glukosetransport zu beeinflussen (SONG et al., 2002) und durch Hemmung der thyreoidalen Peroxidase (TPO) die Schilddrüsenhormonsynthese reduzieren (DIVI et al., 1997). Studien zur Modulation immunologischer Zellen lassen keine konkrete Aussage zu. Es sind sowohl stimulierende als auch hemmende Effekte durch Isoflavone *in vitro* und *in vivo* anhand tierexperimenteller Studien beobachtet worden (KULLING und WATZEL, 2003).

In zahlreichen Studien sind die Wirkungen des Genisteins oder der Isoflavone auf den Cholesterinstoffwechsel (KIRK et al., 1998; POTTER, 1998; WONG et al., 1998; FRIEDMANN und BRANDON, 2001) oder auf die Karzinogenese (WU et al., 1996; INGRAM et al., 1997; MESSINA, 1999; TOUILLAUD et al., 2005, VANTYGHEM et al., 2005) beschrieben worden. Jedoch wurde erst in einigen wenigen Studien die Wirkung des Genisteins auf die Thrombozytenaktivität untersucht (NAKASHIMA et al., 1990; LIU et al., 1998; KONDO et al., 2002; GOTTSTEIN et al., 2003). Derzeit gibt es keine *in vitro* oder *in vivo* Studie, welche die Auswirkungen einer gemeinsamen Supplementation von Sojaprotein und Isoflavonen auf die Modulation der Thrombozytenfunktion untersucht hat. Es ist allgemein bekannt, dass aktivierte Thrombozyten bei der Entstehung chronischer und akuter Herz-Kreislaufkrankungen eine bedeutende Rolle spielen.

Warum eine intensive Erforschung möglicher antithrombotischer Therapien oder notwendiger Präventivmaßnahmen von Bedeutung ist, wird im Folgenden aufgezeigt:

Die Herz-Kreislauferkrankungen zählen nach der World Health Organisation (WHO, 2002) zu den wichtigsten Krankheitsursachen in der Europäischen Union. Es lässt sich nach neueren epidemiologischen Studien eine rückläufige Mortalitätsrate für Herz-Kreislauferkrankungen, unter anderem für die koronare Herzerkrankung (KHK) feststellen: In der Altersgruppe der 24- bis 65-jährigen Personen zeigte sich in Europa eine rückläufige Inzidenz der koronaren Herzerkrankung (WHO, 2002; WHO 2004). Gründe hierzu liegen vor allem in einem verbesserten therapeutischen Management, das heißt in einer konzentrierteren primären und sekundären Prävention, in optimierten, invasiven internistischen und auch chirurgischen Maßnahmen sowie in einer fortlaufenden Entwicklung von Medikamenten zu Behandlung und Therapie der koronaren Herzkrankheit (WHO, 2002). Trotzdem ist nach epidemiologischen Daten zur Zeit ein Ländergefälle zu verzeichnen (Abbildung 5), nach dem die Sterblichkeit in den osteuropäischen Staaten weiter ansteigt (MONICA-Studie; WHO, 2002; WHO, 2004).

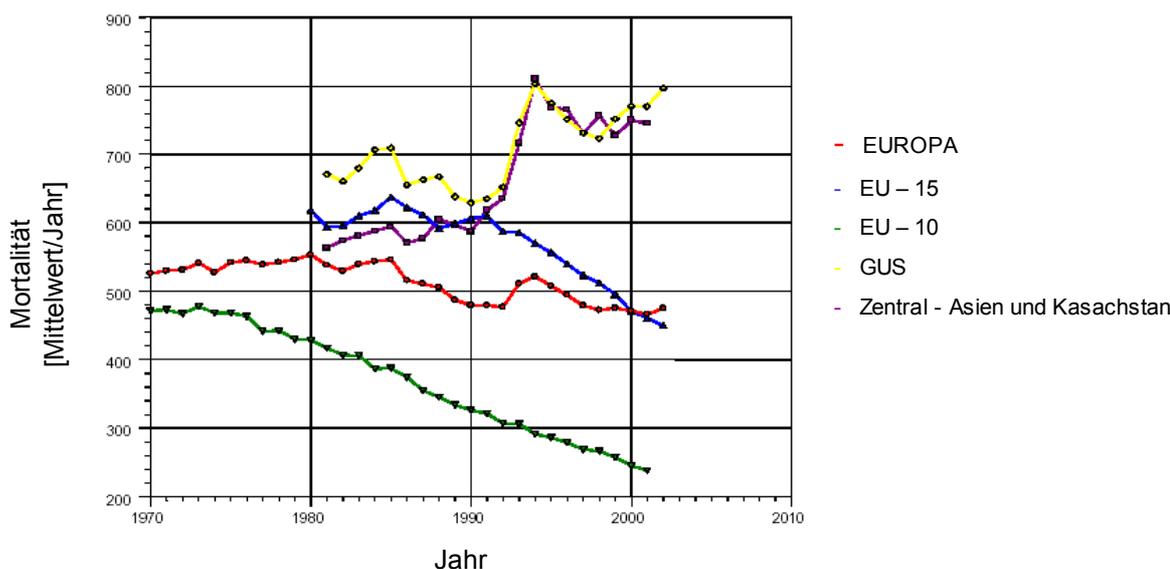


Abbildung 5. Verlauf der Sterblichkeit aller Altersgruppen an der koronaren Herzerkrankung in der europäischen Region seit 1970.

Angegeben sind die Mortalitätsmittelwerte für die koronare Herzerkrankung (KHK) der einzelnen Jahre nach der Region. Die Abbildung wurde nach der WHO (2004) modifiziert.

Auf Grundlage von Daten des Bundesgesundheits surveys 1998 (BGS 98) wurde eine zunehmende Prävalenz von Risikofaktoren für Herz-Kreislauferkrankungen (Hypertonie, Adipositas, Hypercholesterinämie, Zigarettenkonsum) in der deutschen Bevölkerung im Alter von 18 Jahren bis 79 Jahren in einem Beobachtungszeitraum von 2 Jahren festgestellt. Etwa ein

Drittel aller Altersgruppen wiesen keinen der genannten Risikofaktoren auf, 40 % einen und etwa 20 % zwei Risikofaktoren (NEUHAUSER et al., 1998; THEFELD, 2000; WHO, 2004).

Auf Grundlage dieses BGS 98, des Augsburger Herzinfarktregisters und der 9. koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung erfolgte eine statistische Analyse des Herzinfarktgeschehens in Deutschland bis zum Jahr 2050. Bei einem gleichbleibenden Erkrankungsrisiko wird bei einer rückläufigen Entwicklung der Bevölkerungszahlen die Zahl der Herzinfarktfälle im Alter von 25 Jahren bis 90 Jahren steigen (WIESNER et al., 2002). Ferner wurde ein kontinuierlicher Anstieg der finanziellen Ausgaben für die Therapie chronischer Herzerkrankungen festgestellt. Nach aktuellem Stand des Statistischen Bundesamtes lagen die Ausgaben und Kosten zur Behandlung aller Erkrankungen in Deutschland bei 223,6 Mrd. Euro, wobei die Behandlung der Herz-Kreislauferkrankungen einen Anteil von 35,4 Mrd. Euro ausmachten (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2004).

Gegenwärtig wird durch eine enge Kooperation zwischen den Bereichen Gesundheits- und Ernährungswissenschaften und medizinischer Forschung an vielen verschiedenen Punkten angesetzt, um durch geeignete gesundheitliche Aufklärungs-, Präventions-, und Therapiemaßnahmen die steigenden Zahlen der Herz-Kreislauferkrankungen zu reduzieren (z.B. in der Deutsche Herz-Kreislauf-Präventionsstudie (TROSCHKE et al., 2002); WOSCOP (*West of Scotland Coronary Prevention*)-Studie (MUNTONI, 1997; POLI, 1997)).

Interessanterweise werden in der Forschung vermehrt ausgewählte Risikofaktoren hierzu untersucht. Unumstritten ist aber die Bedeutung der Thrombozyten (= Blutplättchen) an der Entstehung der koronaren Herzerkrankung. Ihre Physiologie wurde wissenschaftlich hinreichend erforscht (FURIE und FURIE; 1992; MANN und LORAND, 1993; DAHLBÄCK, 2000; GEORGE, 2000; RUGGERI, 2002). Trotzdem nehmen Untersuchungen an Thrombozyten eine untergeordnete Stellung in der Erforschung geeigneter Präventiv- und Therapiemaßnahmen ein (Tabelle 2, S. 11). Aus volkswirtschaftlicher und wissenschaftlicher Sicht ist es deshalb unumgänglich, weiter an der Erforschung chronischer Herzerkrankungen zu arbeiten, um geeignete Maßnahmen zur primären und sekundären Prävention zu entwickeln.

1.2 Thrombozyten

Die wissenschaftliche Charakterisierung der Thrombozyten nahm dank der Entwicklung des Mikroskops durch HOOK (1635-1703) ihren Anfang. Durch die Mikroskopie wurde die Möglichkeit geschaffen, kleinste Strukturen und Zellen zu charakterisieren. HOME (1763-1831) entdeckte 1818 die Thrombozyten erstmals, ohne jedoch ihre Bedeutung zu erkennen. Erst BIZZOZERO (1846-1901) prägte den Begriff „Blutplättchen“ und erkannte den Zusammenhang zwischen Blutplättchen, Aggregation und Blutstillung (BAUER und MALL, 1995).

Tabelle 2. Relevanz der Studien, die sich mit ausgewählten Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankung beschäftigen

	KHK	KHK/ Cholesterin	KHK/ Hypertonie	KHK/ Diabetes	KHK/ Triglyceride	KHK/ Thrombo- zyten
Studien ¹⁾	154304	17946	14663	10538	5649	2197
Anteil ²⁾	100%	11,6%	9,5%	6,8%	3,6%	1,4%

Analyse der Studienhäufigkeit, die sich mit KHK und ausgewählten Risikofaktoren beschäftigen (Zeitraum von 1955-2005, Datum der Recherche: 25.10.2005). Dazu wurde in der Literaturdatenbank PubMed mit folgenden Begriffen recherchiert: *coronary heart disease, cholesterol, hypertension, diabetes, triglyceride, platelets*. ¹⁾ Anzahl der Studien, die über PubMed angezeigt wurden, ²⁾ berechneter prozentualer Anteil der Studien nach PubMed-Recherche.

Die Bedeutung der Thrombozyten für den menschlichen Organismus kann in folgenden Punkten zusammengefasst werden:

- zelluläre Bestandteile des Blutes
- Hämostase (vaskulär, zellulär und plasmatisch)
 - primäre Hämostase = Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten
 - sekundäre Hämostase = Blutgerinnung und Wundverschluss
- Unterstützung der Immunabwehr
- Beteiligung an der Fibrinolyse (Auflösung von Thromben)
- Angiogenese (Neubildung von Blutgefäßen) durch thrombozytäres FGF (*Fibroblast Growth Factor*) und PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*)

1.2.1 Morphologie der Thrombozyten

Thrombozyten (= Blutplättchen) sind kleine, scheibenförmige, kernlose und daher zellähnliche Gebilde (anukläre Zellen), die aus Megakaryozyten des Knochenmarks unter hormoneller Kontrolle durch Thrombopoetin durch fortsatzartige Abschnürung des Zytosols entstehen (GEORGE, 2000).

Der Referenzbereich der Thrombozyten gesunder Menschen liegt zwischen 150000 und 450000 Blutplättchen pro μL , wobei 70 % der zur Verfügung stehenden Thrombozyten in der Peripherie zirkulieren und 30 % in der Milz gespeichert werden (SHAPIRO, 2000). Nach 10 Tagen Lebenszeit werden sie durch das retikuloendotheliale System der Leber und der Milz abgebaut (GEORGE, 2000).

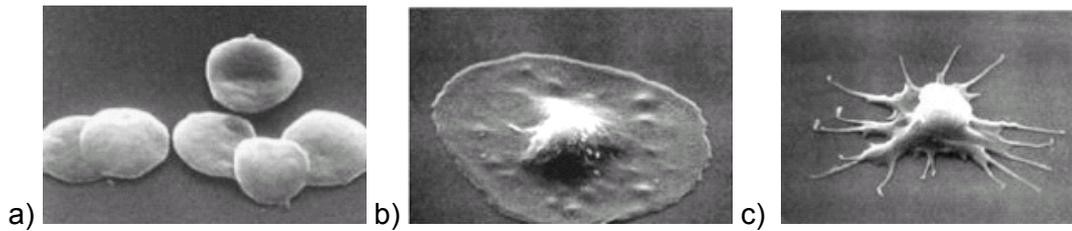


Abbildung 6. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Thrombozyten mit a) inaktivierten Thrombozyten, b) aktivierter Thrombozyt mit Spreizung und c) aktivierter Thrombozyt mit Pseudopodien.

Die Grafiken entstammen der Arbeit von SCHÜRZINGER (2004).

Für die thrombozytären Funktionen sind morphologisch 4 Hauptstrukturen des Blutplättchens zu unterscheiden (SHAPIRO, 2000):

- Periphere Zone
- Hyalomer (Sol-Gel-Zone)
- Zone der Zellorganellen
- Membransysteme

Periphere Zone

Die Thrombozytenmembran, die Außenzone und der submembranöse Bezirk gehören zu der peripheren Zone. Die Membran der Thrombozyten (*Unit Membrane*) weist unterschiedliche Glykoproteine (GP) auf, deren Oligosaccharidfragmente charakteristisch in den Außenbereich der Thrombozyten ragen und Rezeptorfunktionen ausüben. Mithilfe von Glykoproteinen treten Thrombozyten mit weiteren Blutplättchen oder mit anderen Zellen (z.B. Endothelzellen, Leukozyten, Erythrozyten) in Wechselwirkung. Sie stellen definierte Bindungsorte für eine Vielzahl biologischer und pharmakologischer Substanzen dar. Es gibt für zahlreiche Stoffe mehrere Rezeptoren, mit deren Bindung eine Hemmung oder eine Aktivierung der Thrombozytenfunktion ausgelöst werden kann. An der Membranoberfläche sind Plasma- und Gerinnungsproteine adsorbiert. Die Membran trägt die Merkmale einer Lipiddoppelschicht und enthält in der Außenseite Phosphatidylethanolamin und -serin, zwei für die Hämostase wichtige Phospholipide. An der Innenseite der Membran finden sich besonders Phosphatidylinositol und Sphingomyelin. Diese asymmetrische Verteilung der Phospholipide spielt eine besondere Rolle in den Aktivierungsprozessen der Thrombozyten.

Direkt unterhalb der Thrombozytenmembran befindet sich der submembranöse Bezirk, der die Mikrofilamente und die aktinenthaltende Zellorganellen aufweist und als kontraktiles Element für die Formänderung der Thrombozyten verantwortlich ist (SHAPIRO, 2000; GAWAZ, 1999).

Hyalomer (Sol-Gel-Zone)

Im Bereich des Hyalomers befindet sich das Zytoplasma, welches die Mikrotubuli, weitere Mikrofilamente und vermehrt Glykogenpartikel enthält. Die Mikrotubuli stellen das eigentliche Zellskelett dar und sind zusammen mit den submembranösen Bestandteilen für die Aufrechterhaltung der diskoiden Form verantwortlich (GAWAZ, 1999). Thrombozyten sind auf Grund ihrer im Zytosol befindlichen Enzyme (und der Glykogenpartikel) zur Aufrechterhaltung der Glykolyse und des Pentosephosphatweges befähigt und können über den Zitratzyklus und über die Elektronentransportphosphorylierung in den Mitochondrien Energie liefern. Die produzierte Energie wird zur Erhaltung der Thrombozytenstruktur, für plasmatische Prozesse und zur Speicherung von biogenen Aminen und Katecholaminen benutzt. Da Thrombozyten eine mitochondriale DNA und eine stabile RNA besitzen, können sie in geringem Umfang Proteine (z.B. Faktor XIII) synthetisieren (LINDEMANN et al., 2001).

Zone der Zellorganellen

Das Zytoplasma schließt die Organellen der Thrombozyten ein (Tabelle 3). α -Granula enthalten für die Gerinnungsprozesse wichtige Proteine, die ebenfalls im Plasma vertreten sind (Fibrinogen, Fibronectin, Albumin, Faktor V, Plasminogen, von Willebrandfaktor; SHAPIRO, 2000). Ihre Aufgabe liegt in der Adhäsion der Thrombozyten an die subendotheliale Matrix. Sie können als adhäsive Proteine bezeichnet werden. Weiterhin kommen in den α -Granula plättchenspezifische Proteine vor, die als Gerinnungsfaktoren oder Inhibitoren (Plättchenfaktor 4, β -Thromboglobulin, Faktor V, Faktor XI, Protein S, Plasminogenaktivator-Inhibitor 1) sowie als Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- β = *Transforming Growth Factor- β*) fungieren. Nukleotide, wie AMP, ADP, ATP, GMP und GTP sind in den δ -Granula der Thrombozyten gespeichert, in denen ferner biogene Amine und Kalzium vorkommen. Thrombozyten enthalten zahlreiche Lysosomen, die als λ -Granula bezeichnet werden und saure Hydrolasen, Arylsulfatasen und Phosphatasen speichern. Daneben gibt es Mitochondrien für den aeroben Energiestoffwechsel (GAWAZ, 1999, Tabelle 3, S. 15).

Membransysteme

Um eine Oberflächenvergrößerung der thrombozytären Membran sowie einen aktiven Stoffaustausch und Stofftransport zu ermöglichen, ist die Membran mit zahlreichen Einstülpungen, die in das Hyalomer hineinreichen, versehen (OCS = *Open Canalicular System*). Daneben stellt das DTS (*Dense Tubular System*) ein dichtes schlauchförmiges Membransystem dar, welches vorrangig der Calciumspeicherung dient und wichtig für die Aktivierung und Formveränderung der Thrombozyten ist (GAWAZ, 1999).

1.2.2 Physiologie der Thrombozyten

Thrombozyten können von einem inaktiven Zustand in einen aktiven Zustand durch verschiedene Induktoren überführt werden: Überschreitet die zytoplasmatische Kalziumkonzentration (10^{-8} mol/L) einen bestimmten Schwellenwert, durchlaufen die Thrombozyten eine Gestaltsveränderung, die mit einer Pseudopodienbildung und Degranulation verbunden ist (GAWAZ, 1999). Letzteres bedeutet eine Freisetzung der intrazellulären Granulastoffe (Tabelle 3, S. 15). Dadurch kommt es zu Veränderungen der strukturellen Zone und zur Anreicherung der Mikrotubuli in den Pseudopodien. Gleichzeitig polymerisieren G-Aktinfilamente und bilden F-Aktine, die zur Stabilisierung der Pseudopodien beitragen und zusammen das Aktomyosin bilden.

Die Formveränderung der Thrombozyten ermöglicht eine Zentralisierung der Organellen und eine kurzwegige Koordination der thrombozytären Stoffwechselfvorgänge. Interessanterweise kommt es zu einer Veränderung der bestehenden Phospholipidverhältnisse in der Membran. Die äußeren Phosphatidylcholine werden mit den innenliegenden -serinen ausgetauscht. Dieser durch Thrombin ausgelöstes „Flipflop“ bewirkt eine Freisetzung des intrazellulär gespeicherten Kalziums (DAHLBACK, 2000; GAWAZ, 1999) und veranlasst die Bindung der Gerinnungsfaktoren an die Blutplättchen.

Die Thrombozytenaktivierung kann folgendermaßen zusammengefasst werden:

- Veränderung des intrazellulären metabolischen Gleichgewichts der Thrombozyten erhöht die Kalziumkonzentration
- Konformationsänderung der Thrombozyten
- Aktivierung der Membranrezeptoren und Veränderung der Phospholipidorientierung in der Membran
- Sekretion thrombozytärer Inhaltsstoffe

Primäre Hämostase

Die primäre Hämostase umfasst die zentralen Vorgänge der Adhäsion und der Aggregation der Thrombozyten und spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung und Progression der Arteriosklerose.

Zirkulierende Thrombozyten sind nicht dazu befähigt, sich an Endothelzellen anzulagern, da sie keine endothelspezifischen Rezeptoren exprimieren (SILBERNAGL UND KLINKE, 1994). Bevor die Adhäsion einsetzt, werden die zirkulierenden Thrombozyten abgebremst und heften sich an die verletzte Gefäßwand (REININGER und SPANNAGL, 2004). Diese Adhäsion ermöglicht den Plättchen, sich an eine verletzte Gefäßwand anzulagern (primäre Adhäsion, Ausspreizung). Im Zuge permanenter Adhäsion kommt es zur Plättchen-Plättchen-Interaktion mit verbundener Aggregation und Thrombusbildung (sekundäre Adhäsion).

Tabelle 3. Speichersubstanzen der thrombozytären Granula

Dichte Granula	α -Granula	Lysosomen
ATP	Enzyme	α -Arabinoside
ADP	α_1 -Antitrypsin	β -Galactosidase
Kalzium	α_2 -Makroglobulin	β -Glucuronidase
Phosphat	Antiplasmin	N-Acetylglucosamin
Serotonin	C ₁ -Esteraseinhibitor	Kollagenase
Guaninnukleotide	Adhäsive Proteine	Elastase
	Fibrinogen, Fibronectin	Kathepsin
	Vitronectin, Thrombospondin	
	von-Willebrand-Faktor (vWF)	
	GP IIb/IIIa	
	Wachstumsfaktoren	
	PDGF (platelet derived growth factor)	
	EGF (epidermal growth factor)	
	TGF (transforming growth factor)	
	VEGF (endothelial growth factor)	
	Zytokinähnliche Proteine	
	Interleukin 1	
	CD 40-Ligand	
	Plättchenfaktor 4	
	β -Thromboglobulin	
	Koagulationsfaktoren	
	Plasminogen	
	HMWK (hochmolekulares Kininogen)	
	Protein S	
	Faktor V und XI	
	PAI-1	

Es ist bekannt, dass für die Anlagerung das Zusammenspiel zwischen dem Glykoprotein GP Ib und vWF wichtig ist (SAVAGE et al., 1996). Neuere Erkenntnisse belegen, dass zusätzlich die Interaktion zwischen thrombozytärem GP VI und Kollagen essenziell für diesen Prozess ist (NIESWANDT et al., 2001). Die Thrombozytenadhäsion kann durch das Proteoglykan Versikan verstärkt, jedoch durch Vitronectin und Perlekan leicht abgeschwächt werden (RUGGERI, 2003).

Kohärieren zwei Thrombozyten miteinander, so wird dieser Vorgang als Aggregation bezeichnet, wobei die primäre von der sekundären Aggregation zu unterscheiden ist. Für beide Prozesse nimmt das Glykoprotein GP IIb/IIIa eine Schlüsselposition ein. Das als Fibrinogenrezeptor bezeichnete Glykoprotein ändert nach Aktivierung durch verschiedene Induktoren (ADP, Thrombin, Adrenalin, Thrombin, Vasopressin) seine Konformation und ermöglicht die Rezeptorbindung des löslichen Fibrinogens, des Gerinnungsfaktors I, das eine Vorstufe des Fibrins (Thrombozyten + Fibrin = Blutgerinnsel) darstellt.

Zwei aktivierte Thrombozyten können mithilfe der Fibrinogenbrücken lockere Bindungen eingehen (SIESS, 1989; GAWAZ, 1999; PLOW et al.; 2001; Abbildung 7, S. 17). Dieser Vorgang,

als primäre Aggregation bezeichnet, ist reversibel. Anschließend beginnt der Thrombozyt, autonom granuläre Inhaltsstoffe freizusetzen (z.B. P-Selektin), und die primäre Aggregation geht in die irreversible, sekundäre Aggregation über. Grundvoraussetzungen für eine Aggregation ist der Kontakt zwischen Thrombozyten, Kalzium und Fibrinogen.

Beide Prozesse, Adhäsion und Aggregation, lösen thrombozytäre Signalkaskaden aus, die unter anderem zur Bildung und Sekretion von Thromboxan A₂, Serotonin und ADP beitragen und eine Aktivierung weiterer Blutplättchen, sowie eine gesteigerte Interaktion der Thrombozyten untereinander, eine Verengung der Blutgefäße und eine Verlangsamung des Blutflusses bewirken. Nachfolgend wird die sekundäre Hämostase eingeleitet.

Sekundäre Hämostase

Das primäre Plättchenaggregat ist relativ instabil: Eine effiziente Blutstillung erfordert die Konsolidierung des plättchenreichen Thrombus (sekundäre Hämostase).

Wie auch bei der primären Hämostase wird die sekundäre Hämostase durch eine Gefäß- oder Gewebeerletzung ausgelöst. Sie beginnt mit der Aktivierung der Gerinnungskaskade sowie mit der Bildung von Thrombin und Fibrin. Bis zur Fibrinbildung wird die Kaskade durch zwei sich ergänzende Wege aktiviert. Das intrinsische System (endogen, intravaskulär) läuft langsam im Minutenbereich ab und enthält zahlreiche Zwischenstufen, Umwandlungen und Aktivierungsschritte verschiedener Gerinnungsfaktoren.

Durch die Bindung des Gerinnungsfaktors XII an das Kollagen der Oberflächen wird der Faktor XIII in eine aktive Form überführt. Diese Reaktion wirkt verstärkend auf alle folgenden Kaskadenreaktionen, die alle zusammen in der Bildung von Thrombin münden.

Das extrinsische System (exogen, extravaskulär) läuft sehr schnell ab (Sekundenbereich) und beginnt mit der Freisetzung von Gewebethromboplastin, welches von den verletzten Gewebezellen freigesetzt wird und ebenfalls in der Bildung von Thrombin endet.

Thrombin, ein α_1 -Globulin, welches in einer Vitamin K-abhängigen Reaktion in der Leber gebildet wird, fungiert als proteolytisches Enzym, indem es das ebenfalls in der Leber synthetisierte Fibrinogen zur Spaltung anregt.

Die Spaltungsreaktion des Fibrinogens bewirkt die Bildung von Fibrinmonomeren, die durch die Einwirkung des Gerinnungsfaktors XIII, einer Transglutaminase, stabilisiert, und zu einem Fibrinpolymer umgewandelt werden. Die Retraktion ausgebildeter Fibrinpolymere und die durch Thrombosthenin ausgelöste Kontraktion, führen zur Thrombusbildung (Blutgerinnungsbildung; THEWS et al., 1999). Die Proteine B-cell-lymphoma 3 (Bcl 3) und Interleukin-1 β (Aktivierung von Endothelzellen und Granulozyten) sind zwei von Thrombozyten synthetisierte Proteine (LINDEMANN et al., 2001), die nach Aktivierung zusammen mit dem CD 40-Liganden vermehrt abgegeben werden und für die Retraktion des Thrombus sowie für die Adhäsion

der aktivierten Thrombozyten an Endothelzellen verantwortlich sind (GAWAZ et al., 1999; GAWAZ et al., 2000).

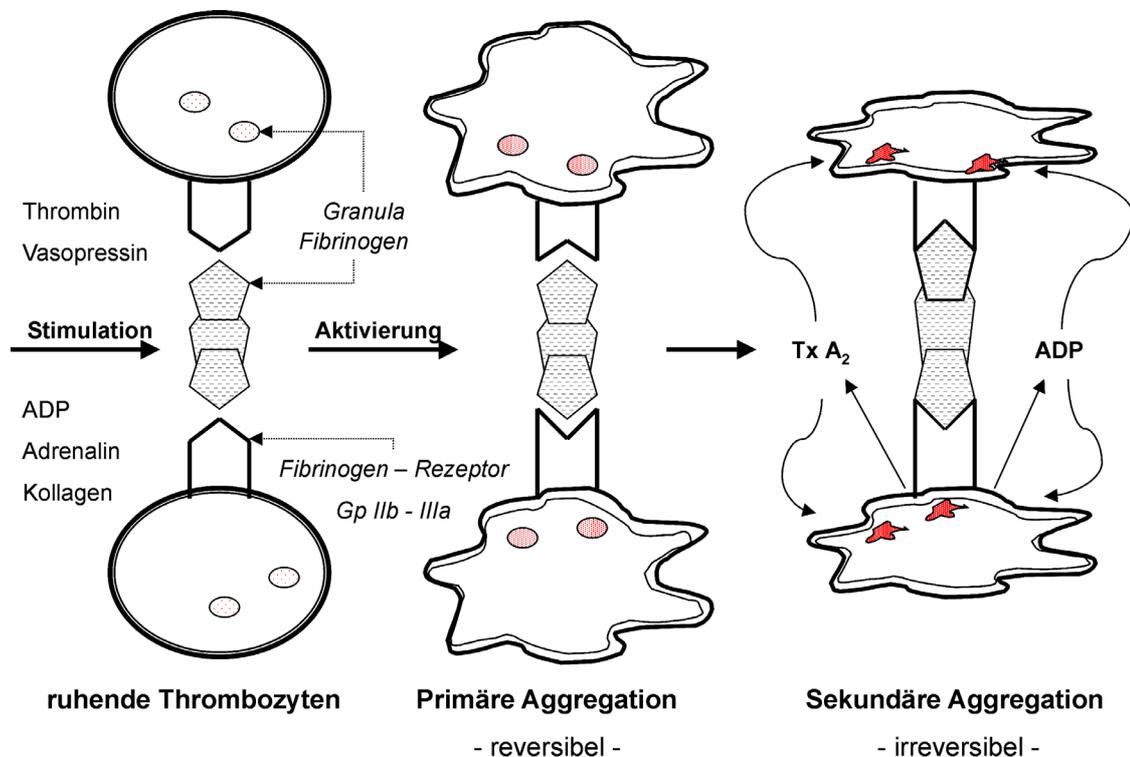


Abbildung 7. Thrombozytenkohäsion über Ausbildung einer Fibrinogenbrücke nach Aktivierung.

Die Abbildung wurde nach GAWAZ (1999) modifiziert.

1.2.3 Stimulatoren der Thrombozytenaktivierung

Die wichtigsten Agonisten der Thrombozytenaktivierung sind:

- Thrombin
- Fibrinogen bzw. Fibrin
- Adrenalin
- Kollagen
- Adenosindiphosphat (ADP)
- Arachidonsäure/Thromboxan A₂

Diese Agonisten interagieren mit membranständigen Rezeptoren, die auf der zytoplasmatischen Seite mit heterodimeren GTP-bindenden Proteinen (G-Proteine) gekoppelt sind.

Den G-Proteinen kommt die Aufgabe eines Vermittlers zu, indem sie extrazelluläre Signale an induktorspezifische, intrazelluläre Signalkaskaden weiterleiten (OFFERMANN, 2000; Abbildung 8, S. 19). Die starke aggregatorische Wirkung des Thrombins kommt durch die gleichzeitige Aktivierung der stimulierenden und hemmenden G-Proteine G_γ und G_i zu Stan-

de, wohingegen Thromboxan auf die Stimulierung der Proteine G_γ , G_{12} und G_{13} und auf die Freisetzung des intrazellulären ADPs angewiesen ist.

Für ADP existieren auf der Thrombozytenmembran drei verschiedene Rezeptoren: P_2X (ligandengesteuerter Kalziumkanal), P_2Y_1 (aktiviert G_γ) und P_2Y_{12} (G_i -gekoppelt; OHLMANN et al., 2000; OFFERMANN, 2000). Adrenalin ist ein Aktivator, der ebenfalls über ADP-Rezeptoren wirken kann. Intrazellulär bilden aktivierte Thrombozyten aus Arachidonsäure Thromboxan A_2 , welches den autonomen Aktivierungsvorgang verstärken kann bzw. nach extrazellulärer Abgabe befähigt ist, weitere Thrombozyten anzuregen. Kollagen aktiviert den Kollagenrezeptor auf der Thrombozytenmembran.

1.2.4 Rolle der Thrombozyten bei der Entstehung von Herz-Kreislauf-erkrankungen unter besonderer Berücksichtigung der koronaren Herzerkrankung (KHK) und des Vorhofflimmerns (VHF)

1.2.4.1 Atherosklerose als eine Ursache der KHK und Rolle der Thrombozyten

Für die Entwicklung zahlreicher Herz-Kreislauf-erkrankungen mit den Folgen: Herzinfarkt, Schlaganfall und arterielle Thrombosen ist die Atherosklerose mit verantwortlich. Sie beschreibt einen chronischen, inflammatorischen Prozess, deren Plaqueausprägung erstmals am lebenden Objekt mittels Magnetresonanz von Würzburgern Wissenschaftlern dargestellt wurde (WIESMANN, 2003). Durch eine gesteigerte Permeabilität des Endothels für Lipoproteine wird die Anlagerung von cholesterinreichen Lipoproteinen ermöglicht, die mit einer Entzündungsreaktion der Gefäßwand, sowie einer Dysfunktion des betroffenen Areals einhergeht. Aktivierte Thrombozyten steigern die Chemokin-, Zytokin- und Adhäsionsmolekülsynthese und locken dadurch Leukozyten chemotaktisch an, die subendothelial angereichert werden (RAUCH et al., 2001).

Zirkulierende Thrombozyten werden durch vorhandene atherosklerotische Plaques oder durch einen bereits aufbrechenden Plaque (Ruptur und Fissur vulnerabler Plaques) aktiviert, wobei hier die Glykoproteinrezeptoren GP Ib/IIIa und GP IIb/IIIa von entscheidender Bedeutung sind. Studien belegen eine Hyperaktivität der Thrombozyten bei diagnostizierter KHK (ZEIGER et al., 2000). Sie besitzen ferner intrazellulär Zytokine (CD 40L, Interleukin 1) und Wachstumsfaktoren in hohen Konzentrationen, die bei Aktivierung freigesetzt werden und die ihrerseits die adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen oder glatten Muskelzellen beeinflussen können. Durch Induktion der MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*)-Synthese und der ICAM/VCAM-Rezeptorexpression durch thrombozytäre Zytokine im Endothel werden Monozyten angeregt, sich an die Gefäßwand anzulagern (OSTERUD, 1997; RAUCH et al., 2001). Bei diesem Prozess stellt der thrombozytäre Transkriptionsfaktor $NF\kappa B$ eine zentrale Schnittstelle dar. Aktivierte Thrombozyten stimulieren das $NF\kappa B$ -System und

induzieren die NFκB- gesteuerte Transkription (GAWAZ, 1999).

Es ist für die Therapie der Atherosklerose und ihrer Folgeerkrankungen verständlich, dass zum einen die etablierten Risikofaktoren, wie Hypertonie, Hypercholesterinämie oder Adipositas ausgeschaltet werden müssen, die einen atherogenen Prozess verstärken können; zum anderen muss die Thrombozytenaggregation durch Hemmung einzelner Signalwege durch bestimmte Rezeptorblocker (Azetylsalizylsäure, Ticlopidin, Clopidogrel, Eptifibatide, Tirofiban, Abciximab) gehemmt werden (RAUCH et al., 2001; MCKENZIE et al., 2003).

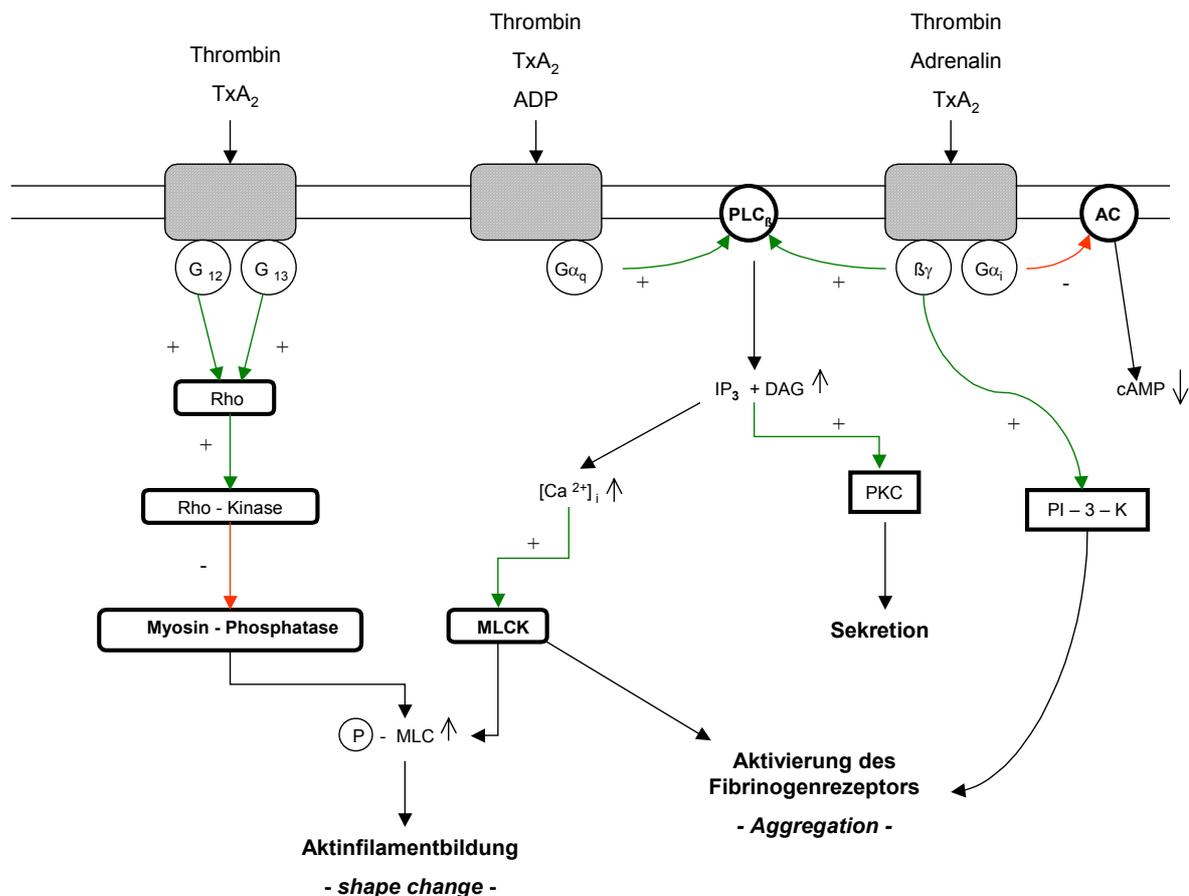


Abbildung 8. Signalkaskade der Thrombozytenaktivierung und Rolle der G-Proteine.

G_{αq} aktiviert die β-Form der Phospholipase C (PLC), die β-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP₃ induziert den Kalziumanstieg (Ca²⁺) und infolgedessen eine Aktivierung der MLCK (*Myosin-Light-Chain-Kinase*). Werden die leichten Ketten phosphoryliert, wird der Prozess der Pseudopodienbildung eingeleitet. Die Phosphorylierung kann auch durch die Aktivierung von G₁₂ und G₁₃ über den Rho-Rho-Kinaseweg kalziumunabhängig verstärkt werden. Diacylglycerol aktiviert die Proteinkinase C, die zur Freisetzung granulärer Inhaltsstoffe beiträgt; rot: Hemmung, grün: Aktivierung. Die Abbildung wurde nach SCHWARZ (2001) modifiziert.

In mehreren Studien konnte beobachtet werden, dass die Inzidenz der KHK in Ländern, in denen tierisches Eiweiß bevorzugt wird, höher ist, als in Regionen mit hohem Sojaprotein-

verzehr (FRIEDMANN und BRANDON, 2001; WONG et al., 1998). Daraus lässt sich schließen, dass die Erforschung alternativer Medikationen und Präventionen auf natürlicher Basis ebenso wie die Entwicklung neuer synthetischer Medikamente zur Therapie der koronaren Herzkrankung beitragen kann. Letztere können im Rahmen der Sekundärprävention eingesetzt werden.

1.2.4.2 Vorhofflimmern (VHF)

Vorhofflimmern ist eine supraventrikuläre Rhythmusstörung des Herzens. Bei Patienten mit VHF liegt eine unkoordinierte Erregungsleitung (Fibrillation) der Vorhöfe vor (FUSTER et al., 2001). Bei einem gesunden Menschen ist die Herzkontraktion regelmäßig und autonom. Dieser Vorgang (Erregungsbildung) wird bei Herzgesunden über den Sinusknoten (gebündelte Ansammlung von Nervenfasern), der in der Nähe des Vorhofs lokalisiert ist, gesteuert: Die im Sinusknoten aufgebaute Erregung breitet sich radiär aus und wandert über den av-Knoten, sowie nachfolgend über die His-Bündel sowie Purkinjefasern zur Ventrikelmuskulatur (Abbildung 9, S. 21). Die Erregungsleitung löst zunächst eine zeitlich koordinierte Kontraktion der Vorhöfe und anschließend der Kammern aus.

Folge des Vorhofflimmerns ist eine unkoordinierte Kontraktion des Vorhofes mit einer beschleunigten Vorhoffrequenz (bis 600 Schläge/min), die einen Transport des Blutes in die Ventrikel beeinträchtigt. Untergeordnete Erregungen, die sich durch einen so genannten „Mikro-Reentry-Mechanismus“ aufbauen, kreisen im Vorhof so langsam herum, bis sie auf erregbares Gewebe treffen (HENNERSDORF et al., 2001). Eine synchrone Kontraktion der Vorhöfe ist somit nicht mehr möglich (HENNERSDORF et al., 2001; DOBREV, 2004).

Andere Patienten bemerken das VHF nicht, so dass die Diagnose nur durch ein Elektrokardiogramm gestellt werden kann. Häufige Ursachen des Vorhofflimmerns, welches sowohl akut intermittierend als auch chronisch auftreten kann, sind die koronare Herzkrankheit, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonien, Hyperthyreose, akute Infektionen oder Lungenkarzinome. Chronischer Alkoholabusus kann ebenfalls dazu beitragen, ein VHF auszubilden (SZTAJZEL und STALDER, 2003; DOBREV, 2004). Auf Grund der Vielzahl möglicher Ursachen oder Begleiterkrankungen ist eine klare Abgrenzung als ein eigenständiges Krankheitsbild nicht möglich.

Es besteht eine doppelt so hohe Mortalitätsrate bei Patienten mit VHF als bei Herzgesunden. Auf Grund des erhöhten Risikos, unter anderem an arteriellen Thromboembolien zu erkranken, erleiden 90 % Patienten mit Vorhofflimmern einen Schlaganfall. Wahrscheinlich werden 70 % bis 80 % der Schlaganfälle, die sich auf VHF zurückführen lassen, nicht erfasst (SCHUCHERT et al., 2003).

Ungefähr 0,4 % bis 1 % der Bevölkerung weisen Vorhofflimmern auf (WAKTARE, 2002; SZTAJZEL und STALDER, 2003). Trotzdem muss mit einer hohen Dunkelziffer, in der Bevölke-

ung gerechnet werden, da das Vorhofflimmern häufig von den Betroffenen nicht bemerkt wird. Besonders ältere Personen bilden zu etwa einem Drittel ein Vorhofflimmern aus und es ist damit zu rechnen, dass auf Grund der demographischen Entwicklung die Zahl weiter ansteigt (KANNEL et al., 1983; FEINBERG et al., 1995; FALK, 2001).

Patienten mit Vorhofflimmern besitzen, ähnlich wie Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung, chronisch aktivierte Thrombozyten.

Studien zur Korrelation zwischen beiden Erkrankungen ergaben widersprüchliche Ergebnisse: In der CASS-Studie (*Coronary Artery Surgery Study*) fanden sich unter 18343 Patienten nur 116 Patienten mit Vorhofflimmern (CAMERON et al., 1988). Auf der anderen Seite sind 20 % der Myokardinfarkte von Vorhofflimmern begleitet (HILDEBRANDT et al., 1994). Und da die Inzidenz der Koronaren Herzerkrankungen weiter steigt, ist ebenso mit einer korrelierten Zunahme an Patienten mit Vorhofflimmern zu rechnen.

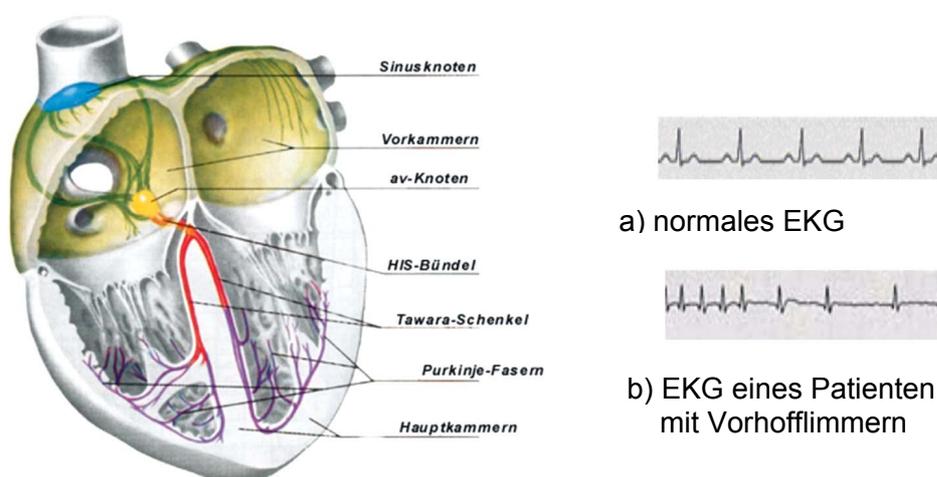


Abbildung 9. Beschreibung der Erregungsleitung am Herzen mit dargestellten Elektrokardiogrammen.

Die Abbildung beschreibt die Ausbreitung der Erregung am Herzen mit a) einem Elektrokardiogramm (EKG) eines Herzgesunden mit einer gleichmäßigen Herzaktion und immer wiederkehrenden, regelmäßigen Intervallen und b) eines Patienten mit Vorhofflimmern mit unkoordinierten, unregelmäßigen Intervallen.

2 ZIELSETZUNG

Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist eine der am häufigsten diagnostizierten Erkrankungen in der Bevölkerung. Es ist daher sowohl aus medizinischer als auch aus volkswirtschaftlicher Sicht wichtig, weiterhin an der Erforschung der koronaren Herzerkrankung zu arbeiten, um wirksame Ansätze zur primären und sekundären Prävention der KHK entwickeln zu können.

Die zentrale Rolle der Thrombozyten bei der Pathogenese der koronaren Herzerkrankung und deren Komplikationen (z.B. akutes koronares Syndrom) sowie deren Begleiterkrankungen ist unbestritten. Dabei setzen aktivierte Thrombozyten eine Vielzahl von prokoagulatorischen Substanzen frei, verändern entscheidend die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen und stimulieren die Monozyteneinwanderung und die Migration von Muskelzellen.

In mehreren Studien konnte beobachtet werden, dass die Inzidenz der KHK in asiatischen Regionen mit hohem Sojaproteinverzehr niedriger ist als bei der westeuropäischen Bevölkerung mit einem geringen Sojaproteinanteil an der täglichen Nahrung. Während allerdings die Beeinflussung des Lipidstoffwechsels von sojaproteinhaltenen Nahrungsmitteln oder von deren Inhaltsstoffen intensiv erforscht wurde (FINKEL, 1998; KIRK et al., 1998; POTTER, 1998; WONG et al., 1998; FRIEDMANN und BRANDON, 2001; KULLING und WATZEL, 2003), fehlen Untersuchungen zur Modulation der thrombozytären Funktion durch bioaktive Komponenten aus Soja sowohl bei Gesunden als auch bei KHK-Patienten.

Es war daher das Ziel, mithilfe einer umfangreichen Thrombozytenfunktionsdiagnostik (Aggregometrie und Durchflusszytometrie), anhand isolierter Thrombozyten gesunder Probanden und herzkranker Patienten, bioaktive Substanzen der Sojabohne zu identifizieren, die durch eine Hemmung der Thrombozytenfunktion das Risiko der Entstehung und Progression der koronaren Herzerkrankung mindern können. Falls bioaktive Substanzen der Sojabohne identifiziert wurden, war es ein weiteres Ziel der Arbeit, die Einzeleffekte dieser Substanzen und ihre Wechselwirkungen mit anderen Nahrungsbestandteilen hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Thrombozytenaggregation detaillierter zu untersuchen. Wenn nötig sollten hierfür Untersuchungsmethoden erweitert bzw. neu etabliert werden.

Die vorliegende Arbeit war ein Teilprojekt des BMBF-geförderten Netzwerkprojektes „Molekulare Ernährungsforschung“, das einen Beitrag zur „Krankheitsprävention durch Ernährung“ leisten sollte.

Nicht nur Patienten mit koronarer Herzerkrankung, sondern vor allem auch solche mit Vorhofflimmern – zum Teil als eine Folge der koronaren Herzerkrankung – besitzen chronisch aktivierte Thrombozyten und leiden unter dem Risiko schwerer, häufig letal verlaufender Komplikationen (akutes koronares Syndrom mit Myokardinfarkt, Apoplex; SHIMOMURA et al., 1989; CABIN et al., 1990; CORBALAN et al., 1992; PERINGS et al., 1998).

Während die medikamentöse Langzeittherapie der koronaren Herzerkrankung und des Vorhofflimmerns insbesondere bei jüngeren Patienten ohne strukturelle Herzerkrankung Erfolg versprechend ist, steht bei älteren Patienten unter anderem die Embolieprophylaxe mit Acetylsalizylsäure (ASS) oder Marcumar® im Vordergrund. Sämtliche Therapieformen sind auf Grund der massiven, z.T. lebensbedrohlichen Nebenwirkungen umstritten (HAGHI und SCHUMACHER, 2001; BOOS und CARLSSON, 2003; WYSE, 2003; ROCKSON und ALBERS, 2004; WIJFFELS und CRIJNS, 2004).

Es ist deshalb unerlässlich, wirksame Konzepte zur primären und sekundären Prävention zu entwickeln und im Rahmen der Ernährungsforschung nach bioaktiven Substanzen zu forschen, welche durch Hemmung der Thrombozytenaktivität vor der Ausbildung und Progression der ischämischen Herzerkrankung und deren Komplikationen schützt.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Materialien der aggregometrischen Messungen

Für die aggregometrischen Messungen wurden folgende Substanzen, Chemikalien und Geräte eingesetzt:

Isoflavon

Tabelle 4. Isoflavon mit Firmenherkunft

	Reagenz	Kat.-Nr.	Firma
Isoflavon	Genistein	G-6649	Sigma-Aldrich 82024 München

Aminosäuren/Dipeptide/Tripeptide

Tabelle 5. Aminosäuren, Di- und Tripeptide mit Firmenherkunft

	Reagenz	Kat.-Nr.	Firma	
Aminosäuren	Arg	A-8094	Sigma-Aldrich 82024 München	
	Asp	A-8949		
	Asn	A-0884		
	Glu	G-8415		
	Gln	G-8540		
	Ile	I-2752		
	Leu	L-8912		
	Lys	L-5501		
	Pro	P-0380		
	Val	V-0500		
Dipeptide	Asp-Glu	A-1916	Sigma-Aldrich 82024 München	
	Asp-Asp	A-6416		
	Asp-Leu	A-6291		
	Glu-Glu	G-3640		
	Glu-Asp	G-1910		
	Gln-Gln	G-8415		
	Ser-Glu	S-3638		
	Ile-Leu	G-2410		Bachem 79576 Weil am Rhein
	Val-Asp	G-3510		

Tabelle 5. Aminosäuren, Di- und Tripeptide mit Firmenherkunft (Fortsetzung von Seite 24)

	Reagenz	Kat.-Nr.	Firma
Tripeptide	Lys-Lys-Lys	L-8901	Sigma-Aldrich 82024 München
	Asp-Asp-Asp	H-8750	
	Glu-Glu-Glu	H-3160	Bachem 79576 Weil am Rhein
	Leu-Leu-Leu	H-3915	

Induktoren der Thrombozytenaggregation**Tabelle 6. Physiologische Induktoren mit Firmenherkunft**

	Reagenz	Kat.-Nr.	Firma
Induktoren	ADP	0203011	
	Adrenalin	0203007	möLab
	Kollagen	0203020	40732 Hilden
	Arachidonsäure	10162690	
	TRAP	605208	Calbiochem 65796 Bad Soden

- **PAR-PAK II Kombi Kit**, 0203020, möLab, 40732 Hilden

weitere Reagenzien

- **Celloclean E**, 0200019, möLab, 40732 Hilden
- **Celloton**, 0200003, möLab, 40732 Hilden
- **DMSO**, D-8418, Sigma-Aldrich, 82024 München
- **H₂O bidest.**

Geräte und Verbrauchsmittel

- **Platelet Aggregation Profiler**, Modell PAP 4ff, möLab, 40732 Hilden
- **Hämatologie-System**, Modell 87001, möLab, 40732 Hilden
- **Probengefäße Hämatologie System**, 0300003, möLab, 40732 Hilden
- **Rührstäbe makro**, 0403012, möLab, 40732 Hilden
- **Kunststoffröhrchen Patienten Plasma**, 0303020, möLab, 40732 Hilden
- **Spezial-Pipettenspitzen**, 0303032, möLab, 40732 Hilden
- **Test Tubes** (8,75 × 50 mm), 0303015, möLab, 40732 Hilden

3.1.2 Materialien der durchflusszytometrischen Messungen

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden folgende Substanzen, Chemikalien und Geräte eingesetzt:

Antikörper

Tabelle 7. Antikörper mit Firmenherkunft

	Reagenz	Kat.-Nr.	Firma
Antikörper	MlgGPE	345816	Becton Dickinson 69126 Heidelberg
	MlgGFITC	345815	
	CD 62PE	348107	
	CD 45FITC	345808	
	PAC-1FITC	340507	
	CD 41a PerCP-Cy5.5	333148	
	CD 41aPE	191416	
	CD 41aPE	555467	Becton Dickinson Pharmingen 69126 Heidelberg
andere	Calibrite beads	349502	Becton Dickinson 69126 Heidelberg

weitere Reagenzien

- **Formaldehydlösung**, ≤ 37 %, UN 2209, Merck, 64293 Darmstadt
- **PBS-DULBECCO**, L-1825, Biochrom, 12213 Berlin
- **FACSRinse**, 340346, Becton Dickinson, 69126 Heidelberg
- **FACSClean**, 340345, Becton Dickinson, 69126 Heidelberg
- **FACSFlow**, 342003, Becton Dickinson, 69126 Heidelberg

Geräte und Verbrauchsmittel

- **BD FACSCalibur**, Becton Dickinson, 69126 Heidelberg
- **Falcon-Röhrchen**, 5 mL, 2054, Becton Dickinson, 69126 Heidelberg

3.1.3 Sonstige Materialien

Für die Blutabnahmen, sonstigen Probenaufbereitungen und Ergebnisauswertungen wurden folgende Materialien, Geräte und Computerprogramme eingesetzt:

Blutabnahme und Aufbereitung

- **BD Vacutainer**, 9 mL oder 4,5 mL, Becton Dickinson, 69126 Heidelberg
- **Dialysekanülen**, 150 mm, 25, 1,6Ø, Fresenius, 61346 Bad Homburg
- **Zentrifuge Ultra**
- **Feinwaage**, Eppendorf, 22339 Hamburg
- **Pipetten- und Pipettenspitzen** (1000 µL, ≥ 200 µL, ≥ 10 µL), Eppendorf, 22339 Hamburg
- **Verbandsmaterialien**

Software

- **Microsoft Word 2000**
- **Microsoft EXCEL 2000**
- **SPSS 11.0**
- **CorelDraw 9.0**
- **Microsoft PowerPoint 9.0**

3.2 Methoden

3.2.1 Evaluierung der Probanden und Patienten

3.2.1.1 Probanden

Für die aggregometrischen und durchflusszytometrischen Messungen wurden freiwilligen gesunden Probanden Vollblut mit einer weitlumigen Dialysekanüle bis zu 60 mL venöses Vollblut abgenommen.

Die Probanden wurden vor Beginn der Blutabnahme über den Sinn und Zweck der Blutspende, sowie über die anschließende Probenaufbereitung mithilfe einer Probandeninformation aufgeklärt (Probandeninformation, Anhang, Abbildung 55). Durch ihre Unterschrift erklärten sich die Probanden mit der Art und dem Umfang der Blutabnahme einverstanden (Einverständniserklärung, Anhang, Abbildung 56). Vor Blutabnahme wurden die Probanden gebeten, einen strukturierten Fragebogen auszufüllen. Die Fragen konzentrierten sich auf die Ernährungs- und Lebensgewohnheiten der Probanden, auf die Medikation der letzten 7 Tage, sowie auf mögliche Vorerkrankungen (Fragebogen, Anhang, Abbildung 57). Für die aggregometrischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen spielten Alter und Geschlecht der Probanden keine Rolle. Probanden, die auf regelmäßige Medikamenteneinnahme angewiesen waren, wurden von den Untersuchungen ausgeschlossen, wenn die Medikamente bekannte Thrombozyten beeinflussende Wirkungen aufwiesen.

Alle Probanden standen unter der Aufsicht ärztlichen Personals und wurden für die Blutent-

nahmen mit einem Unkostenbeitrag entlohnt.

Nach einer mindestens zweiwöchigen Abstinenz konnten sich die Probanden wieder als Blutspender zur Verfügung stellen.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität genehmigt.

Folgende Ausschlusskriterien der Probanden wurden zu Beginn der Studie definiert:

- Medikamenteneinnahme (z.B. Analgetika) innerhalb der letzten 2 Wochen vor Blutentnahme
- Body Mass Index (BMI) > 30 kg/m²

3.2.1.2 *Patienten*

Zusammen mit der Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg wurde ein Patientenkollektiv für aggregometrische sowie durchflusszytometrische Messungen etabliert.

Hierzu wurden Patienten mit diagnostizierten Herzerkrankungen (KHK, Vorhofflimmern) durch einen Arzt bis zu 30 mL Vollblut venös abgenommen. Alle Patienten wurden mithilfe einer Patienteninformation vor der Blutabnahme hinreichend über den Grund der Blutspende und Weiterbehandlung der Blutproben durch den Arzt informiert (Patienteninformation Anhang, Abbildung 58). Vor Blutentnahme unterzeichneten die Patienten eine Einverständniserklärung (Einverständniserklärung, Anhang, Abbildung 59). Für die Evaluierung des Patientenkollektives wurden die Geburtsdaten, das Geschlecht und die verabreichte Medikation sowie aktuellen Krankenstatus mit bestehenden Begleiterkrankungen den Patientenakten entnommen und registriert.

Die Studie mit den Patienten wurde wie bei den gesunden Probanden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg genehmigt.

3.2.2 **Bestimmung der Thrombozytenzahl**

Von jedem Probanden bzw. Patienten wurden nach der Blutabnahme für alle weiteren Analysen die Thrombozytenzahl mit einem Hämatologiesystem der Firma möLab ermittelt.

Dieses Gerät arbeitet nach einem Widerstandsänderungsmessprinzip: Da Blutzellen nur bedingt in isotonischer Kochsalzlösung als Messmedium leitfähig sind, verdrängen sie durch ihren eigenen Umfang Ladungsträger (Elektronen), die sich in der Kochsalzlösung befinden. Dieser Verdrängungsprozess verringert den Stromfluss und erzeugt einen elektrischen Impuls, der vom Verstärker zum Analysator geleitet und vom Computer ausgewertet wird. Die Größe des Impulses ist abhängig von dem Volumen der Blutzelle (mÖLAB; 2003).

Für die Bestimmung der Thrombozytenzahl wurde 20 µL plättchenreiches Plasma, welches nach Blutabnahme durch Zentrifugation gewonnen wurde, ad 20 mL isotonische Kochsalzlösung (Celloton) pipettiert und anschließend analysiert. Das Gerät zeigte nach Messung die Anzahl der Blutplättchen im plättchenreichen und plättchenarmen Plasma (10^9 Thr/L) sowie das Mittlere Plättchenvolumen (MPV, fL) der Thrombozyten an. Von jeder Probe wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und diese anschließend gemittelt.

Lag die Anzahl der Thrombozyten über den für aggregometrische Messungen vorgeschlagenen Wert von $250 \pm 50 \cdot 10^9$ Thr/L, so wurde eine Verdünnung des plättchenreichen Plasmas mit plättchenarmen in einem Verhältnis 1:1 durchgeführt und anschließend die Thrombozytenzahl nochmals bestimmt.

3.2.3 Aggregometrie

3.2.3.1 Grundlagen der Aggregometrie

Seit Etablierung der Methode durch BORN 1962 wird die Aggregometrie in der klinischen Routinediagnostik zum Nachweis angeborener, erworbener oder medikamentös induzierter Funktionsstörungen der Thrombozyten herangezogen (BUDDE, 2002).

Das Messprinzip der Aggregometrie beruht auf einen internen Vergleich der induktor-abhängigen Aggregation zwischen plättchenarmen (PAP) und plättchenreichen Plasma (PRP). Nach Isolierung des plättchenreichen Plasmas und Herstellung des plättchenarmen wird geräteintern die Lichtdurchlässigkeit photometrisch in den Messküvetten gemessen und berechnet. Ist die Differenz in der optischen Dichte zwischen PAP und PRP größer als 5 %, jedoch geringer als 95 %, erweitert sich das im Aggregometer resultierende Signal zu einer 100 % Skala mit einem Ausgangswert von 0 %. In Abhängigkeit von dem Induktor, werden die Thrombozyten aktiviert und der Verlauf der Aggregation verfolgt.

Nach Injektion des Agonisten, z.B. nach ADP-Zugabe, bindet dieser an spezifische thrombozytäre Membranrezeptoren, die eine Kaskade an Aktivierungsreaktionen (*Shape Change*, Sekretion granulärer Inhaltsstoffe, Aggregation) bewirken. Ein im Aggregometer integrierter Drucker nimmt den Verlauf der Aggregation mit einer Geschwindigkeit von 25 mm/min auf und gibt sowohl die Endaggregation in Prozent sowie die Reaktionskinetik an.

3.2.3.2 Probenaufbereitung und aggregometrische Analyse

Nachstehende Aspekte der Thrombozytenaktivierung gesunder Probanden und herzkranker Patienten wurden aggregometrisch geprüft:

- Untersuchung der Aggregationen gesunder und herzkranker Patienten unter Verwendung von ADP, Adrenalin, Kollagen und Arachidonsäure
- Einfluss der Prüfsubstanzen auf die Thrombozytenaggregation

- Einfluss einer Kombination verschiedener Substanzen auf die Aggregationen

Für die aggregometrischen Messungen der Probanden und Patienten wurden Vollblutproben in gleicher Weise entnommen und aufbereitet.

Da eine Stauung des Blutes oder eine mechanische Belastung die Thrombozyten in einen höheren Aktivierungszustand versetzt, wurde für die Blutabnahme eine weitlumige Dialysekannüle gewählt. Insgesamt wurden 30 mL Vollblut venös entnommen und in einem Verhältnis von 1:9 (Citrat:Vollblut) antikoaguliert.

Die Aufbereitung der Proben erfolgte durchgehend bei 37 °C. Anschließend wurden die Vollblutproben bei 800 U/min 10 min zentrifugiert, um die Thrombozyten in den Plasmen anzureichern (Herstellung des PRP). Der Überstand wurde vorsichtig mit einer weitlumigen Pipettenspitze abgenommen, um eine Aktivierung der Thrombozyten, sowie eine Mitnahme roter Blutkörperchen zu vermeiden. Der Rückstand wurde erneut bei 4000 U/min 20 min zentrifugiert (Herstellung des PAP).

3.2.3.3 *Messung der Thrombozytenaggregation*

Die Messungen wurden nach standardisiertem Messprotokoll der Firma möLab durchgeführt und mit einem Aggregometer PAP 4ff analysiert (MÖLAB, 2002).

Tabelle 8 zeigt technische Kenndaten des verwendeten Aggregometers für die aggregometrische Analyse (MÖLAB, 2002). Für alle vier Messkanäle des Gerätes wurden pro Kanal 500 µL PAP sowie 450 µL PRP, welches bei Bedarf auf eine Thrombozytenzahl von $250 \pm 50 \cdot 10^9$ Thr/L eingestellt wurde, an Probenvolumen eingesetzt und mit 50 µL Induktorlösung versetzt. Die Volumina der PRP variierten auf Grund der zugesetzten Testsubstanzen je nach experimentellem Ansatz zwischen 424 µL und 450 µL.

Tabelle 8. Ausgewählte technische Parameter des PAP 4ff

Aggregometer PAP 4ff	Technische Daten
Messkanäle	4
Lichtquelle	Leuchtdioden (LED)
Wellenlänge	697 nm
Thermoblocktemperatur	37 °C ± 0,5 °C
Rührgeschwindigkeit	1000 U/min
Probenvolumen	450 µL

Die Tabelle wurde modifiziert nach der Firma mölab (MÖLAB, 2002).

Pro Kanal des Aggregometers wurde eine Probe gemessen. Die Daten wurden von einem

gerätespezifischen Drucker des Gerätes aufgezeichnet. Da insgesamt vier Messkanäle zur Verfügung standen, konnten in einem Versuchsansatz die Aggregationskurven von vier unabhängigen Proben gleichzeitig aufgezeichnet werden (Abbildung 10). Dadurch war es möglich, Kontrollplasmen, mit Prüfsubstanzen versetzte Plasmen einzeln oder als Gemisch in einem Versuchsansatz von gesunden Probanden oder Patienten mitzuführen. Dazu wurden in den Probengefäßen die jeweiligen Substanzlösungen vorgelegt. Dabei wurde das Volumen der Prüfsubstanz so klein wie möglich gehalten (maximal 26,25 µL) und die entsprechende Menge an plättchenreichen Plasma bis 450 µL zugesetzt und 10 min bei 37 °C im Inkubationsblock des Aggregometers inkubiert. Die Lichtdurchlässigkeit lag zunächst bei ungefähr 0 % und die Aggregation wurde durch Zugabe der Induktoren (50 µL) gestartet (Abbildung 11, S. 32).

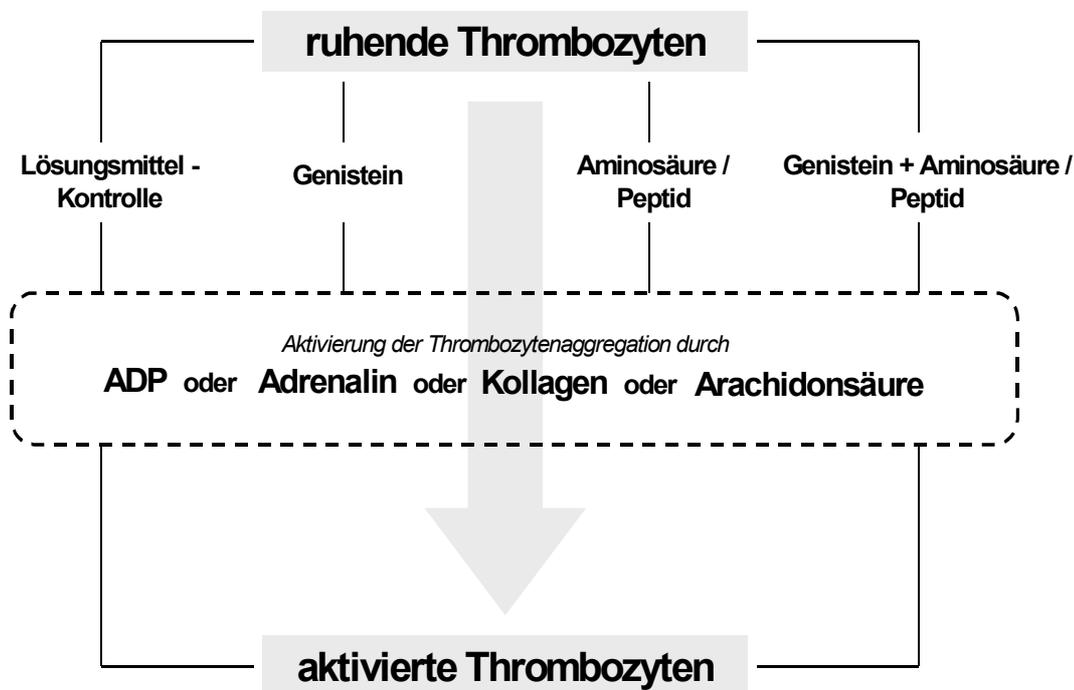


Abbildung 10. Prinzip der aggregometrischen Messungen.

Überführung ruhender Thrombozyten in den aktivierten Zustand durch Zugabe physiologischer Agonisten (ADP, Adrenalin, Kollagen, Arachidonsäure) für vier unabhängige Versuchsansätze, die mit verschiedenen Prüfsubstanzen inkubiert wurden (Lösungsmittel der Testsubstanzen, Genistein, Aminosäure/Peptid, Genistein + Aminosäure/Peptid)

Für die aggregometrischen Messungen wurden vier physiologische Induktoren verwendet, um möglichst genau die *in vivo* ablaufenden Vorgänge bei einer Thrombozytenaggregation *in vitro* nachvollziehen zu können.

ADP bindet an die purinergen Rezeptoren P_2X_1 , P_2Y_1 und P_2Y_{12} auf der Thrombozytenmembran. P_2Y_1 induziert die Kalziumfreisetzung intrazellulär und bewirkt die Aggregation mit einer vorausgehenden Formveränderung (*Shape Change*) der Thrombozyten. Änderung der Form geht bei der Induzierung des P_2Y_{12} Rezeptors nicht der Aggregation voraus, sondern bewirkt die Aggregation über die den Phosphatidylinositol-Stoffwechselweg. Der aktive Fibrinogenrezeptor (GP IIb/IIIa) wird exponiert und es kommt zur Membranveränderung der Thrombozyten (WILDE et al., 2000; CATTANEO, 2002; FONTANA et al., 2003; ROZALSKI et al., 2005).

Adrenalin fungiert zusammen mit anderen Aktivatoren und löst ähnliche Wirkungen wie ADP aus. Es bindet an α_2 -adrenergen Rezeptoren auf der Thrombozytenmembran. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren bewirkt eine Hemmung des Adenylatzyklase-Signalweges in der Zelle und löst dadurch eine Zunahme der zytosolischen Kalziumkonzentration aus.

Dadurch wird – ähnlich wie beim ADP – die Konformationsänderung des GP IIb/IIIa induziert (SPALDING et al., 1998; SAEED et al., 2004).

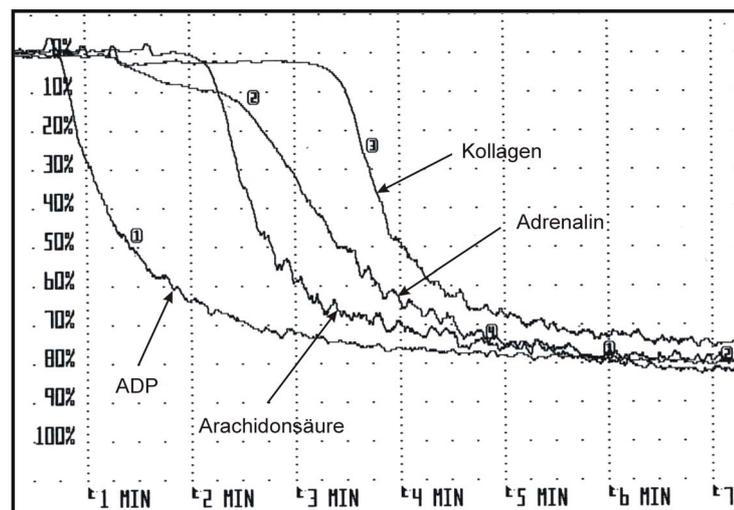


Abbildung 11. Aggregationskurven der verwendeten Induktoren eines gesunden Probanden im Originalausdruck des Aggregometers.

Gemessen wurde die Zunahme der Lichtdurchlässigkeit des plättchenreichen Plasmas im Messröhrchen in Prozent (%) und in Abhängigkeit von der Zeit für alle verwendeten physiologische Induktoren. Die Zunahme der Lichtdurchlässigkeit wird durch die Abnahme der Trübung im Messröhrchen verursacht, sodass die jeweiligen Kurven einen negativen Verlauf besitzen.

Kollagen bindet entweder an GP Ia/IIa und/oder an GP VI. Nach dem durch SANTORO et al. (1991) entwickelten Modell „*Two-Step, Two-Side*“ sorgt der erstgenannte Rezeptor für die Adhäsion des Blutplättchens und der zweite für die Aktivierung der gebundenen Thrombozyten. Dieses Modell wurde durch WATSON et al. (2000) weiterentwickelt: Demnach kommt es

zu einer Interaktion zwischen beiden Rezeptoren. Die Signale, die von GP VI ausgehen, steigern die Affinität von GP Ia/IIa für Kollagen und zusammen bewirken sie die Thrombozytenaggregation (WATSON et al., 2000; CHEN und KHAN, 2003).

Es besteht außerdem eine „Kooperation“ zwischen einer durch ADP ausgelösten Aktivierung und der Bindung von Kollagen an die Rezeptoren:

Demnach kann der Rezeptor GP Ia/IIa (Integrin $\alpha_2\beta_1$) durch die Bindung anderer Agonisten (z.B. ADP) an ihre Rezeptoren von einem niedrigen Affinitätszustand für Kollagen in einen höheren gelangen und den Kollagenrezeptor indirekt aktivieren (JUNG und MOROI, 2001).

Ein aktivierter und adhärenter Thrombozyt setzt Arachidonsäure frei und bildet Thromboxan A_2 , das wiederum über die Bindung an den Thromboxanrezeptor der Thrombozytenmembran die Aktivierungsprozesse des Thrombozyten weiter vorantreibt (GAWAZ, 1999).

Alle Induktoren wurden nach Anleitung der Firma möLab in Aqua bidest. aufgenommen und nach Gebrauch im Kühlschrank (Ausnahme: Arachidonsäure bei -20 °C) bei 4 °C bis 8 °C gelagert. Ebenfalls nach Gebrauchsanleitung wurden die Induktoren in folgenden Konzentrationen für die aggregometrischen Messungen eingesetzt (MÖLAB, 2002; Tabelle 9).

Tabelle 9. Konzentrationen der Induktoren und deren Einsatzmenge in den aggregometrischen Messungen nach Angaben des Herstellers

Reagenz	Konzentration (nach Auflösung der Trockensubstanz)	Endkonzentration im Messröhrchen
ADP	$2 \cdot 10^{-4}$ mol/L	$2 \cdot 10^{-5}$ mol/L
Adrenalin	$1 \cdot 10^{-3}$ mol/L	$1 \cdot 10^{-4}$ mol/L
Kollagen	1,9 mg/mL	0,083 mg/mL
Arachidonsäure	5 mg/mL	0,5 mg/mL

Eine Vielzahl an Substanzen wurde aggregometrisch getestet: Isoflavone der Sojabohne sowie unterschiedliche Peptidsequenzen, die in dem Protein dieser Pflanze reichlich vorkommen. Dazu wurden aus der internationalen Datenbank für Proteine (SWALL) des *European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI) die Sequenzen für β -Conglycinin und Glycinin herausgesucht, nach theoretisch vorkommenden Dipeptiden eingeteilt und nach ihrer Häufigkeit geordnet (Anhang, Tabelle 35). Zusätzlich wurden in der Arbeit Peptide und Aminosäuren getestet, die sich im Laufe der Studie als wirksam erwiesen. Tabelle 10 (S. 34) zeigt eine Übersicht aller Substanzen, die in der Aggregometrie auf ihre Beeinflussung der Thrombozy-

tenaggregation getestet wurden. Insgesamt wurden 25 Substanzen in Doppelbestimmungen mit den Induktoren ADP, Adrenalin, Kollagen und Arachidonsäure hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Aggregation geprüft. Mit jeweils 4 bis 5 Versuchen bei gesunden Probanden, wurden mindestens 32 Analysen pro Substanz und damit – unter Berücksichtigung der Gesamtanzahl der Prüfsubstanzen – mindestens 800 aggregometrische Messungen in dieser Studie bei gesunden Probanden durchgeführt.

Auf Grund der geringen Patientenzahl und deren Medikation konnten nur die aggregometrischen Versuche durchgeführt werden, bei denen die Referenzkurven normale Aggregationsverläufe zeigten.

Tabelle 10. Untersuchte Prüfsubstanzen in der Aggregometrie

Isoflavone	Aminosäuren	Dipeptide	Tripeptide
Genistein	Glu	Glu-Glu	Glu-Glu-Glu
	Asp	Asp-Asp	Lys-Lys-Lys
	Leu	Asp-Glu	Leu-Leu-Leu
	Ile	Glu-Asp	Val-Pro-Leu
	Gln	Ile-Leu	Asp-Asp-Asp
	Asn	Gln-Gln	
	Val	Val-Asp	
	Pro	Ser-Glu	
	Arg	Asp-Leu	
	Lys		

In der Tabelle sind alle in der Aggregometrie eingesetzten Isoflavone, Aminosäuren, Di- und Tripeptide unter Angabe der Aminosäuren im Drei-Buchstabencode aufgelistet.

Glu (Glutamat), Asp (Aspartat), Leu (Leucin), Ile (Isoleucin), Gln (Glutamin), Asn (Asparagin), Val (Valin), Pro (Prolin), Arg (Arginin), Lys (Lysin), Ser (Serin)

3.2.3.4 *Etablierung der aggregometrischen Messung*

Einflussfaktor Temperatur

Inwieweit sich die Temperatur auf die Thrombozytenaggregation sowie auf deren Geschwindigkeit auswirkt, wurde in Vorversuchen ermittelt. Dazu wurden aggregometrische Messungen bei Raumtemperatur (23 °C) und bei der physiologischen Körpertemperatur (37 °C) durchgeführt.

Einflussfaktor Vorinkubationszeit

Als ein weiterer Vorversuch wurde die mögliche Einflussnahme der Vorinkubationszeit auf die Thrombozytenaggregation untersucht. Die Messungen wurden gestartet und die Induktoren jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten dem plättchenreichen Plasma zugesetzt (0, 10, 20, 30, 40, 60 min). Für jeden Induktor wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Einflussfaktor Lösungsmittel

Für die aggregometrischen Messungen wurde eine konzentrierte Stammlösung der jeweiligen Testsubstanz angesetzt (20, 25 oder 100 mM), um deren Volumen in der Testküvette zu minimieren. Dies hing von den spezifischen Lösungseigenschaften der jeweiligen Moleküle ab. Eine Auflistung der Peptide mit ihrem Lösungsmittel sowie mit ihrem eingesetzten Pipetervolumen ist in Tabelle 11 (S. 36) dargestellt.

Genistein sowie einige Peptide wurden vollständig in 100 % DMSO gelöst. Die Konzentrationen der Aminosäuren und Peptide in den Stammlösungen betragen 100 mM. Die Endkonzentration des DMSOs betrug im Messröhrchen maximal 1,25 %. Peptide und Aminosäuren, die sich nicht vollständig in DMSO lösten, wurden in isotonischer Kochsalzlösung aufgenommen. Die Konzentrationen der Stammlösungen dieser Substanzen betragen entweder 20 mM, 25 mM oder 100 mM.

Beide Lösungsmittel, DMSO und isotonische Kochsalzlösung, wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die thrombozytäre Aggregation untersucht. Zusätzlich wurden die Lösungsmittelkontrollen regelmäßig Abständen mit Kontrollplasmen ohne Zusätze verglichen. Die Effekte der Prüfsubstanzen wurden jeweils mit den lösungsmittelspezifischen Kontrollen verglichen. Alle aggregometrischen Analysen eines Probanden oder Patienten wurden innerhalb von 3 h abgeschlossen und überschüssiges Plasma verworfen.

Aggregometrische Referenzbereiche der Induktoren

Um eine Messung qualitativ und quantitativ beurteilen zu können, wurden die von der Firma möLab ermittelten Referenzbereiche für die verwendeten Induktoren ADP, Adrenalin, Kollagen und Arachidonsäure zu Grunde gelegt (Tabelle 12, S. 37). Da ein Über- bzw. Unterschreiten der aggregometrischen Referenzwerte von 20 % laut Protokoll der Firma möLab zu

tolerieren ist (MÖLAB, 2002), wurden diejenigen Messungen in die Auswertung nicht einbezogen, die außerhalb der angegebenen Richtwerte lagen.

Datenauswertung

Für die Datenauswertung wurden die maximalen Endaggregationen verwendet, die der gerätespezifische Drucker nach Abschluss der jeweiligen Aggregation anzeigte.

Tabelle 11. Pipettier volumina und Lösungsmittel der Aminosäuren und Peptide

Testsubstanz	Lösungs- mittel	Konzentration der Stamm- lösung [mM]	Pipettier- volumen [µL]	End- konzentration [mM]
Aminosäuren				
Glu	DMSO	100	5	1
Asn	IK	100	5	1
Gln	IK	100	5	1
Ile	IK	100	5	1
Leu	IK	100	5	1
Arg	IK	100	5	1
Lys	IK	100	5	1
Pro	IK	100	5	1
Asp	IK	25	20	1
Val	IK	20	25	1
Dipeptide				
Glu-Glu	DMSO	100	5	1
Asp-Glu	DMSO	100	5	1
Asp-Asp	DMSO	100	5	1
Ser-Glu	IK	100	5	1
Ile-Leu	IK	100	5	1
Asp-Leu	IK	25	20	1
Gln-Gln	IK	25	20	1
Glu-Asp	IK	25	20	1
Val-Asp	IK	20	25	1
Tripeptide				
Glu-Glu-Glu	DMSO	100	5	1
Asp-Asp-Asp	DMSO	100	5	1
Val-Pro-Leu	DMSO	100	5	1
Lys-Lys-Lys	IK	100	5	1
Leu-Leu-Leu	IK	20	25	1

Dargestellt wurden die analysierten Aminosäuren und Peptide und ihre jeweiligen Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) und isotonische Kochsalzlösung (IK) in unterschiedlichen Konzentrationen der Stammlösungen (20, 25, 100 mM) und unterschiedlichen Pipettier volumina (5, 20, 25 µL), aber gleichen Endkonzentrationen (1mM).

Tabelle 12. Aggregationsreferenzbereiche physiologischer Induktoren

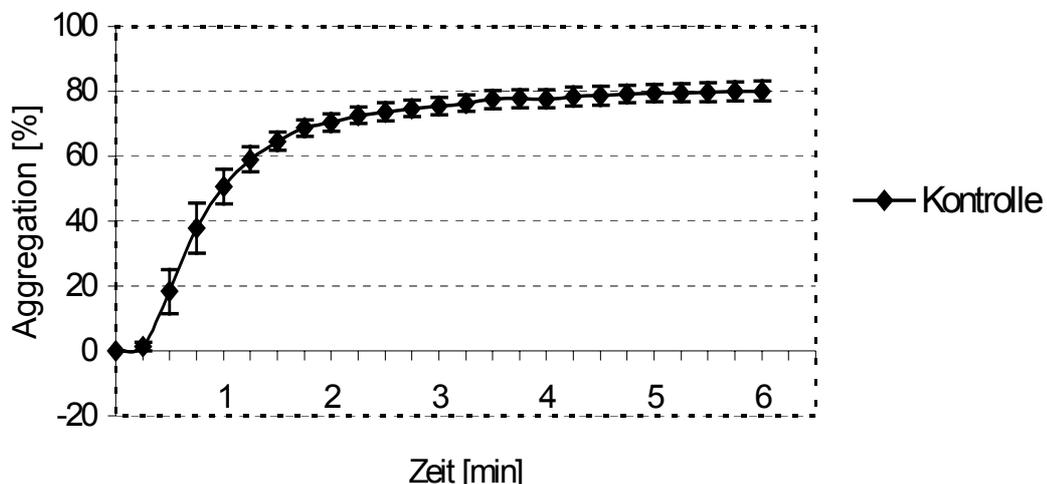
	ADP	Adrenalin	Kollagen	Arachidonsäure
Referenzbereich	70 – 90 %	70 – 80 %	60 – 80 %	70 – 80 %

Dargestellt wurden die Normal- bzw. Referenzbereiche der Induktoren der Thrombozytenaggregation. Ein Unter- bzw. Überschreiten der Bereiche von $\pm 20\%$ kann toleriert werden (MÖLAB, 2002).

Falls die induzierten Aggregationen reversible Kurvenverläufe zeigten, wurde die maximale Aggregation durch Selbstablesen bestimmt. Dies war z.B. in seltenen Fällen bei dem Induktor ADP der Fall, von dem bekannt ist, reversible Aggregationen auszulösen.

Auf Grund der inter-individuellen Schwankungen und der hohen Empfindlichkeit des Induktors Arachidonsäure gegenüber den Thrombozyten, wurde eine andere Vorgehensweise in der Auswertung der Arachidonsäure-induzierten Aggregationen gewählt.

Für die Darstellungen der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregationen wurden die Aggregationen alle 15 s abgelesen und als Diagramm mit den Standardabweichungen aufgetragen. Diese Kurven werden im Ergebnisteil – im Gegensatz zum Originalausdruck des Aggregometers – durch einen nach oben gerichteten Verlauf dargestellt (Abbildung 12).

**Abbildung 12. Auswertung einer Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation.**

Es wurden in diesem Beispiel der Lösungsmittelkontrolle insgesamt 5 Experimente durchgeführt und alle 15 s die Aggregationen zu diesem Zeitpunkt abgelesen, gemittelt und schematisch mit Standardabweichungen aufgetragen.

3.2.4 Durchflusszytometrie

3.2.4.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die schnelle und präzise Analyse und Charakterisierung unterschiedlicher Zellen, die in einer Zellsuspension vorliegen. Das Messprinzip beruht auf der simultanen Analyse unterschiedlicher Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften der Zellen. Je nachdem, welche Zellen bzw. welche spezifischen Zelleigenschaften zu untersuchen sind, werden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte, funktions-, molekül- bzw. zellspezifische Antikörper der Suspension zugesetzt.

Die markierte Suspension wird direkt aus dem Probenröhrchen durch Überdruck in eine Messküvette geleitet (Abbildung 13, S. 41). Eine Trägerflüssigkeit beschleunigt die Partikel der Suspension und transportiert sie zum Messpunkt des Gerätes (Hydrodynamische Fokussierung). Alle markierten Thrombozyten erreichen im Idealfall einzeln den Analysenpunkt (Perlenkettenanordnung).

Die Zellen einer Zellsuspension können an diesem Ort anhand ihrer unterschiedlichen Streulichteigenschaften charakterisiert werden. Dazu ist eine Richtungsänderung des einfallenden Lichts (Lichtquelle: Argonlaser) nötig. Diese Richtungsänderung kommt durch die unterschiedliche Größe der Zellen, durch die Struktur der Zellmembranen sowie durch die vielfältige Kompartimentierung der Zellen zustande.

Ein Maß für die Größe der zu untersuchenden Zellen stellt das Vorwärtsstreulicht (*Forward Light Scatter*, FSC) dar, welches die Streuung in Richtung des einfallenden Lichtes charakterisiert: Kleine Zellen, wie z.B. Thrombozyten, streuen das Licht schwächer. Das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*, SSC) breitet sich rechtwinklig zum einfallenden Licht aus und erlaubt Aussagen über die interne Granularität und Oberflächenbeschaffenheit der Zellen. Gleichzeitig wird die Fluoreszenz gemessen, indem Lichtenergie über einen für fluoreszierende Moleküle charakteristischen Wellenlängenbereich absorbiert wird. Elektronen werden in ein höheres Energieniveau gehoben und geben bei ihrem anschließenden Rückgang in ein niedrigeres Energieniveau ein Photon ab (Photoemission). Dieser Prozess eines Strahlenüberganges beschreibt die Fluoreszenz.

Zwei Antikörper, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, können anhand des unterschiedlichen Absorptionsspektrums für diese Stoffe, im Seitwärtsstreulicht unterschieden werden. Die Kombination mehrerer Antikörper (Mehrfarbenfluoreszenzanalyse) ermöglicht den Vergleich mehrerer unterschiedlicher Zelleigenschaften miteinander.

3.2.4.2 Mehrfarbenfluoreszenzanalyse

Bei der Untersuchung von Thrombozytenpopulationen durch Mehrfarbenfluoreszenz werden funktionelle Antigene auf der Zelloberfläche mit spezifischen Antikörper gekoppelt, um gleichzeitig mehrere Antigene auf der Thrombozytenmembran zu charakterisieren.

Die monoklonalen Antikörper sind dabei mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen versehen. Durch Lichtanregung bestimmter Wellenlängen, können diese Substanzen ihrerseits erneut Licht einer für sie charakteristischen Wellenlänge emittieren. Deshalb ist es sinnvoll, Fluoreszenzfarbstoffe zu verwenden, die ähnliche Absorptionsmaxima, aber unterschiedliche und deutlich voneinander entfernte Emissionsspektren aufweisen, um von unterschiedlichen Detektoren des durchflusszytometrischen Systems gemessen werden zu können.

Je nach Fragestellung wurden für die Untersuchungen die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Peridin-Chlorophyll-Protein (PerCP) miteinander kombiniert. Das Fluorochrom FITC wird bei einer Wellenlänge von 489 nm angeregt und besitzt ein Emissionsmaximum bei 515 nm, PE wird bei 545 bzw. 565 nm angeregt und besitzt sein Maximum bei 570 nm. Die optimale Anregung für das Fluorochrom PerCP liegt bei 490 nm, das Emissionsmaximum bei 650 nm (Tabelle 13).

Tabelle 13. Charakterisierung der Fluoreszenzfarbstoffe in der Durchflusszytometrie

Parameter	Eigenschaften		
	Wellenlänge [nm]	Farbe	Fluorochrom
FL – 1	515 – 545	grün	FITC
FL – 2	564 – 606	orange	PE
FL – 3	> 650	rot	PerCP
Argonlaser	488		

Es wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Peridin-Chlorophyll-Protein (PerCP) für die durchflusszytometrischen Analysen verwendet. Diese verschiedenen Farbstoffe können durch das Zytometer anhand der Fluoreszenzen unterschieden werden (FL 1, 2, 3), da sie durch einen Argonlaser bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden und eine entsprechende Farbe emittieren.

3.2.4.3 *Probenaufbereitung und durchflusszytometrische Analyse*

Mit einem FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) der Firma Becton Dickinson wurden verschiedene aktivierungsabhängige Antigene der Thrombozytenmembran gesunder und herzkranker Patienten untersucht.

Die Analysen folgender funktioneller Teilaspekte standen im Vordergrund:

- Bestimmung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten gesunder Probanden im Vergleich zu herzkranken Patienten
- Analyse der P-Selektinexpression der Probanden und Patienten

- Charakterisierung des Aktivierungsstatus gesunder Probanden und herzkranker Patienten durch Untersuchung der P-Selektin- und PAC-1-Expression

Probenaufbereitung

Für die Messungen wurden ungefähr 5 mL citratantikoaguliertes Vollblut unmittelbar nach der Blutabnahme für die Analysen vorbereitet und mit Vorsicht behandelt, um eine unnötige Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Venöses, antikoaguliertes Vollblut wurde mit einem Aktivator versetzt und anschließend mit spezifischen Antikörpern markiert.

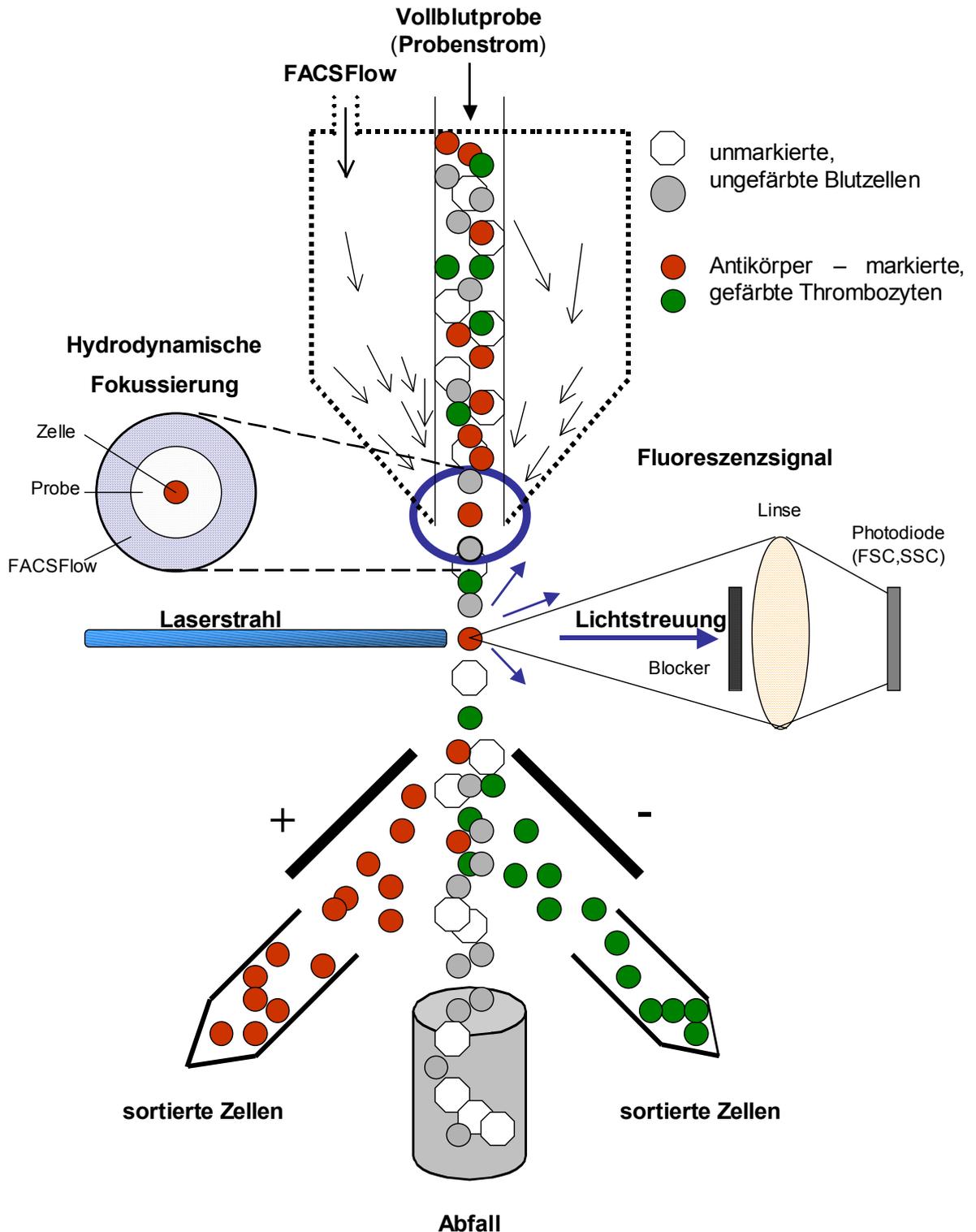


Abbildung 13. Messprinzip eines Durchflusszytometers.

Die Vollblutprobe, die verschiedenartig gefärbte Zellen enthält, wird durch Druck in Einzelzellen getrennt und diese hintereinander aufgereiht (Perlenkettenanordnung), bevor der Laserstrahl auf die einzelnen Zellen trifft. Anhand der Größe und der unterschiedlichen Granularität ist es möglich, die Zellen voneinander zu unterscheiden, wenn sie mit Antikörpern, die ungleiche Fluorochrome tragen, markiert wurden.

Folgende Antikörper wurden in der Durchflusszytometrie angewendet:

- CD 41a: Klon HIP 8. Dieser erkennt den kalziumabhängigen GP IIb/IIIa Komplex (Rezeptor für Fibrinogen, Teil GP IIb), welcher auf Thrombozyten und Megakaryozyten vorhanden ist und die Thrombozytenadhäsion und Aggregation vermittelt.
- CD 45: Klon 2D1. Er erkennt das membranständige Leukozytenantigen, welches auf humanen Leukozyten in 5 verschiedenen Isoformen vorkommen kann und als Pan-Leukozytenantigen fungiert. Der intrazelluläre Bereich weist Tyrosin-Phosphataseaktivität auf.
- CD 62: Klon AC 1.2 oder P-Selektin oder PADGEM (*Platelet Activation Dependent Granule External Membrane Protein*) bzw. integrales Membranprotein GMP - 140. CD 62 gehört zur Gruppe der Adhäsionsmoleküle und gilt als Mediator der Adhäsion zwischen Thrombozyten und Monozyten bzw. Neutrophilen, liegt im ruhenden Zustand in den α -Granula der Thrombozyten vor und zeigt sich erst nach Aktivierung an der Thrombozytenmembran.
- PAC-1: Klon SP-2. PAC-1 erkennt ein Epitop des GP IIb/IIIa Komplexes nur aktivierten Zustand.

Die Aktivierung des Vollblutes erfolgte innerhalb von 10 min nach Blutentnahme, um eine Eigenaktivierung der Thrombozyten und unspezifische Einflüsse von außen zu vermeiden. Jeweils 45 μ L Vollblut wurden in Falcon-Röhrchen überführt und mit 5 μ L Aktivator bzw. mit Aktivator-Lösungsmittel (Kontrolle) versetzt, vorsichtig geschwenkt und anschließend im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) exakt 5 min inkubiert (Aktivierung der Thrombozyten).

Im Vorfeld wurden die Antikörper und Antikörperkontrollen in Falcon-Röhrchen nach einem standardisierten Pipetierschema vorbereitet und mit jeweils 5 μ L aktiviertem Vollblut versetzt, vorsichtig geschwenkt und anschließend 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln markiert (Antikörpermarkierung der Thrombozyten). Alle verwendeten Antikörper wurden im Überschuss eingesetzt.

Nach erfolgter Bindung der Antikörper wurde der Aktivierungszustand der Thrombozyten durch Zugabe einer 1 %-igen Paraformaldehydlösung in PBS fixiert. Nach weiteren 30 min bei 4 °C im Dunkeln konnte mit einer durchflusszytometrischen Messung begonnen werden.

Die maximale Haltbarkeit der Proben nach der Fixierung lag bei 24 h.

Messung des thrombozytären Aktivierungszustandes durch Einfarben- sowie Zweifarben-Immunfluoreszenzanalyse gesunder Probanden und herzkranker Patienten

Zur Charakterisierung des Aktivierungsstatus der Thrombozyten wurde zum einen die Expression von P-Selektin (Markierung mit CD 62PE) auf der Membran vor und nach Aktivierung untersucht und zum anderen die Fähigkeit der Thrombozyten analysiert, bei erfolgter Aktivierung mit Leukozyten Aggregate (CD 41PE-CD 45FITC-Aggregate) zu bilden. Aktiviert wurden die Thrombozyten durch TRAP (Thrombinrezeptor-Aktivierendes-Peptid). TRAP (1mM) wurde in PBS aufgenommen. Die TRAP-Konzentration im Vollblut betrug 100 μ M.

Abbildung 14 (S. 44) stellt das Pipettierschema für die Analyse der Thrombozyten in der Einfarben- bzw. in der Zweifarbenimmunfluoreszenzanalyse dar: 5 μ L TRAP-aktiviertes Vollblut wurde zur Untersuchung der P-Selektinexpression mit 20 μ L CD 62PE markiert (Einfarbenmarkierung). Unspezifische Bindungen, die in Fluoreszenzanalysen als falsch-positive Signale registriert werden können, wurden in Parallelproben durch Zusatz von Immunglobulinen der Klasse G der Maus (MIgG PE) ausgeschlossen. Hierzu wurde 5 μ L TRAP-aktiviertes Vollblut mit 10 μ L MIgG PE versetzt und markiert.

Zur Bestimmung der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate wurden 5 μ L TRAP-aktiviertes Vollblut mit 10 μ L CD 41PE (thrombozytenspezifisch) und CD 45FITC (leukozytenspezifisch) zugesetzt (Zweifarbemarkierung). Ferner wurden zum Ausschluss unspezifischer Bindungen eine Kontrolle mit jeweils 5 μ L IgG der Maus (MIgG FITC/MIgG PE) als Zweifachmarkierung mitgeführt.

Als weitere Kontrollen dienten Vollblutproben, denen weder Antikörper noch Immunglobuline der Maus zugesetzt wurden, und jeweils nur TRAP oder das TRAP-Lösungsmittel enthielten.

Messung des thrombozytären Aktivierungszustandes durch Dreifarben-Immunfluoreszenzanalyse gesunder Probanden und herzkranker Patienten

Um den Aktivierungszustand chronisch aktivierter Thrombozyten erfassen zu können, wurden spezielle Antigene der Thrombozyten untersucht, die sich erst nach einer Aktivierung an der Oberfläche der Blutplättchen zeigen.

Dazu wurden P-Selektin und die aktivierte Form des GP IIb/IIIa Rezeptors der Membran als thrombozytenspezifische Antigene durchflusszytometrisch charakterisiert (Abbildung 15, S. 44). Für die Aktivierung der Thrombozyten wurde ADP als Induktor eingesetzt. ADP ($2 \cdot 10^{-4}$ M) wurde in isotonischer Kochsalzlösung aufgenommen. Die ADP-Endkonzentration betrug im Aktivierungsansatz $2 \cdot 10^{-5}$ M.

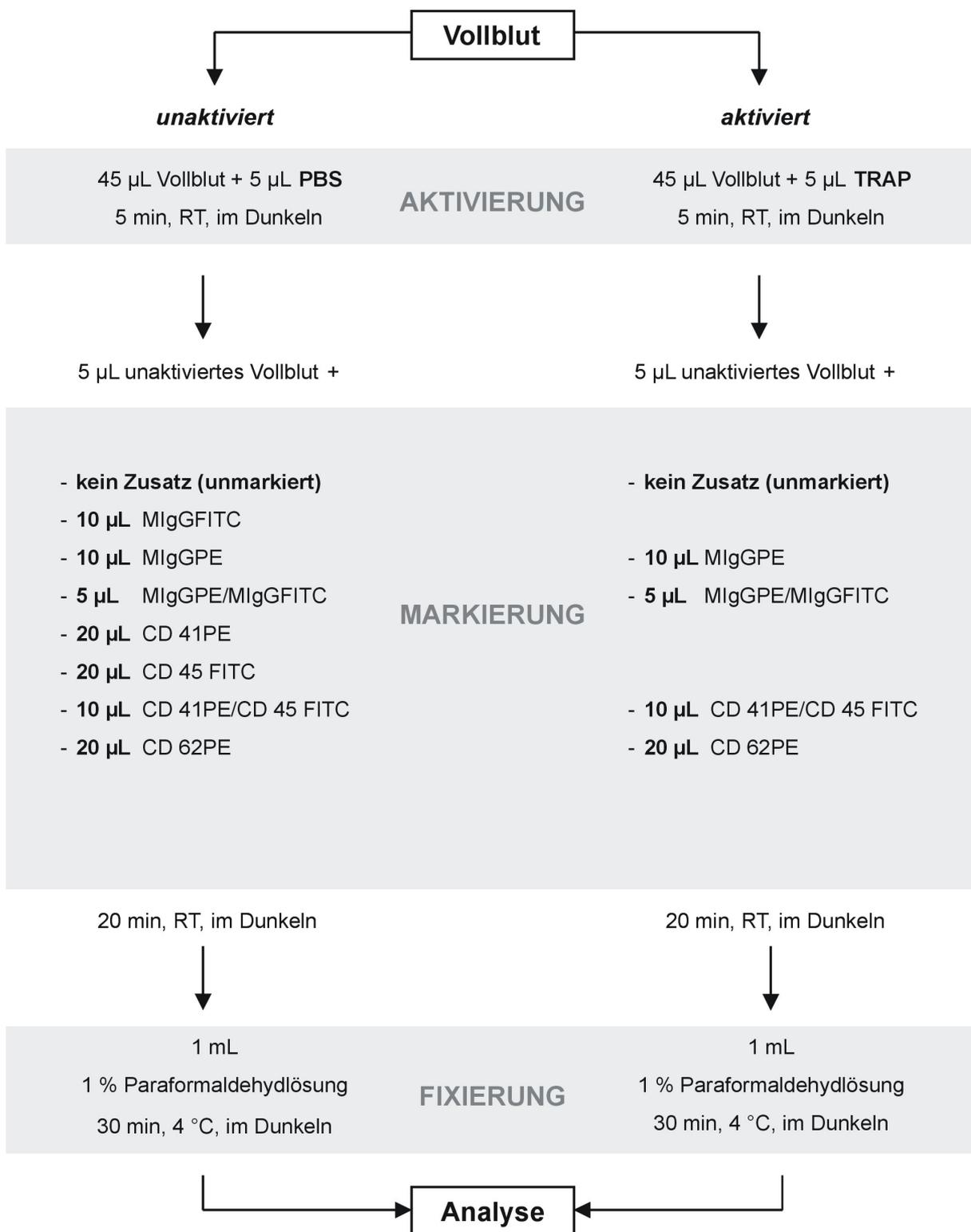


Abbildung 14. Probenaufbereitung zur funktionellen Charakterisierung der Thrombozyten in der Einfarben- und Zweifarbenimmunfluoreszenzanalyse.

Die Probenaufbereitung nach Blutabnahme ist durch die Teilschritte Aktivierung der Thrombozyten, Markierung mit Antikörpern und Fixierung der Thrombozyten gekennzeichnet. Anschließend erfolgt die Analyse am Durchflusszytometer.

Jeweils 5 μL ADP-aktiviertes bzw. ADP-unaktiviertes Vollblut wurden mit 10 μL PAC-1 FITC und 10 μL CD 62PE versetzt. Zur Detektion der Thrombozyten im aktivierten und unaktivierten Zustand, wurde als ein zusätzlicher Antikörper 10 μL CD 41aPerCP jedem Probenröhrchen zugesetzt. Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen wurden Immunglobuline der Maus in der PE- bzw. FITC-Färbung mitgeführt. Alle Antikörper lagen im gleichen Volumenverhältnis zueinander vor (Abbildung 15, S. 46). Als zusätzliche Kontrolllösung wurde ein zweiter Ansatz mit PAC-1 FITC/CD 62PE/CD 41aPerCP mit 5 μL RGDS, ein spezifisch PAC-1 hemmendes Tetrapeptid versehen. Ein unaktivierter Parallelansatz wurde dementsprechend mit 5 μL PBS mitgeführt. Die Konzentration an RGDS betrug 10 mg/ mL. Es wurden dieselben Markierungs-, Aktivierungs-, und Fixierungszeiten wie bei der Einfarben- bzw. Zweifarbenmarkierung eingehalten.

Durchflusszytometrische Analyse

Die Darstellung der Thrombozyten erfolgte in einer Gegenüberstellung verschiedener Parameter: Durch die logarithmische Einstellungen der Fluoreszenzintensitäten FSC (*Forward Light Scatter*) vs. SSC (*Side Scatter*) stellten sich alle morphologisch ähnlichen Zellen (z.B. Leukozyten, Thrombozyten) als eine homogene Wolke dar. Durch Setzen eines elektronischen Fensters (Gate) wurde die Thrombozytenpopulation ausgewählt und anhand der Gegenüberstellung einzelner unterschiedlicher Fluoreszenzen untersucht (Abbildung 16, S. 47). Da in der Durchflusszytometrie insgesamt fünf Parameter miteinander korreliert werden können (FFC, SSC, FL-1, FL-2, FL-3), jedoch nur 2 Parameter quantifizierbar sind, mussten mehrere DotPlots (Analysenfenster) erstellt werden.

Für die CD 62PE-Markierung (Einfarbenimmunfluoreszenzanalyse) wurde zur Quantisierung die FL-1-Fluoreszenz verwendet (Abbildung 17, S. 48).

In der Zweifarbenimmunfluoreszenzanalyse wurden FFC vs. SSC sowie FL-1 (CD 45 FITC) vs. FL-2 (CD 41PE) gegenübergestellt (Abbildung 18, S. 49; Abbildung 19, S. 50).

Da für die Dreifarbenimmunfluoreszenzmethode zwei Antikörper gewählt wurden, die sich an das passende Epitop der Thrombozytenmembran erst nach Aktivierung der Thrombozyten binden, wurde neben der Darstellung FFC vs. SSC, FL-1 (PAC-1FITC) vs. FL-2 (CD 62PE) auch FL-3 (CD 41PerCP) vs. SSC gegenübergestellt, um die Thrombozytenwolke anhand der Bindung von CD 41PerCP eindeutig identifizieren zu können (Abbildung 20, S. 51; Abbildung 21, S. 52).

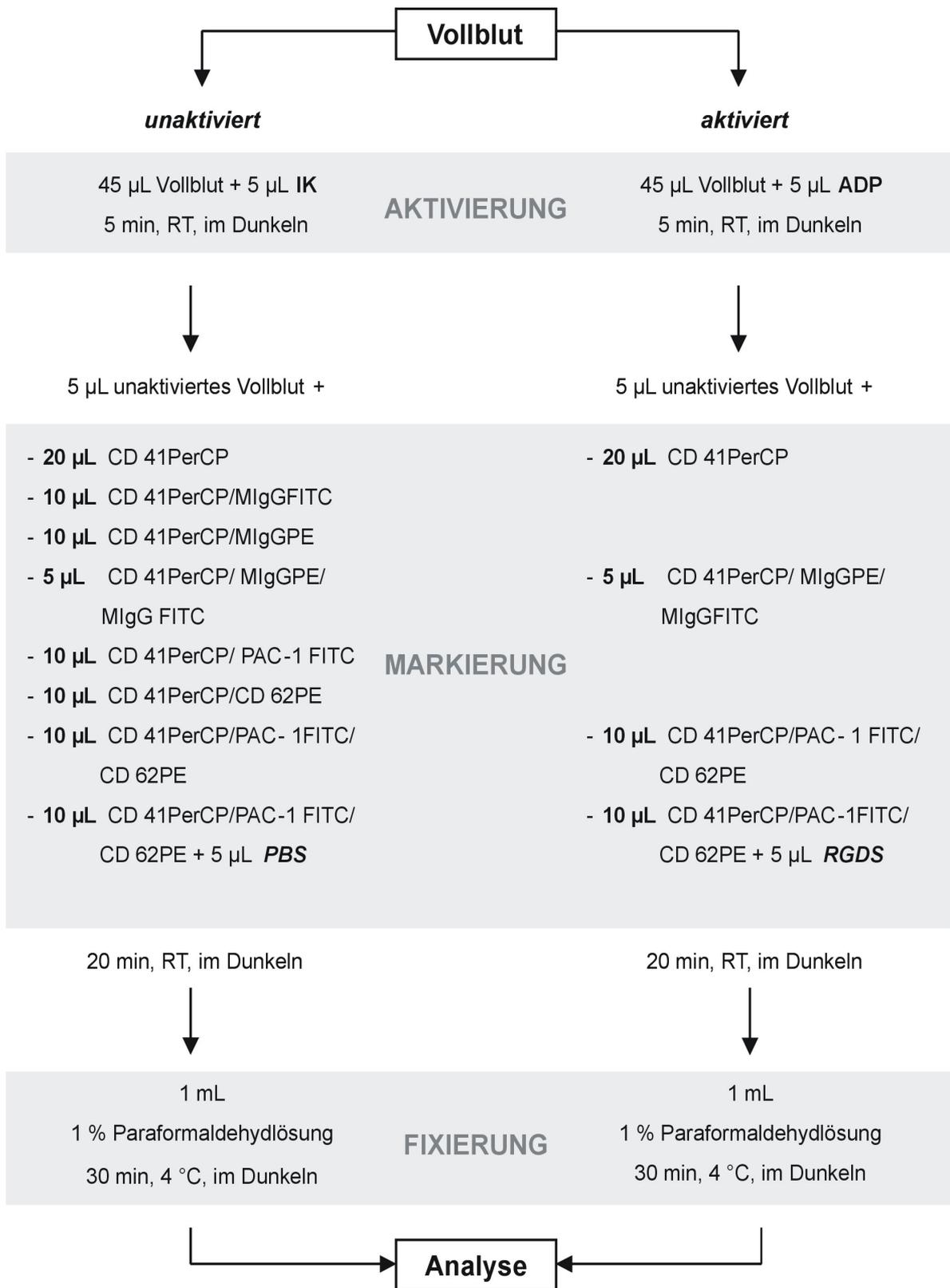


Abbildung 15. Probenaufbereitung zur funktionellen Charakterisierung der Thrombozyten in der Dreifarbenimmunfluoreszenzanalyse.

Die Probenaufbereitung nach Blutabnahme ist durch die Teilschritte Aktivierung der Thrombozyten, Markierung mit Antikörpern und Fixierung der Thrombozyten gekennzeichnet. Anschließend erfolgt die Analyse am Durchflusssytometer.

Zur späteren Datenanalyse wurde der Schwellenwert (*Threshold*) anhand des FSCs in der Punktwolkendarstellung FSC vs. SSC der Vollblutprobe gesetzt und anhand der CD 41PE bzw. PerCP-Bindung die Zählrate auf 5000 Thrombozyten bei logarithmischer Verstärkereinstellung (FSC, SSC) festgelegt. Der Druck wurde auf „medium“ eingestellt, damit möglichst viele Thrombozyten einzeln den Analysenpunkt erreichten.

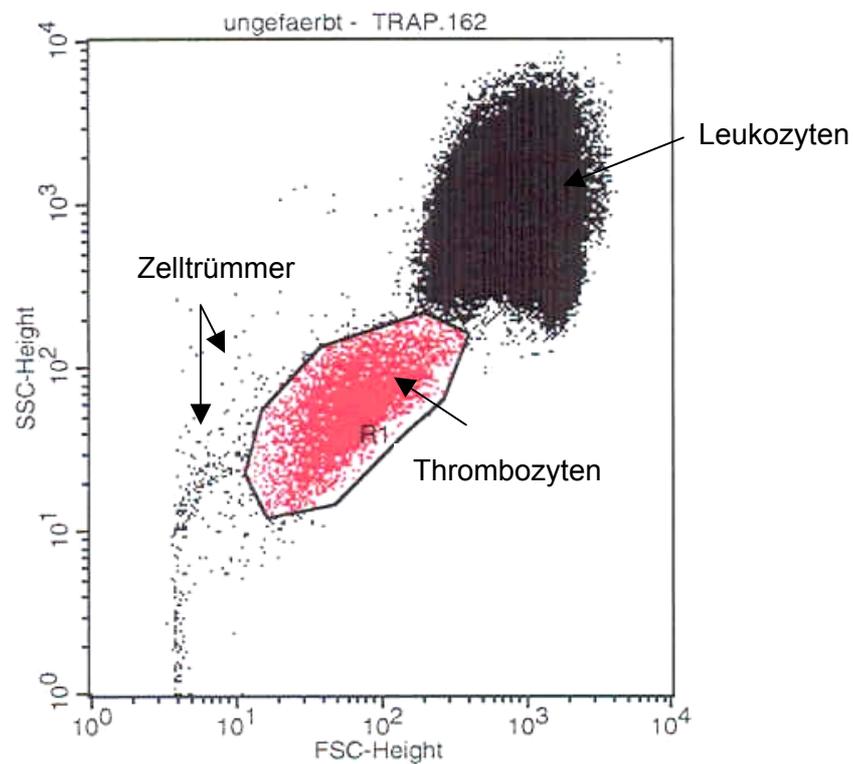
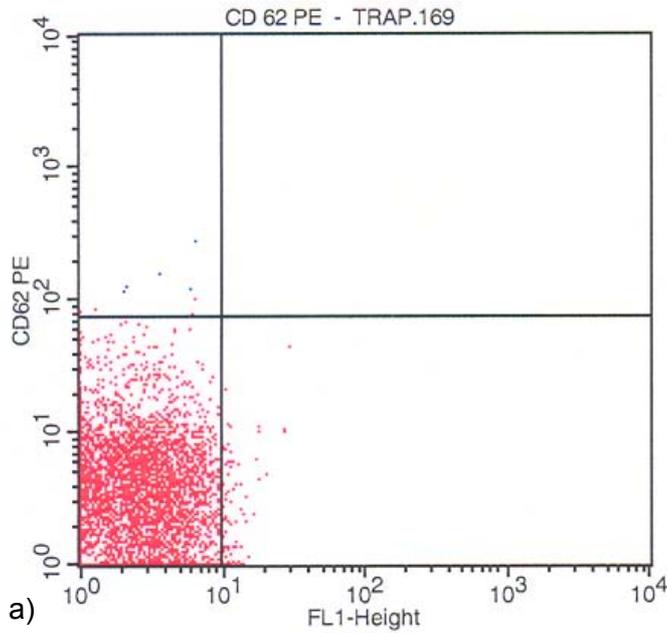


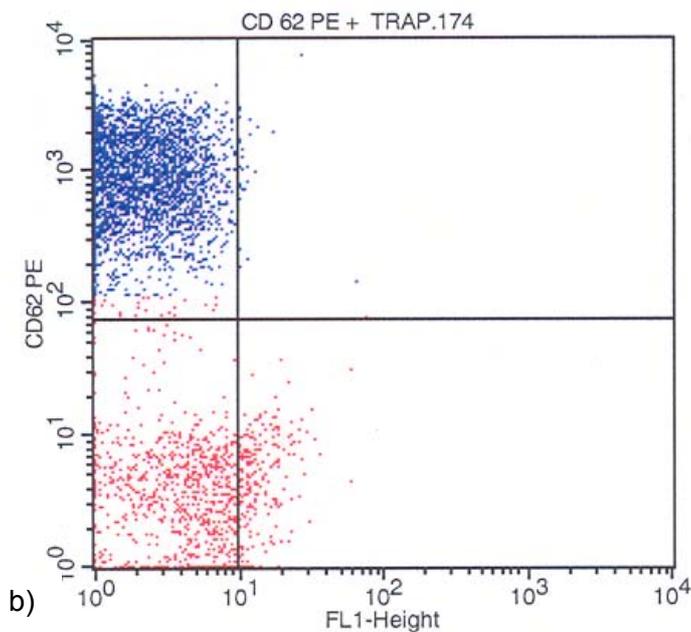
Abbildung 16. Auswahl einer unmarkierten, unaktivierten Thrombozytenpopulation in der Vollblutprobe im DotPlot.

Die Abbildung entspricht einem Originalausdruck des Durchflusszytometers im Programm CellQuest Pro. Dargestellt wurde eine unaktivierte Vollblutprobe in der Gegenüberstellung FSC (*Forward Scatter*) vs. SSC (*Side Scatter*) und Markierung der Thrombozytenpopulation (R1, rotmarkiert).



Sample ID: CD 62 PE - TRAP
 Acquisition Date: 30-May-05
 Gate: G1

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	10	0.21	0.01
UR	0	0.00	0.00
LL	4773	98.33	4.80
LR	71	1.46	0.07



Sample ID: CD 62 PE + TRAP
 Acquisition Date: 30-May-05
 Gate: G1

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	3885	78.79	0.56
UR	28	0.57	0.00
LL	807	16.37	0.12
LR	211	4.28	0.03

Abbildung 17. Darstellung einer quantitativen Einfarbenimmunfluoreszenz mittels DotPlot-Analyse und dazugehöriger Quadrantenstatistik anhand unaktivierter Thrombozyten mit a) unaktivierten Thrombozyten, CD 62PE-markiert und b) TRAP-aktivierte Thrombozyten, CD 62PE-markiert.

Dargestellt wurden die Messung und Auswertung der Dreifarbenimmunfluoreszenz von unaktivierten Thrombozyten. Zur Auswertung wurde in der Quadrantenstatistik die %Gated-Werte (siehe Umrahmung in der Quadrantenstatistik) für jeden Quadranten herangezogen und in Bezug auf 5000 Thrombozyten normiert. Im Bild a) sind die mir CD 62 PE-markierten, jedoch unaktivierten Thrombozyten dargestellt. Im Bild b) sind die mit CD 62PE-markierten Thrombozyten mit TRAP aktiviert worden.

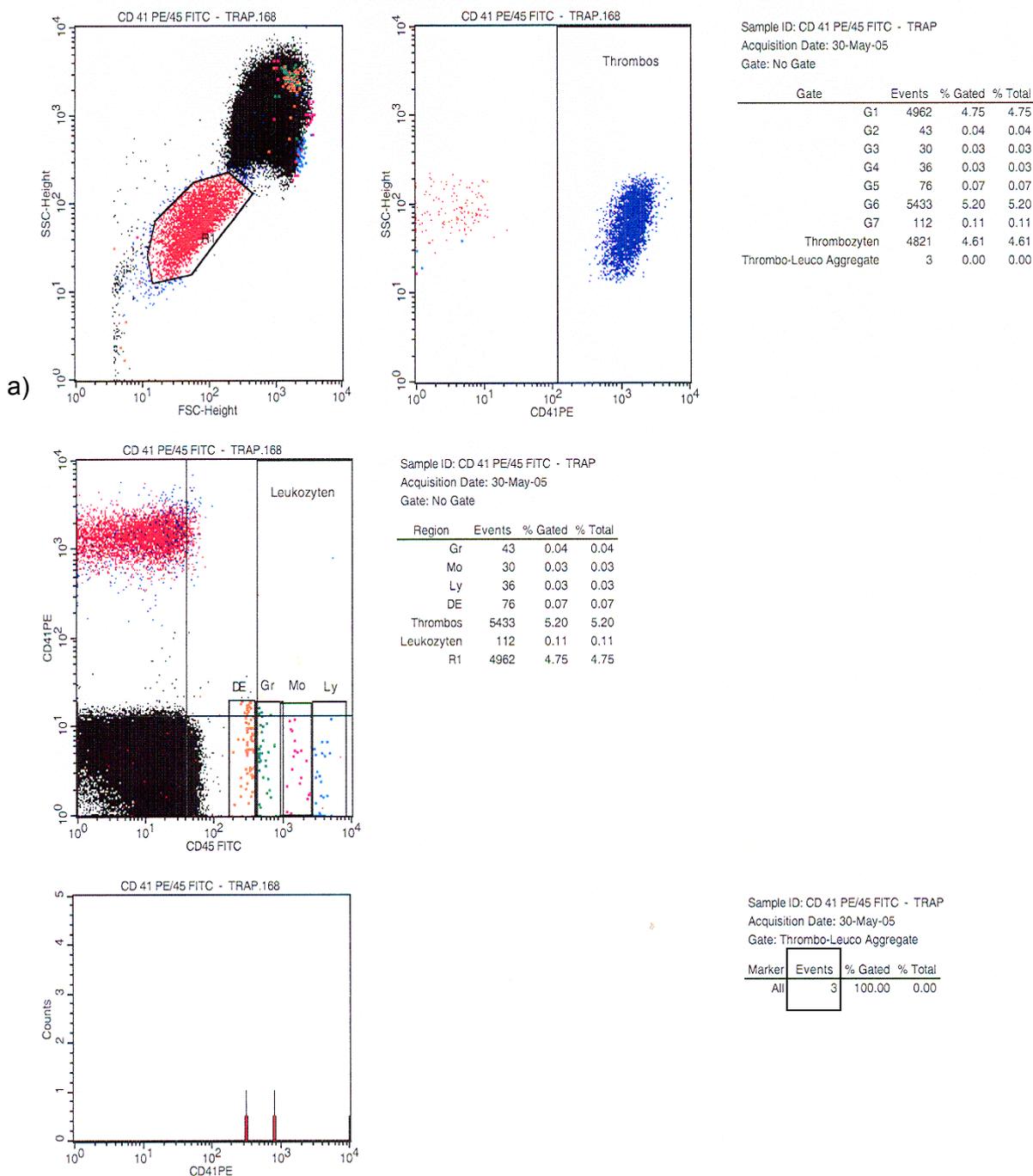


Abbildung 18. Darstellung einer quantitativen Zweifarbenimmunfluoreszenz mittels DotPlot-Analyse und dazugehöriger Quadrantenstatistik anhand unaktivierter Thrombozyten mit a) FSC vs. SSC, b) CD 41PE vs. SSC, c) CD 45FITC vs. CD 41PE und d) Histogrammdarstellung der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate.

Dargestellt wurden die Messung und die Auswertung der Zweifarbenimmunfluoreszenz von unaktivierten Thrombozyten (FSC = forward scatter, SSC = side scatter). Zur Auswertung wurde die Anzahl der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate in der Histogrammdarstellung benutzt und in Bezug auf 5000 Thrombozyten prozentual normiert. Im Bild a) wurde die Thrombozytenwolke ausgewählt. Im Bild b) waren die Thrombozyten mit CD 41PE, der unaktivierten und aktivierte Thrombozyten markiert, ausgewählt. Im Bild c) wurde die Thrombozytenwolke nach der CD 41PE und CD 45FITC-Markierung im DotPlot dargestellt.

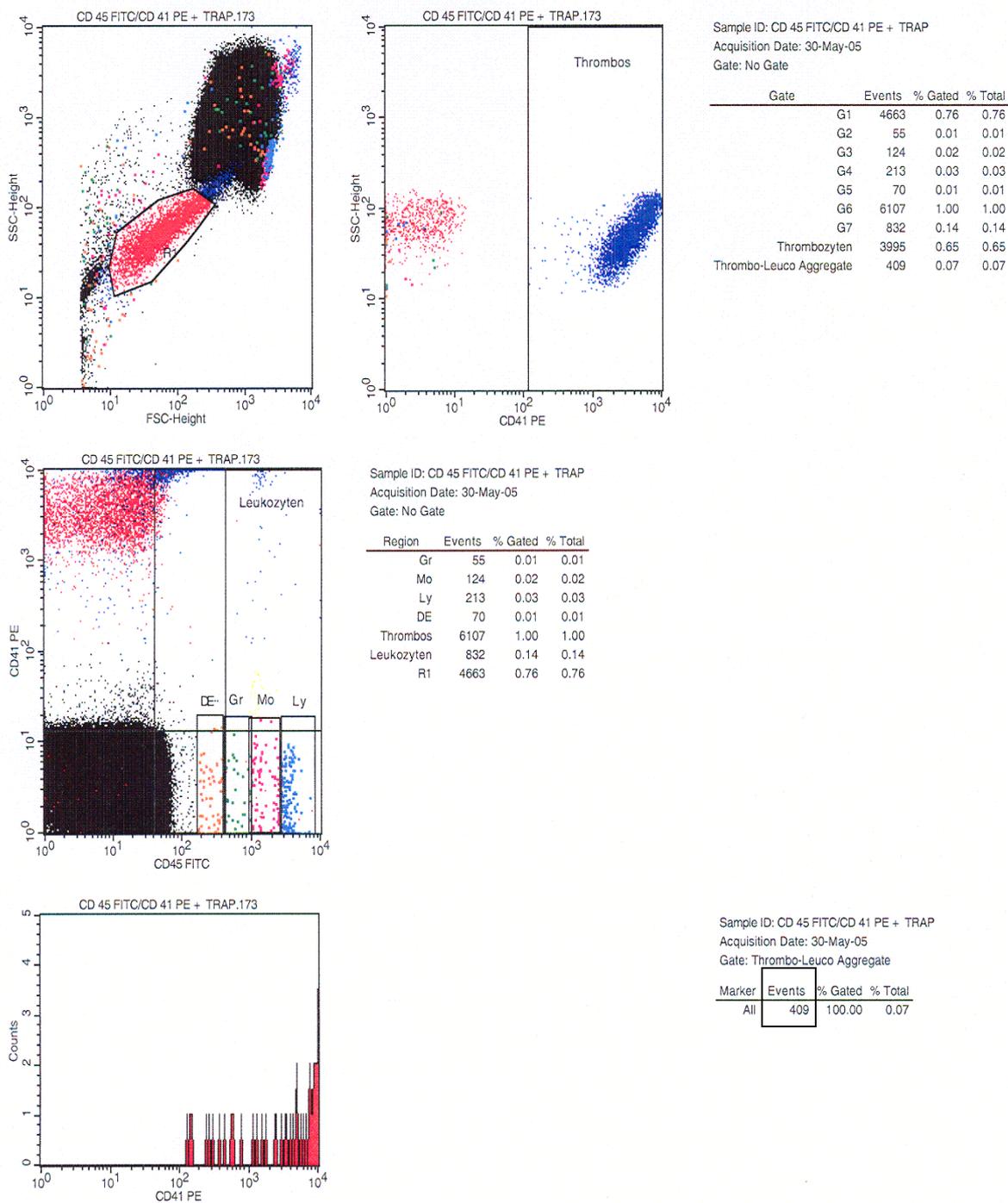
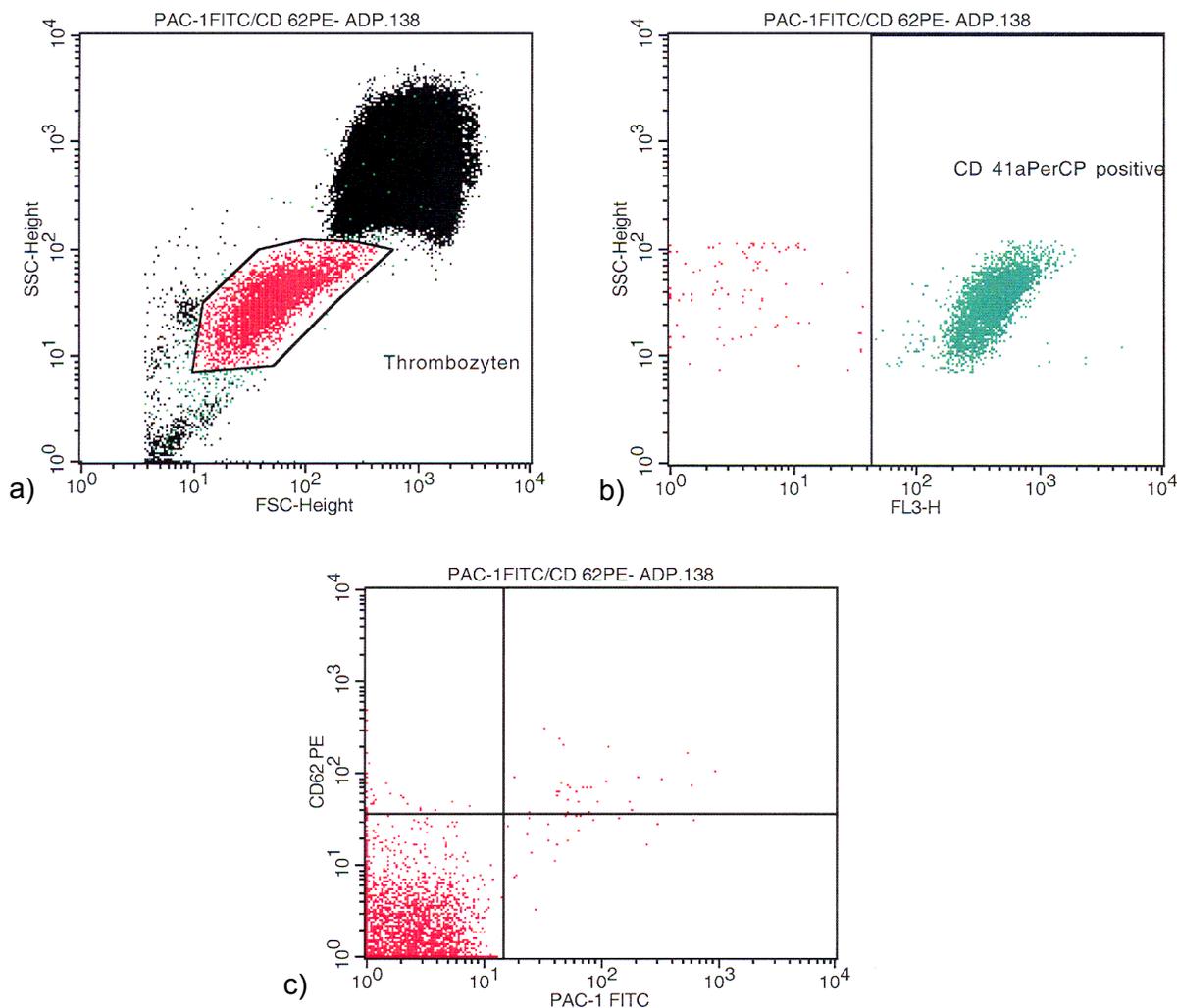


Abbildung 19. Darstellung einer quantitativen Zweifarbenimmunfluoreszenz mittels DotPlot-Analyse und dazugehöriger Quadrantenstatistik anhand TRAP-aktivierter Thrombozyten mit a) FSC vs. SSC, b) CD 41PE vs. SSC, c) CD 45FITC vs. CD 41PE und d) Histogrammdarstellung der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate.

Dargestellt wurden die Messung und die Auswertung der Zweifarbenimmunfluoreszenz von TRAP-aktivierten Thrombozyten. Zur Auswertung wurde die Anzahl der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate in der Histogrammdarstellung benutzt und in Bezug auf 5000 Thrombozyten prozentual normiert. Im Bild a) wurde die Thrombozytenwolke ausgewählt. Im Bild b) waren die Thrombozyten mit CD 41PE, der unaktivierte und aktivierte Thrombozyten markiert, ausgewählt. Im Bild c) wurde die Thrombozytenwolke nach der CD 41PE und CD 45FITC-Markierung im DotPlot dargestellt.



Quadrant Statistics

File: PAC-1FITC/CD 62PE- ADP.138 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: PAC-1FITC/CD 62PE- ADP Patient ID:
 Patient Name: Case Number:
 Tube: PAC-1 FITC/ CD 62 PE Panel: Thrombo + CD 41a PerCP
 Acquisition Date: 18-May-05 Gate: G10
 Gated Events: 4805 Total Events: 112111
 X Parameter: PAC-1 FITC (Log) Y Parameter: CD62 PE (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	31	0.65	0.03	1.73	1.42	92.85	68.06
UR	29	0.60	0.03	147.08	84.71	92.21	77.11
LL	4724	98.31	4.21	2.77	2.22	2.28	1.62
LR	21	0.44	0.02	95.55	53.19	22.38	19.38

Abbildung 20. Darstellung einer quantitativen Dreifarbenimmunfluoreszenz mittels DotPlot-Analyse und dazugehöriger Quadrantenstatistik anhand unaktivierter Thrombozyten mit a) FSC vs. SSC, b) CD 41aPerCP vs. SSC und c) PAC-1FITC vs. CD 62PE.

Dargestellt wurde die Messung und Auswertung der Dreifarbenimmunfluoreszenz von unaktivierten Thrombozyten. Zur Auswertung wurde in der Quadrantenstatistik die %Gated-Werte für jeden Quadranten herangezogen und in Bezug auf 5000 Thrombozyten normiert. Im Bild a) wurde die Thrombozytenwolke ausgewählt. Im Bild b) waren die Thrombozyten mit CD 41PerCP, der unaktivierte und aktivierte Thrombozyten markiert, ausgewählt. Im Bild c) wurde die Thrombozytenwolke nach der zusätzlichen CD 62PE und PAC-1FITC-Markierung im DotPlot dargestellt.

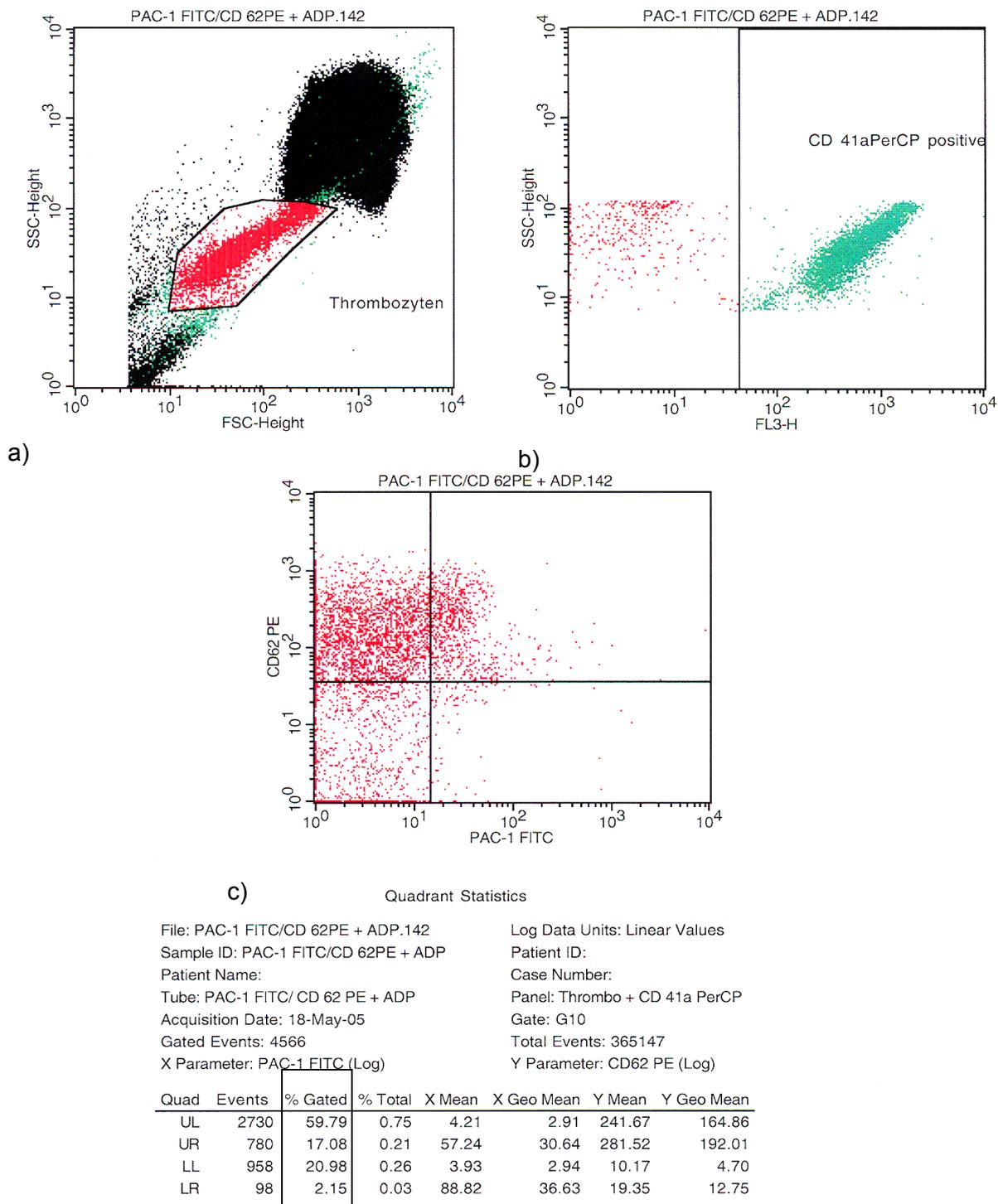


Abbildung 21. Darstellung einer quantitativen Dreifarbenimmunfluoreszenz mittels DotPlot-Analyse und dazugehöriger Quadrantenstatistik anhand ADP-aktivierter Thrombozyten mit a) FSC vs. SSC, b) CD 41aPerCP vs. SSC und c) PAC-1FITC vs. CD 62PE.

Dargestellt wurde die Messung und Auswertung der Dreifarbenimmunfluoreszenz von aktivierten Thrombozyten. Zur Auswertung wurde in der Quadrantenstatistik die %Gated-Werte für jeden Quadranten herangezogen und in Bezug auf 5000 Thrombozyten normiert. Im Bild a) wurde die Thrombozytenwolke ausgewählt. Im Bild b) waren die Thrombozyten mit CD 41PerCP, der unaktivierte und aktivierte Thrombozyten markiert, ausgewählt. Im Bild c) wurde die Thrombozytenwolke nach der zusätzlichen CD 62PE und PAC-1FITC-Markierung im DotPlot dargestellt.

Qualitätskontrollen der durchflusszytometrischen Messung

Alle für die Durchflusszytometrie verwendeten Volumina von Antikörpern und Aktivierungsreagenzien wurden im Vorfeld bestimmt.

Zur internen Qualitätssicherung wurde mithilfe kommerziell erhältlicher Kalibrierungspartikel die Fluoreszenzkanäle sowie die Kompensation mithilfe der Software FACSComp eingestellt. Dazu wurde eine Suspension mit einer definierten Anzahl von Teilchen (*Calibrite Beads*) für jede Fluoreszenz eingesetzt.

Auf Grund der inter-individuellen Schwankungen der Thrombozytenpopulationen, mussten bei jeder Messung minimale Korrekturen in den Einstellungen der Fluoreszenzintensitäten und in den Kompensationen der Fluoreszenzfarbstoffe vorgenommen werden. Als Negativkontrolle (Isotypkontrolle) wurden bei jeder Messung Antikörper der gleichen Immunglobulinklasse, die vom Hersteller mit demselben Fluorochrom konjugiert wurden, mitgeführt. Die Konzentration hierfür wurde im Vorfeld ermittelt. Ebenfalls wurden vor Studienbeginn die Antikörper hierfür austitriert.

Für die Behandlung aller Proben wurde auf Gleichmäßigkeit in der Handhabung (Minimierung unnötiger Thrombozytenaktivierung) sowie in der Probenaufbereitung geachtet.

Datenauswertung der durchflusszytometrischen Messung

Die zentrale Frage aller durchflusszytometrischen Messungen dieser Arbeit richtete sich auf die Ermittlung des prozentualen Anteils der Antikörpermarkierungen der Thrombozyten vor und nach Aktivierung bei gesunden Probanden im Vergleich zu herzkranken Patienten.

Für die Bestimmung der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate wurde dazu der Prozentsatz (bezogen auf 5000 *Gated Events*) an CD 41PE- und CD 45FITC-positiver Thrombozyten bestimmt.

Für die P-Selektinexpression wurde ebenfalls der prozentuale Anteil der Thrombozyten bestimmt, der CD 62PE im aktivierten wie im unaktivierten Zustand binden konnte (bezogen auf 5000 *Gated Events*).

Ebenso erfolgte die Auswertung der PAC-1FITC/CD 62PE-Darstellung mittels DotPlot-Analyse und dazugehöriger Quadrantenstatistik, die ebenfalls den prozentualen Anteil der PAC-1FITC und CD 62PE positiven Thrombozyten angab (bezogen auf 5000 *Gated Events*).

3.2.5 Statistische Methoden und statistische Auswertung

3.2.5.1 Mittelwert und Standardabweichung

Mithilfe der Software EXCEL 2000 und SPSS 11.0 wurde die deskriptive Statistik berechnet. Dazu wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen bestimmt. Letztere lieferte ein Maß für die Streuung der Analysenwerte um den Mittelwert. Zur Auswertung der einzelnen Messergebnisse wurde das arithmetische Mittel (= Mittelwert), der den Durchschnitt einer Stichprobe beschreibt, verwendet.

Mittelwert und Standardabweichung definieren sich wie folgt:

$$\text{Mittelwert: } \bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

$$\text{Standardabweichung: } \sigma_x = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (\bar{x} - x_i)^2}$$

\bar{x} = Erwartungswert (Mittelwert)

x_i = die Merkmalsausprägungen am i-ten Element der Grundgesamtheit

N = Umfang der Grundgesamtheit (Anzahl der Werte)

σ_x = Standardabweichung

3.2.5.2 Mann-Whitney-U-Test und Test nach Anova

Orientierende statistische Analysen erfolgten mit Student-T-Test und Test nach Anova für unabhängige Variablen. Die definierten Analysen wurden mittels dem Mann-Whitney-U-Test sowie dem H-Test nach Kruskal-Wallis durchgeführt. Der Mann-Whitney-U-Test prüft, ob ein Zusammenhang zwischen zwei unabhängigen Stichproben existiert und inwieweit sie sich hinsichtlich ihrer Tendenz unterscheiden. Dazu müssen die Analysenwerte in Ränge transformiert werden. Die Nullhypothese H_0 (kein Unterschied zwischen den Gruppen) wurde ferner dann verworfen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ % betrug. Demzufolge bestanden signifikante Unterschiede, wenn $p < 0,05$ % war.

Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows (11) durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Auswertung der Probanden und Patienten

4.1.1 Auswertung gesunder Probanden

Insgesamt nahmen an der Studie 180 Probanden teil, die für 710 Blutabnahmen zur Verfügung standen.

Davon spendeten 122 Frauen mit einem durchschnittlichen Alter von $31,5 \pm 10,0$ Jahren und 56 Männer mit $29,8 \pm 8,7$ Jahren regelmäßig Blut (Tabelle 14). Es wurde in der Studierendurchführung darauf geachtet, unterschiedliche Probanden auch für unterschiedliche aggregometrische Bestimmungen einzusetzen. Insgesamt wurden 555 Blutentnahmen von weiblichen sowie 153 von männlichen Probanden durchgeführt.

Die für die Studie relevanten Merkmale wurden mithilfe eines strukturierten Fragebogens unmittelbar vor der Blutabnahme ermittelt (Anhang, Abbildung 57). Auf Grund fehlender Fragebögen konnten 2 der 180 Probanden nicht zugeordnet werden.

Das Probandenkollektiv umfasste eine Population von durchschnittlich $30,9 \pm 9,6$ Jahren und war mit einem durchschnittlichen Gewicht von $69,5 \pm 12,7$ kg normalgewichtig.

Dementsprechend lag der durchschnittliche BMI bei $23,4 \pm 3,5$ kg/m². Zwischen Frauen und Männern gab es keine wesentlichen Unterschiede (Tabelle 15).

Tabelle 14. Anzahl der gesunden Probanden und Anzahl der Blutentnahmen

	Frauen	Männer	gesamt ¹⁾
Anzahl	122	56	180
Blutentnahmen	555	153	710

¹⁾ von 180 Studienteilnehmer, konnten 2 Probanden nicht erfasst werden

Tabelle 15. Studienrelevante Merkmale der gesunden Probanden

	Alter [J]	Gewicht [kg]	Körpergröße [m]	BMI [kg/m ²]
Frauen ¹⁾	$31,5 \pm 10,0$	$64,3 \pm 10,5$	$1,70 \pm 0,1$	$24,4 \pm 2,8$
Männer ²⁾	$29,8 \pm 8,70$	$79,8 \pm 10,0$	$1,80 \pm 0,1$	$23,0 \pm 3,7$
gesamt ³⁾	$30,9 \pm 9,60$	$69,5 \pm 12,7$	$1,70 \pm 0,1$	$23,4 \pm 3,5$

Berechnungen beziehen sich auf Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Merkmale Alter, Gewicht, Körpergröße und BMI (*Body Mass Index*), ¹⁾ 122 weibliche Probanden ²⁾ 56 männliche Probanden, ³⁾ von 180 Studienteilnehmer konnten 2 Probanden nicht erfasst werden

4.1.2 Auswertung herzkranker Patienten

An der Studie nahmen 38 herzkranke Patienten teil, die für insgesamt 39 Blutabnahmen zur Verfügung standen (Tabelle 16). Davon waren 11 weibliche Personen mit einem durchschnittlichen Alter von $68,6 \pm 8,1$ Jahren und 27 männliche mit einem Altersdurchschnitt von $67,3 \pm 8,5$ Jahren vertreten (Tabelle 17).

Für die Studie waren die Diagnosen der Patienten relevant. So wurden bei 20 Patienten eine koronare Herzerkrankung, bei 9 ein Vorhofflimmern und bei 9 Patienten eine KHK zusammen mit einem Vorhofflimmern diagnostiziert. Folgende Erkrankungen traten außer der KHK und des Vorhofflimmerns im Patientenkollektiv auf: Herzinsuffizienz, Hypertonie, Diabetes mellitus und Hyperurikämie (Tabelle 18, S. 57). Alle Patienten nahmen Medikamente ein (Tabelle 18, S. 57). Für die aggregometrischen Analysen wurden nur die Plasmaproben herangezogen, deren Aggregationen im Referenzbereich des jeweiligen Agonisten lagen.

Tabelle 16. Anzahl der herzkranken Patienten

	Frauen	Männer	gesamt ¹⁾
Anzahl	11	27	38
Blutentnahmen	11	28	39

¹⁾ insgesamt standen für 39 Blutabnahmen 38 Patienten zur Verfügung

Tabelle 17. Alter der herzkranken Patienten

	Frauen ¹⁾	Männer ²⁾	gesamt ³⁾
Alter [J]	$68,6 \pm 8,1$	$67,3 \pm 8,5$	$67,7 \pm 8,0$

Darstellung des durchschnittlichen Alters \pm Standardabweichung zum Zeitpunkt der Blutabnahme, ¹⁾ Berechnung bezieht sich auf 11 weibliche Patienten, ²⁾ Berechnung bezieht sich auf 27 männliche Patienten, ³⁾ 38 Patienten nahmen an der Studie teil

4.1.3 Thrombozyten

4.1.3.1 Thrombozyten gesunder Probanden

Die Bestimmung der Thrombozytenzahlen gesunder Probanden erfolgte nach der Zentrifugation plättchenreicher Plasmen (PRP). Die durchschnittliche Thrombozytenzahl aller Blutabnahmen lag bei $340,2 \pm 64,9 \cdot 10^9$ Thr/L mit einem Mittleren Plättchenvolumen (MPV) von $7,3 \pm 0,6$ fL (Tabelle 19, S. 57). Die tatsächlichen, für die Messungen verwendeten plättchenreichen Plasmen, die entsprechend mit plättchenarmen Plasmen verdünnt wurden, lagen bei durchschnittlich $321,1 \pm 61,3 \cdot 10^9$ Thr/L und einem MPV von $7,4 \pm 0,6$ fL. Dieser Wert entsprach der Zellzahl, der für aggregometrische Messungen empfohlen wurde (MÖLAB, 2002).

Die Messung der Thrombozytenzahlen plättchenarmer Plasmen (n = 25) wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass es sich bei der Verdünnung der plättchenreichen Plasmen tatsächlich jeweils um plättchenarme Plasmen handelte. Wie aus Tabelle 19 ersichtlich ist, waren die Thrombozytenzahlen des plättchenarmen Plasmas konstant niedrig.

Tabelle 18. Die häufigsten Diagnosen des Patientenkollektivs und Auflistung häufig verabreichter Medikamente

Diagnose	Anzahl der Patienten
Koronare Herzerkrankung	20
Hypertonie	15
Herzinsuffizienz	10
Schilddrüsenerkrankung	10
Vorhofflimmern	9
Koronare Herzerkrankung + Vorhofflimmern	9
Diabetes mellitus	9
Medikamentengruppe	Anzahl der Patienten
β-Rezeptoren, Kalziumkanalblocker, Hemmstoffe des Renin-Angiotensin-Systems	26
Antikoagulantien	24
Diuretika	21
Lipidsenker	19
Thrombozytenaggregationshemmer	17
Antihypertonika	15
Herzglykoside	11
Schilddrüsentherapeutika	10
Koronartherapeutika	10

Tabelle 19. Thrombozyten gesunder Probanden nach Anzahl und Mittlerem Plättchenvolumen

Thrombozyten	PRP nicht eingestellt ¹⁾	PRP eingestellt ²⁾	PAP Kontrolle ³⁾
Anzahl [10 ⁹ Thr/L]	340,2±64,9	321,1±61,3	6,4±6,2
MPV [fL]	7,3±0,6	7,4±0,6	6,9±0,4

Messung der Thrombozytenzahlen plättchenreicher (PRP) und plättchenarmer Plasmen (PAP) nach Anzahl und Mittlerem Plättchen Volumen (MPV), ¹⁾ plättchenreiches Plasma wurde nicht verdünnt ²⁾ plättchenreiches Plasma wurde zur aggregometrischen Messung mit plättchenarmen Plasma im Verhältnis 1:1 verdünnt, ³⁾ Messung von 25 plättchenarmen Plasmen

4.1.3.2 Thrombozyten herzkranker Patienten

Die Bestimmung der Thrombozytenzahlen herzkranker Patienten erfolgte wie bei gesunden Probanden. Die Thrombozytenzahlen lagen mit durchschnittlichen $286,6 \pm 58,6 \cdot 10^9$ Thr/L im Referenzbereich (Tabelle 20), jedoch niedriger als bei gesunden Probanden ($p = 0,001$). Das MPV mit durchschnittlichen $7,7 \pm 0,51$ fL lag dagegen höher als das MPV der gesunden Probanden ($p = 0,004$). Ebenso ergab die Kontrolle des plättchenarmen Plasmas von insgesamt 5 Patienten die erwarteten niedrigen Thrombozytenzahlen.

Tabelle 20. Thrombozyten herzkranker Patienten nach Anzahl und Mittlerem Plättchenvolumen

Thrombozyten	PRP nicht eingestellt ¹⁾	PAP Kontrolle ²⁾
Anzahl [10^9 Thr/L]	286,6±58,6	12,4±5,8
MPV [fL]	7,7±0,51	7,0±0,4

Messung der Thrombozytenzahlen aller plättchenreichen Plasmen (PRP) und 5 plättchenarme Plasmen (PAP) nach Anzahl und Mittlerem Plättchen Volumen (MPV), ¹⁾ Plättchenreiches Plasma musste nicht verdünnt werden, ²⁾ Messung von 5 plättchenarmen Plasmen zur Kontrolle

4.2 Aggregometrische Vorversuche

4.2.1 Potenzieller Einfluss von Lösungsmitteln der Testsubstanzen auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen

Plättchenreiche Plasmen, die als Kontrollen ohne Zusätze in regelmäßigen Abständen zur Qualitätskontrolle der aggregometrischen Experimente mitgeführt wurden und die keine Lösungsmittel und/oder Testsubstanzen enthielten, zeigten gleichartige Aggregationsverläufe wie Plasmen, denen in entsprechenden Volumina Lösungsmittel der Testsubstanzen zugesetzt wurden. Es konnten daher keine signifikanten Veränderungen in den Aggregationen in den ADP-, Adrenalin-, und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregationen durch Lösungsmittel der Testsubstanzen beobachtet werden (Abbildung 22, S. 60). Auf die Arachidonsäure-induzierte Aggregation besaßen alle Lösungsmittel in allen Konzentrationen einen geringfügig stimulierenden Einfluss.

Die Konzentrationen der Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) und isotonische Kochsalzlösung im plättchenreichen Plasma des Messröhrchens bewegte sich je nach Stammlösung in Bereichen von 1 % bis 5 %. Alle folgenden Angaben beziehen sich auf Mittelwertberechnungen der aggregometrischen Experimente bei n durchgeführten Untersuchungen.

4.2.1.1 ADP-induzierte Thrombozytenaggregation

Alle Lösungsmittel besaßen keinen Einfluss auf die Aggregation und unterschieden sich im

Vergleich zu den Kontrollen ohne Zusätze ($74,8 \pm 10,9 \%$, $n = 94$, Abbildung 22a, S. 60) nicht (1 % DMSO vs. Kontrolle: $p = 0,522$; 1 % IK vs. Kontrolle: $p = 0,707$; 4 % IK vs. Kontrolle: $p = 0,526$; 5 % IK vs. Kontrolle: $p = 0,821$).

4.2.1.2 *Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation*

In den durch Adrenalin hervorgerufenen Thrombozytenaggregationen waren die durchschnittlichen Endaggregationen aller Lösungsmittelansätze ebenfalls gleich und nahmen im Vergleich zu den Kontrolle ohne Zusätze ($76,6 \pm 7,4 \%$, $n = 81$) keinen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation (Abbildung 22b, S. 60; 1 % DMSO vs. Kontrolle: $p = 0,152$; 1 % IK vs. Kontrolle: $p = 0,793$; 4 % IK vs. Kontrolle: $p = 0,582$; 5 % IK vs. Kontrolle: $p = 0,093$).

4.2.1.3 *Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation*

Die durchschnittlichen DMSO Kontrollen und die Kontrollen der isotonischen Kochsalzlösungen entsprachen den Aggregationen des plättchenreichen Plasmas ohne Zusätze ($76,1 \pm 8,7 \%$, $n = 84$, Abbildung 22c, S. 60; 1 % DMSO vs. Kontrolle: $p = 0,556$; 1 % IK vs. Kontrolle: $p = 0,338$; 4 % IK vs. Kontrolle: $p = 0,208$; 5 % IK vs. Kontrolle: $p = 0,199$).

4.2.1.4 *Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation*

Die durchschnittliche Aggregation des plättchenreichen Plasmas ohne Zusätze betrug $73,5 \pm 5,2 \%$ ($n = 34$). Eine Konzentration von 1 % DMSO besaß einen stimulierenden Einfluss auf die Thrombozytenaggregation ($77,5 \pm 10,1 \%$, $n = 54$, 1 % DMSO vs. Kontrolle: $p = 0,010$). Es konnten für die Lösungsmittelkontrollen der isotonische Kochsalzlösung in 1 % ($n = 54$), 4 % ($n = 31$) und 5 % ($n = 17$) ebenfalls geringfügig stimulierende Effekte auf die Arachidonsäure-induzierten Endaggregationen ($80 \pm 9,2 \%$, 1 % IK vs. Kontrolle: $p = 0,000$; $77,2 \pm 8,1 \%$, 4 % IK vs. Kontrolle: $p = 0,010$; $82,8 \pm 8,7 \%$, 5 % IK vs. Kontrolle: $p = 0,000$) beobachtet werden (Abbildung 22d, S. 60).

4.2.2 **Vorinkubationszeit als ein möglicher Einflussfaktor auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen**

Um den Einfluss der Vorinkubation auf die Aggregation zu untersuchen, wurden die Agonisten bei 0 min (ohne Inkubation), 10 min, 20 min, 30 min, 40 min sowie 60 min den plättchenreichen Plasmen zugegeben.

In Abbildung 23 (S. 61) sind die Vorinkubationszeitpunkte den dazugehörigen Endaggregationen gegenübergestellt. Für jeden Agonisten wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Aggregationen bei den Inkubationszeiten von 0 min, 10 min und 20 min entsprachen den Induktor spezifischen Referenzbereichen.

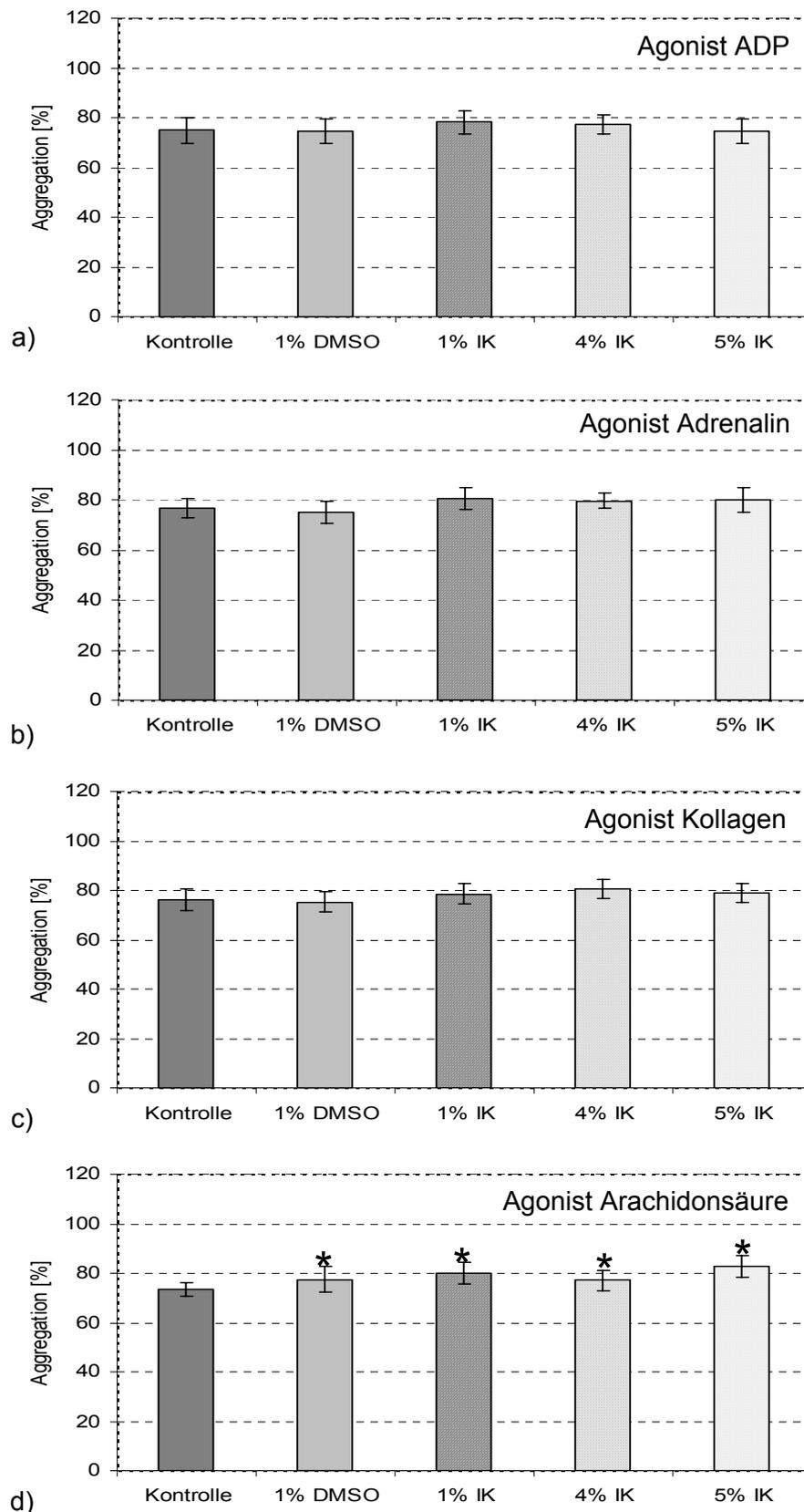


Abbildung 22. Potenzielle Einflüsse von Dimethylsulfoxid und isotonischer Kochsalzlösung als Lösungsmittel der Testsubstanzen auf die Thrombozytenaggregationen mit a) ADP b) Adrenalin, c) Kollagen und d) Arachidonsäure als Agonisten.

Dargestellt wurde der Vergleich der Agonisten-induzierten Aggregationen mit Dimethylsulfoxid (DMSO, 1 %) und unterschiedlichen Konzentrationen an isotonischer Kochsalzlösung (1 %, 4 %, 5 %), * Signifikanz $p < 0,05$ (vs. Kontrolle ohne Zusätze)

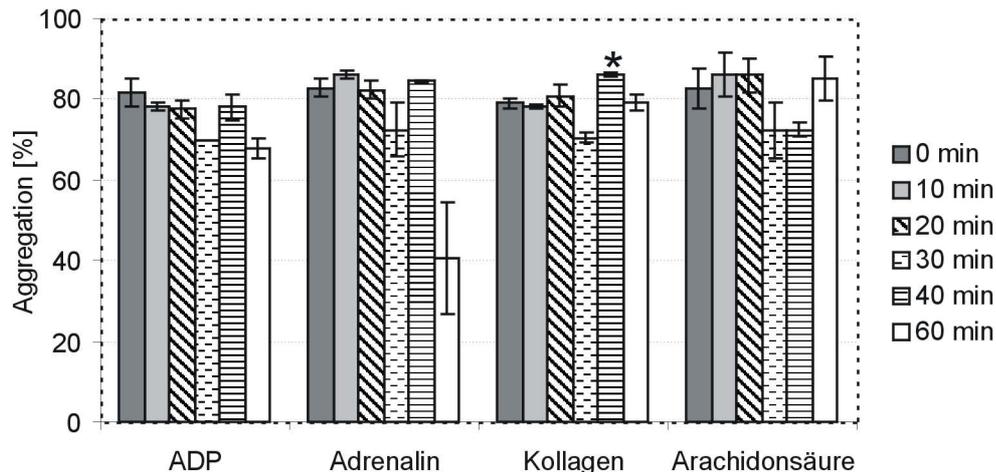


Abbildung 23. Aggregationsverläufe in Abhängigkeit unterschiedlicher Vorinduktionszeiten der ADP-, Adrenalin-, Kollagen- und Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregationen.

Dargestellt wurden die Aggregationen von Plasmen, denen zu den Zeitpunkten 0 min, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 60 min die Induktoren ADP (0 min: n = 4; 10 min: n = 2; 20 min: n = 4; 30 min: n = 2; 40 min: n = 2; 60 min: n = 2), Adrenalin (0 min: n = 4; 10 min: n = 2; 20 min: n = 4; 30 min: n = 2; 40 min: n = 2; 60 min: n = 2), Kollagen (0 min: n = 4; 10 min: n = 2; 20 min: n = 4; 30 min: n = 2; 40 min: n = 2; 60 min: n = 2) und Arachidonsäure (0 min: n = 3; 10 min: n = 3; 20 min: n = 3; 30 min: n = 4; 40 min: n = 4; 60 min: n = 4) zugegeben wurden. Ausnahmsweise wurde auf Grund der geringen n-Zahlen in diesem Vorversuch die Signifikanzen mit dem Student-T-Test berechnet. *Signifikanz $p < 0,05$ (Kollagen: 40 min vs. 0 min)

Hinsichtlich der Kollagen-induzierten Aggregation wurde die Aggregation nach 40 min Vorinkubationszeit gesteigert (40 min vs. 0 min: $p = 0,015$). Alle Messungen wurden anschließend einheitlich mit oder ohne Prüfsubstanzen 10 min inkubiert.

4.2.3 Temperatur als ein möglicher Einflussfaktor auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen

Es sollte weiterhin geklärt werden, ob die Temperatur einen Einfluss auf die Plättchenaggregation hat. Aus diesem Grund wurden die ADP-, Adrenalin-, Kollagen- und Arachidonsäure-induzierten Aggregationen bei 2 verschiedenen Temperaturen (23 °C und 37 °C) untersucht (Abbildung 24, S. 62).

Es zeigten sich bei allen aggregometrischen Untersuchungen kaum Schwankungen, wenn die Inkubationstemperatur von 23 °C auf 37 °C erhöht wurde. Die nachfolgenden Mittelwerte errechneten sich aus unabhängigen aggregometrischen Einzelbestimmungen. Außer bei Arachidonsäure ($p = 0,003$) hatte die Temperatur keinen Einfluss auf die Aggregation der Thrombozyten. Um physiologischen Bedingungen möglichst nahe zu kommen, wurden alle Messungen bei 37 °C als Inkubationstemperatur durchgeführt und als Aufbewahrungstemperatur für Plasmen ausgewählt.

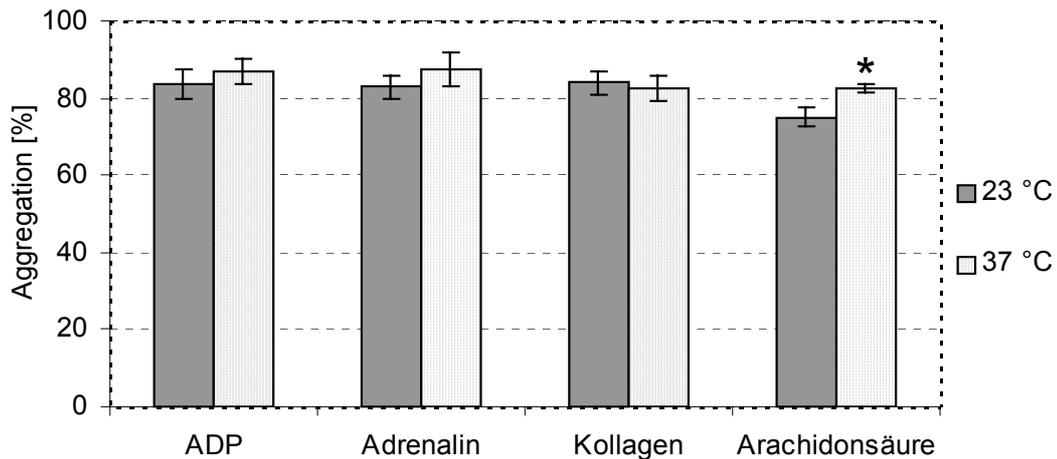


Abbildung 24. Vergleich zwischen 23 °C und 37 °C auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen mit ADP, Adrenalin, Kollagen und Arachidonsäure als Agonisten. Dargestellt wurden die durchschnittliche Thrombozytenaggregationen bei 23 °C (n = 8) und 37 °C (n = 8). *Signifikanz $p < 0,05$ (23 °C vs. 37 °C)

4.3 Testsubstanzen in der aggregometrischen Analyse bei gesunden Probanden

4.3.1 Untersuchungen möglicher Wirkungen von Aminosäuren auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen

Die getesteten Aminosäuren (Glutamat, Aspartat, Asparagin, Glutamin, Isoleucin, Valin, Arginin, Lysin, Prolin) hemmten die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregation in einer Konzentration von 1 mM nicht (Abbildung 25a-d, S. 67). Nur Leucin hemmte die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation. Bei den anderen Aminosäuren kam es in den Aggregationen weder zu einer signifikanten Hemmung, noch zu einer signifikanten Steigerung der maximalen Aggregationen der Thrombozyten. Alle nachfolgenden Angaben beziehen sich, außer bei Arachidonsäure, im Abschnitt 4.3.1.1 bis 4.3.1.3 auf Mittelwertberechnungen einzelner Doppelansätze in der aggregometrischen Analyse der hier beispielhaft dargestellten Aminosäuren Glutamat (Glu) und Lysin (Lys).

4.3.1.1 ADP-induzierte Thrombozytenaggregation

In den ADP-induzierten Aggregationen (Abbildung 25a, S. 67; Anhang Tabelle 36) waren hemmende und/oder stimulierende Effekte durch Aminosäuren nicht nachweisbar. Bei der Aminosäure Glu trat eine maximale Aggregation von $71,3 \pm 15,8$ % (n = 6; Glu vs. Kontrolle: $p = 0,242$) auf und unterschied sich damit zur Kontrolle ($74,4 \pm 10,4$ %, n = 71) nicht. Die prozentuale Aggregation von Lys betrug $72,7 \pm 7,3$ % (n = 6) und wich von der Lösungsmittel spezifischen Kontrolle ($74,8 \pm 8,7$ %, n = 55) ebenfalls nicht ab (Lys vs. Kontrolle: $p = 0,500$).

4.3.1.2 *Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation*

Signifikanten Hemmeffekte durch Aminosäuren (Abbildung 25b, S. 67; Anhang Tabelle 39) konnten ebenfalls nicht nachgewiesen werden. So wiesen Glu und Lys Thrombozytenaggregation von $72,9 \pm 13,0$ % (n = 5; Glu vs. Kontrolle: p = 0,326) bzw. $80,1 \pm 7,0$ % (n = 5; Lys vs. Kontrolle: p = 0,387) auf und unterschieden sich nicht von den Kontrollen, bei denen Aggregationen von $74,7 \pm 8,5$ % (n = 58) bzw. $77,1 \pm 7,2$ % (n = 53) bestimmt wurden.

4.3.1.3 *Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation*

Alle getesteten Aminosäuren waren bei diesem Agonisten ebenfalls nicht wirksam (Abbildung 25c, S. 67; Anhang Tabelle 42). Glu wies eine durchschnittliche Endaggregation von $73,2 \pm 12,2$ % (n = 6) auf und unterschied sich zur Lösungsmittelkontrolle ($75,2 \pm 8,3$ %, n = 66) nicht (Glu vs. Kontrolle: p = 0,407). Lys bewirkte eine Aggregation von $79,5 \pm 5,7$ % (n = 6) und konnte die Aggregation (Lösungsmittelkontrolle $77,2 \pm 6,9$ %, n = 56) ebenfalls nicht verändern (Lys vs. Kontrolle: p = 0,407).

4.3.1.4 *Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation*

Eine Hemmung oder Stimulation durch eine Vielzahl an Aminosäuren konnte auch bei der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation (Abbildung 25d, S. 67; Anhang Tabelle 45) nicht festgestellt werden. Nur Leucin und Asparagin hemmten die Aggregationen der Thrombozyten. Die Aggregationen der mit Leu inkubierten Plasmen betragen $67,7 \pm 13,1$ % (n = 6) und die der Kontrolle $80,0 \pm 9,2$ % (n = 54; Leu vs. Kontrolle: p = 0,033). Plasmen, die mit Asn inkubiert wurden, besaßen Aggregationen von $71,6 \pm 6,5$ % (n = 5, Asn vs. Kontrolle: p = 0,046; Anhang, Tabelle 45).

4.3.2 **Untersuchungen möglicher Wirkungen von Dipeptiden auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen**

Das Dipeptid Valin-Aspartat (Val-Asp) stellte sich in einer Konzentration von 1 mM hinsichtlich der ADP- sowie Adrenalin-induzierten Thrombozytenaggregationen als wirksames, aggregationshemmendes Peptid heraus. Außerdem wirkte Glu-Glu hemmend auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation. Alle anderen getesteten Dipeptide in einer Konzentration von 1 mM besaßen keinerlei Wirkungen auf die Aggregation der Thrombozyten (Abbildung 26a-d, S. 68).

4.3.2.1 *ADP-induzierte Thrombozytenaggregation*

Val-Asp und Glu-Glu (jeweils 1 mM, Abbildung 26a, S. 68; Anhang Tabelle 37) erwiesen sich als wirksam (Glu-Glu vs. Kontrolle: p = 0,002, Val-Asp vs. Kontrolle: p = 0,025): In den lö-

sungsmittelspezifischen Kontrollen bewirkte ADP eine Thrombozytenaggregation von $74,4 \pm 10,4$ % (n = 71) bei 1 % DMSO und $74,4 \pm 9,5$ % (n = 19) bei der 5 %-igen isotonischen Kochsalzlösung. Bei Zugabe von Glu-Glu wurde dagegen eine Aggregation von $63,2 \pm 13,2$ % (n = 15) und von Val-Asp eine Aggregation von $65,3 \pm 5,9$ % (n = 8) ermittelt. Alle übrigen Dipeptide beeinflussten die ADP-abhängigen Aggregationen nicht.

4.3.2.2 *Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation*

Wie in Abbildung 26b (S. 68) zu erkennen ist, nahmen nahezu alle der getesteten Dipeptide keinen Einfluss auf die Aggregationen der Thrombozyten. Das Dipeptid Val-Asp hemmte als einzige Verbindung die Adrenalin-abhängige Aggregation ($71,6 \pm 5,3$ %, n = 9, Kontrolle: $79,5 \pm 7,7$ %, n = 19; Val-Asp vs. Kontrolle: p = 0,014; Anhang, Tabelle 40).

4.3.2.3 *Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation*

Alle ausgewählten Dipeptide hemmten die Kollagen-induzierten Aggregationen nicht (Abbildung 26c, S. 68; Anhang Tabelle 43).

4.3.2.4 *Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation*

Die Aggregationen in Gegenwart aller getesteten Dipeptide wichen nicht von denen der Kontrollplasmen ab und unterlagen nur geringen inter-individuellen Schwankungen (Abbildung 26d, S. 68; Anhang Tabelle 46).

4.3.3 **Untersuchungen möglicher Wirkungen von Tripeptiden auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen**

Es konnten einige Tripeptide (1 mM) identifiziert werden, die als Einzelsubstanzen die Agonisten induzierten Thrombozytenaggregationen beeinflussten (Abbildung 27a-d, S. 69). So steigerte das Tripeptid Leucin-Leucin-Leucin (Leu-Leu-Leu) in einer Konzentration von 1 mM die durch Kollagen induzierten Aggregationen. Ferner wirkte das Tripeptid Lysin-Lysin-Lysin (Lys-Lys-Lys, 1 mM) auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation hemmend. Ansonsten konnten keine weiteren Effekte bei den Tripeptiden beobachtet werden.

4.3.3.1 *ADP-induzierte Thrombozytenaggregation*

Lys-Lys-Lys senkte die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation (Lys-Lys-Lys vs. Kontrolle: p = 0,009; Abbildung 27a, S. 69): Die durchschnittliche Aggregation betrug in Gegenwart des Tripeptids $63,8 \pm 9,3$ % (n = 6) und in Abwesenheit von Lys-Lys-Lys $74,8 \pm 8,7$ % (n = 55, Anhang Tabelle 38). Bei allen anderen Tripeptiden waren keine Wirkungen festzustellen.

4.3.3.2 *Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation*

Alle ausgewählten Tripeptide hemmten die Adrenalin-induzierten Aggregationen nicht (Abbildung 27b, S. 69; Anhang, Tabelle 41).

4.3.3.3 *Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation*

Die maximale Aggregation der Kontrolle wurde durch das Tripeptid Leu-Leu-Leu von $78,7 \pm 6,3$ % ($n = 20$) auf $87,7 \pm 4,9$ % ($n = 5$) gesteigert (Abbildung 27c, S. 69; Leu-Leu-Leu vs. Kontrolle: $p = 0,010$). Die Untersuchungen weiterer Tripeptide erbrachten weder eine Stimulation noch eine Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregationen (Anhang, Tabelle 44).

4.3.3.4 *Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation*

Alle untersuchten Tripeptide modulierten die Arachidonsäure-induzierten Aggregationen nicht (Abbildung 27d, S. 69; Anhang, Tabelle 46). Auch Leu-Leu-Leu, welches sich bei den übrigen Agonisten als Stimulator der Thrombozytenaggregation erwiesen hatte, blieb unwirksam ($p = 0,595$).

4.3.4 **Untersuchungen möglicher Wirkungen von Genistein auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen**

Genistein in unterschiedlichen Konzentrationen (100 μ M, 250 μ M, 500 μ M) hemmte jeweils in Abhängigkeit vom Induktor die Thrombozytenaggregation (Abbildung 28, S. 70).

So wirkte Genistein in den genannten Konzentrationen dosisabhängig in der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation. Wurde Adrenalin als Induktor verwendet, so zeigte Genistein ab einer Konzentration von 250 μ M ausgeprägte Hemmeffekte, die durch eine Konzentrationssteigerung auf 500 μ M weiter verstärkt wurde. Zwar wirkte Genistein in der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation in allen getesteten Konzentrationen. Bei keinem anderen Induktor konnten jedoch so starke Hemmeffekte wie bei Adrenalin beobachtet werden. Bei den Kollagen- sowie Arachidonsäure-induzierten Aggregationen wirkte Genistein ebenfalls als ein starker Hemmstoff der Thrombozytenaggregation.

4.3.4.1 *ADP-induzierte Thrombozytenaggregation*

Wie in Abbildung 28a (S. 70) zu erkennen ist, hemmte 100 μ M Genistein die ADP-induzierte Aggregation der Thrombozyten (Genistein vs. Kontrolle: $p = 0,003$). Bei dieser Konzentration betrug die Aggregation $62,8 \pm 4,7$ % ($n = 6$). Bei 250 μ M wurde eine durchschnittliche Aggregation von $55,9 \pm 10,7$ % ($n = 59$, Genistein vs. Kontrolle: $p = 0,000$) bestimmt. Die stärkste Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation löste 500 μ M Genistein

aus: Hier betrug die maximale Aggregation $48,3 \pm 15,3$ % ($n = 8$, Genistein vs. Kontrolle: $p = 0,000$). Die Aggregationen der Kontrollplasmen betragen $74,8 \pm 10,0$ % ($n = 82$).

4.3.4.2 *Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation*

Ausgeprägte Hemmeffekte konnten bei Konzentrationen von 250 μM und 500 μM Genistein beobachtet werden (Abbildung 28b, S. 70). So betrug die durchschnittliche Aggregation bei Zugabe von 250 μM Genistein $32,5 \pm 23,1$ % ($n = 48$) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ($74,6 \pm 8,1$ %, $n = 71$, Genistein vs. Kontrolle: $p = 0,000$). In Gegenwart von 500 μM Genistein betrug die maximale Aggregation nur noch $9,7 \pm 2,8$ % ($n = 6$, Genistein vs. Kontrolle: $p = 0,000$). Bei einer Genisteinkonzentration von 100 μM betrug die Aggregation dagegen $74,1 \pm 3,0$ % ($n = 7$) und unterschied sich zur Kontrolle nicht (Genistein vs. Kontrolle: $p = 0,932$).

4.3.4.3 *Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation*

Die Aggregation in Gegenwart von 250 μM Genistein betrug $63,7 \pm 19,1$ % ($n = 55$) bei mittleren Kontrollaggregationen von $76,9 \pm 8,1$ % ($n = 91$, Genistein vs. Kontrolle: $p = 0,000$). 500 μM Genistein hemmte ebenfalls die Thrombozytenaggregation ($28,0 \pm 29,8$ %, $n = 24$, Genistein vs. Kontrolle: $p = 0,000$). Wurden plättchenreiche Plasmen mit 100 μM Genistein inkubiert, so wurden keine Hemmungen beobachtet (Abbildung 28c, S. 70; Genistein vs. Kontrolle: $p = 0,836$).

4.3.4.4 *Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation*

In den Konzentrationen von 250 μM sowie 500 μM hemmte Genistein die Thrombozytenaggregation (Abbildung 28d, S. 70). Die maximale Aggregation betrug bei 250 μM Genistein $51,7 \pm 37,3$ % ($n = 33$), gegenüber einer durchschnittlichen Aggregation von $75,3 \pm 15,0$ % ($n = 66$) der Kontrollen (Genistein vs. Kontrolle: $p = 0,000$). 500 μM Genistein hemmte ebenfalls die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation (Genistein vs. Kontrolle: $p = 0,011$), wobei die Aggregation $37,7 \pm 36,7$ % ($n = 6$) betrug.

100 μM Genistein besaß keinen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation ($64,3 \pm 31,9$ %, $n = 21$, Genistein vs. Kontrolle: $p = 0,456$).

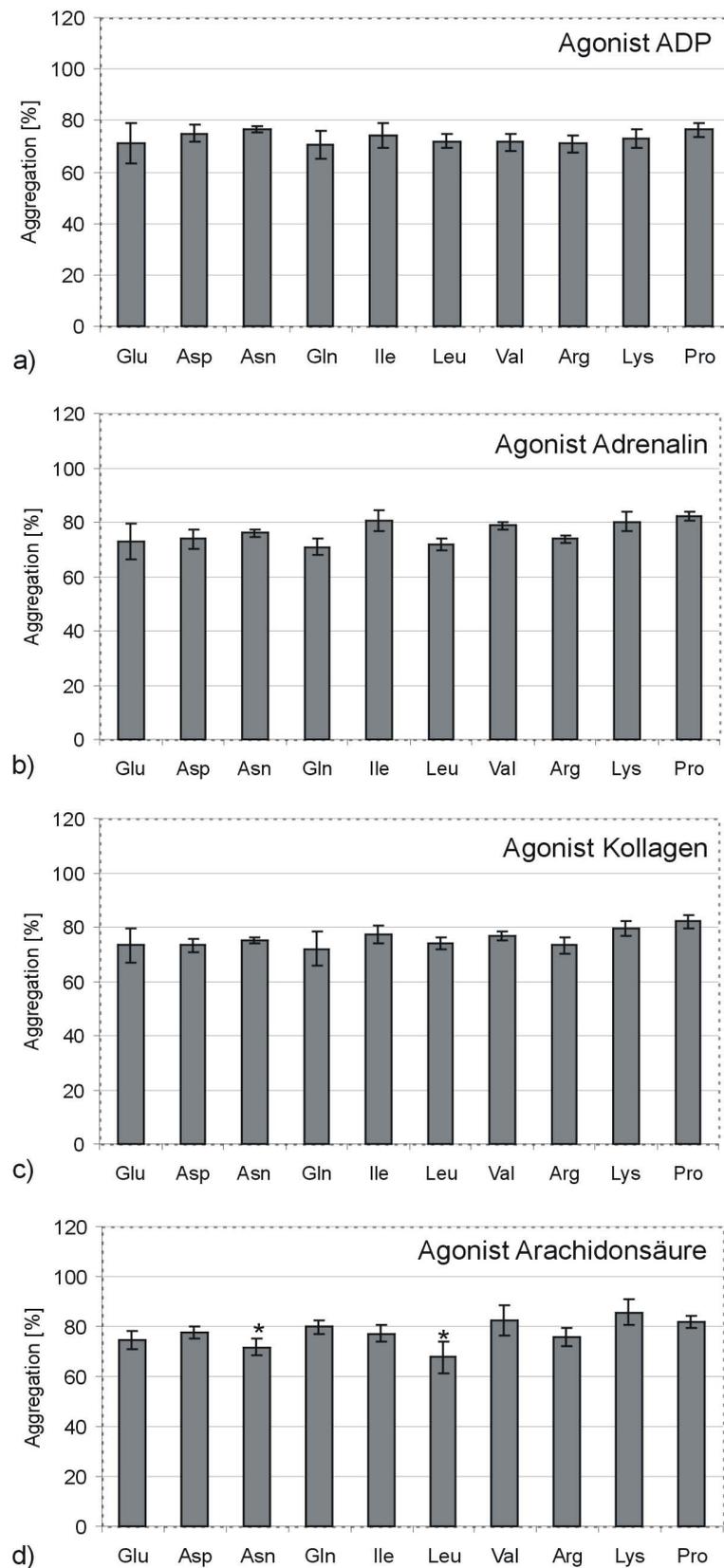


Abbildung 25. Einfluss ausgewählter Aminosäuren auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen mit a) ADP, b) Adrenalin, c) Kollagen und d) Arachidonsäure als Agonisten.

Bestimmt wurden die durchschnittlichen Aggregationen der mit Aminosäuren (1mM) inkubierten Plasmen, *Signifikanz $p < 0,05$ (vs. Kontrolle), Aminosäuren: Glu (Glutamat), Asp (Aspartat), Asn (Asparagin), Gln (Glutamin), Ile (Isoleucin), Leu (Leucin), Val (Valin), Arg (Arginin), Lys (Lysin), Pro (Prolin)

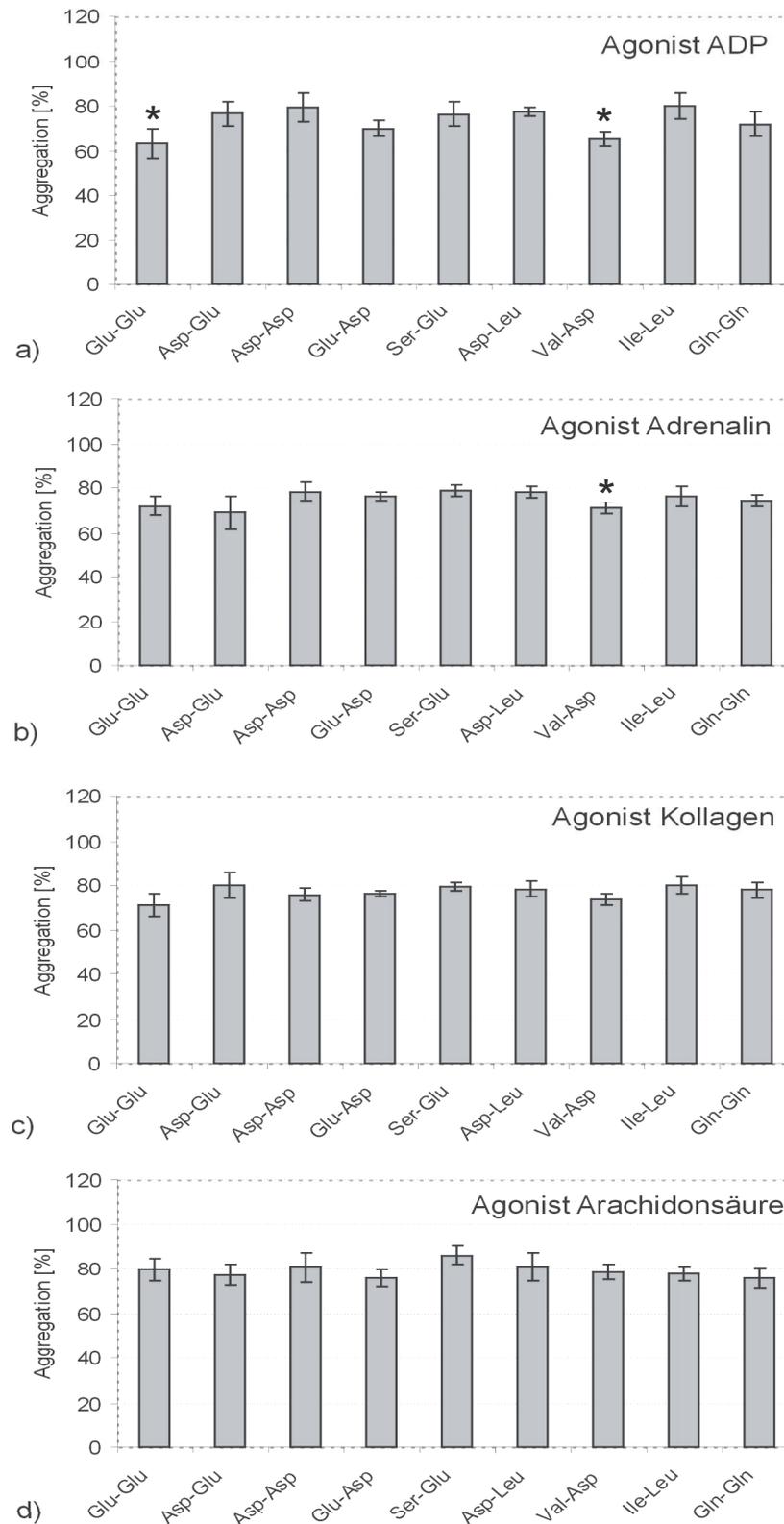


Abbildung 26. Einfluss ausgewählter Dipeptide auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen mit a) ADP, b) Adrenalin, c) Kollagen und d) Arachidonsäure als Agonisten. Bestimmt wurden die durchschnittlichen Aggregationen der mit Dipeptiden (1 mM) inkubierten Plasmen. *Signifikanz $p < 0,05$ (vs. Kontrolle), Dipeptide: Glu-Glu (Glutamat-Glutamat), Asp-Glu (Aspartat-Glutamat), Asp-Asp (Aspartat-Aspartat), Glu-Asp (Glutamat-Aspartat), Ser-Glu (Serin-Glutamat), Asp-Leu (Aspartat-Leucin), Val-Asp (Valin-Aspartat), Ile-Leu (Isoleucin-Leucin), Gln-Gln (Glutamin-Glutamin)

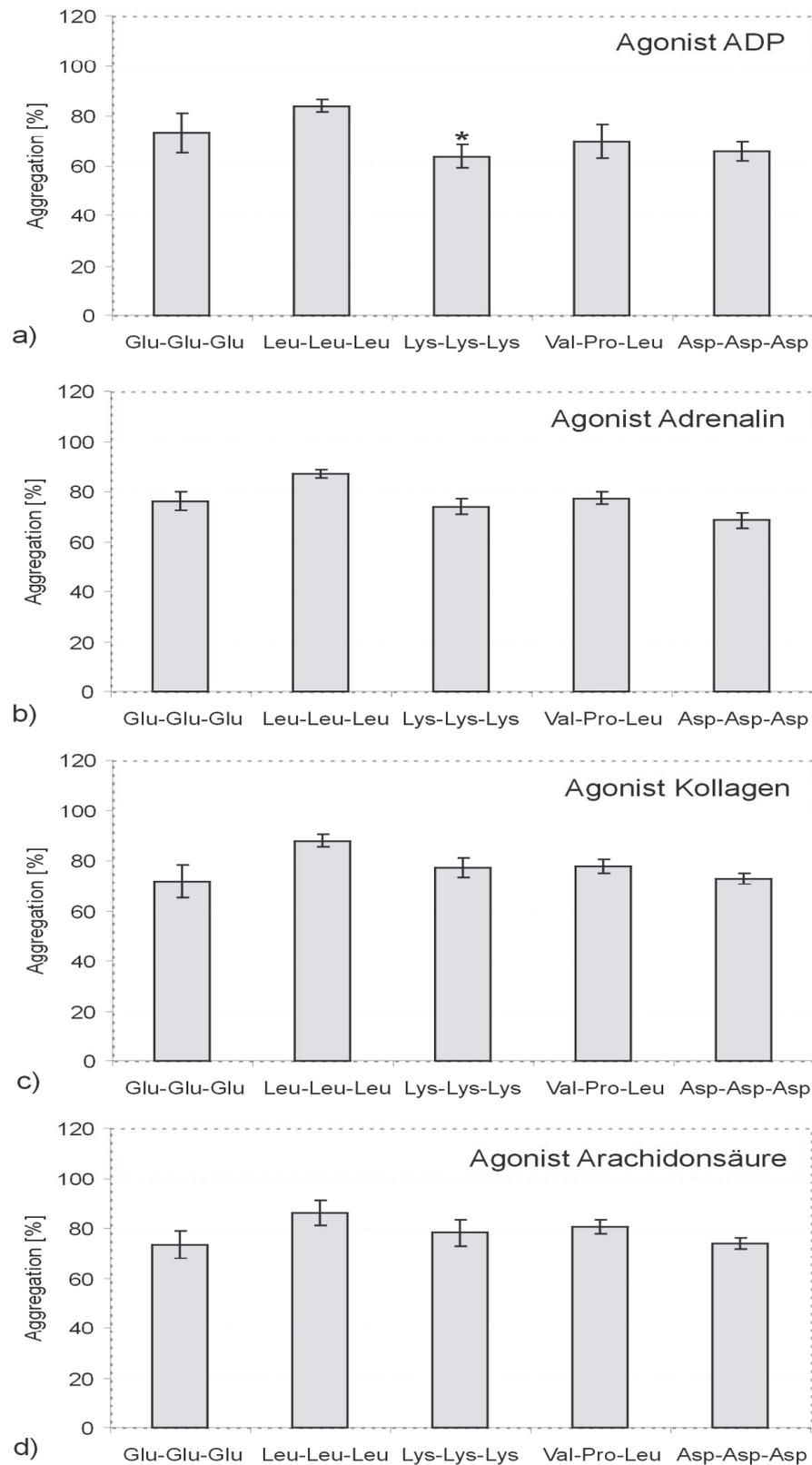


Abbildung 27. Einfluss ausgewählter Tripeptide auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen mit a) ADP, b) Adrenalin, c) Kollagen und d) Arachidonsäure als Agonisten.

*Signifikanz $p < 0,05$ (vs. Kontrolle), Tripeptide: Glu-Glu-Glu (Glutamat-Glutamat-Glutamat), Leu-Leu-Leu (Leucin-Leucin-Leucin), Lys-Lys-Lys (Lysin-Lysin-Lysin), Val-Pro-Leu (Valin-Prolin-Leucin), Asp-Asp-Asp (Aspartat-Aspartat-Aspartat)

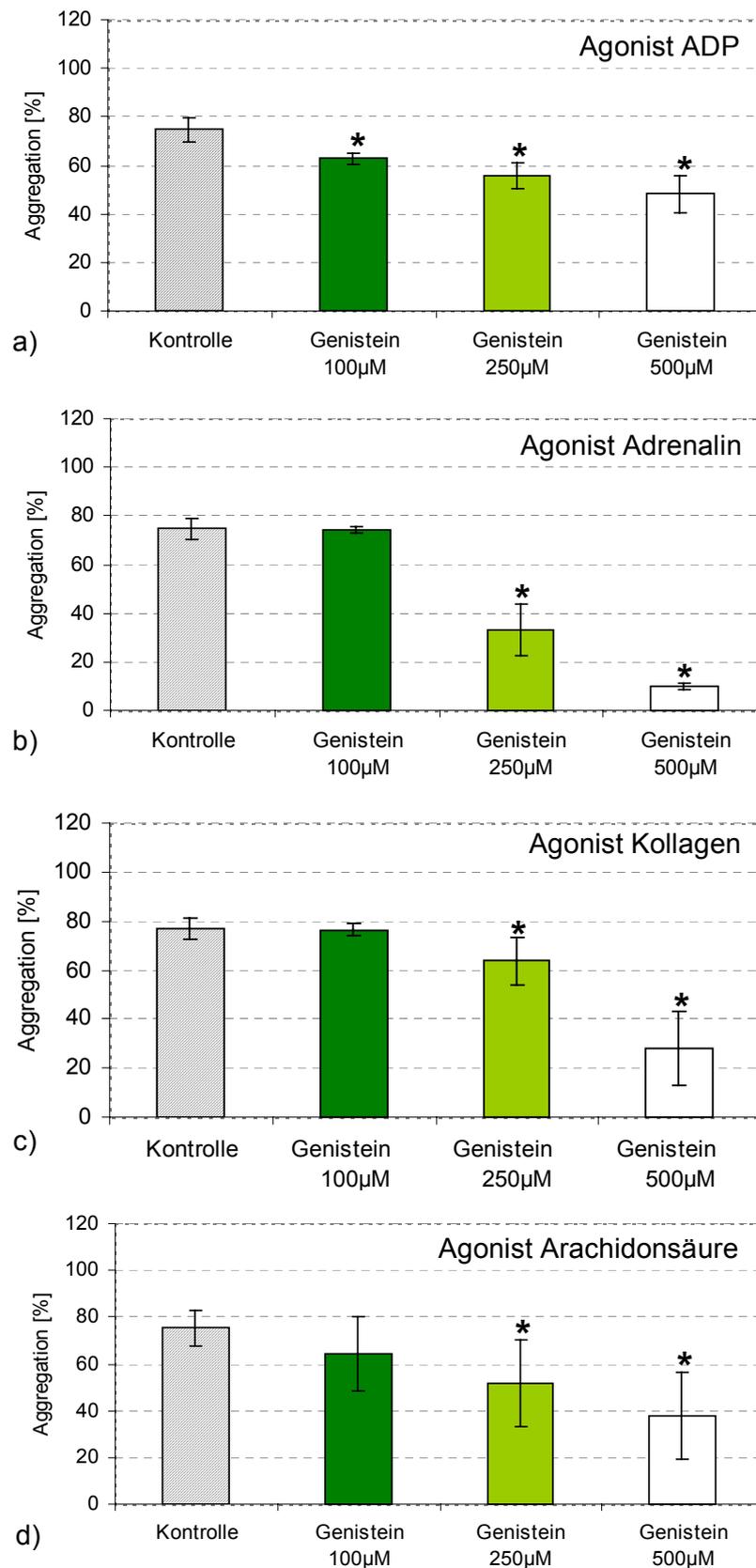


Abbildung 28. Wirkung des Genisteins auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen mit a) ADP, b) Adrenalin, c) Kollagen und d) Arachidonsäure als Agonisten.

Bestimmt wurden die durchschnittlichen Aggregation der mit 100 µM, 250 µM und 500 µM Genistein inkubierten Plasmen. *Signifikanz $p < 0,05$ (Vergleich Genistein vs. Kontrolle)

4.4 Untersuchungen zu potenziellen Wechselwirkungen zwischen den Testsubstanzen

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob die biologische Funktion resorbierbarer Aminosäuren und Peptide bei der Modulation der Thrombozytenfunktion nicht im Einzeleffekt, sondern in der Verstärkung der durch Genistein hervorgerufenen Hemmung der Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregation lag.

Dazu wurden Versuche zur möglichen Wechselwirkung zwischen den Aminosäuren und Peptiden und dem Isoflavon Genistein durchgeführt.

Additive Wechselwirkungen waren nicht zu erwarten, da die meisten Aminosäuren und Peptide die Agonisten-induzierten Aggregationen nicht beeinflussten. Es wurde daher vermutet, dass möglicherweise synergistische Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren bzw. Peptiden und Genistein auf die Aktivierung der Blutplättchen bestehen.

Alle Aminosäuren und Peptide – jeweils in einer Konzentration von 1 mM – wurden daher auf ihre möglichen Wechselwirkungen mit 250 µM Genistein auf die durch ADP-, Adrenalin- und Kollagen-induzierten Aggregationen getestet. Bei diesen Agonisten wurden die Untersuchungen stets mit 250 µM Genistein durchgeführt, da sich dieser Genisteinspiegel in den ADP-, Adrenalin- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregationen als inhibitorisch erwies.

Die Genisteinkonzentration wurden dagegen bei Arachidonsäure auf Grund der hohen interindividuellen Schwankungen, die bei diesem Agonisten in Gegenwart des Flavonoids beobachtet wurde, variiert. Dadurch war es möglich, potenzielle Wechselwirkungen über einen großen Genisteinkonzentrationsbereich zu untersuchen.

4.4.1 Untersuchungen zu potenziellen Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren und dem Isoflavon Genistein

Keine der Aminosäuren verstärkte die durch Genistein hervorgerufene Hemmung der ADP- und Adrenalin-induzierten Thrombozytenaggregationen. Nur Asn erwies sich hinsichtlich der Kollagen-abhängigen Plättchenaggregation und Glu bezüglich der Arachidonsäure-induzierten Aggregationen als wirkungsvoll. Alle Ergebnisse zu diesen Versuchsserien wurden im Anhang (Tabelle 35, 38, 41) dargestellt.

4.4.1.1 *ADP-induzierte Thrombozytenaggregation*

Es konnten keine synergistischen oder additiven Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren und 250 µM Genistein identifiziert werden (Anhang, Tabelle 36).

4.4.1.2 Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation

Alle ausgewählten Aminosäuren verstärkten nicht die durch Genistein hervorgerufene Hemmung der Adrenalin-induzierten Thrombozytenaggregationen. Synergistische oder additive Wechselwirkungen konnten nicht festgestellt werden (Anhang, Tabelle 39).

4.4.1.3 Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation

1 mM Asn verstärkte synergistisch die durch 250 μ M Genistein hervorgerufene Hemmung der Thrombozytenaggregation (Abbildung 29, Anhang, Tabelle 42). Die Aggregation des Gemisches aus beiden Testsubstanzen lag bei $61,3 \pm 17,3$ % ($n = 5$) und unterschied sich deutlich von 250 μ M Genistein ($72,3 \pm 11,5$ %, $n = 55$; Gemisch vs. Genistein: $p = 0,045$, Gemisch vs. Asn: $p = 0,016$).

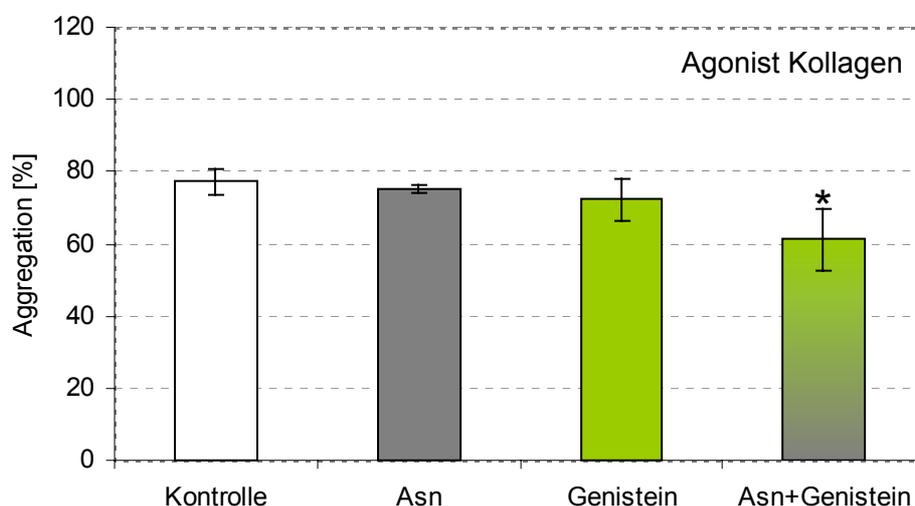


Abbildung 29. Darstellung der synergistischen Wechselwirkung zwischen Genistein und Asparagin in der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation.

Darstellung der synergistischen Wechselwirkung zwischen 250 μ M Genistein und der Aminosäure Asparagin (Asn, 1 mM) als Gemisch (250 μ M Genistein + 1 mM Asn) im Vergleich zur Kontrolle und zu den jeweiligen Einzelsubstanzen. *Signifikanz $p < 0,05$ (Gemisch vs. Genistein, Gemisch vs. Asn)

4.4.1.4 Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation

Es wurden 5 unabhängige Versuche mit Glu (1 mM) und mit variablen Genisteinkonzentrationen durchgeführt (Abbildung 30a-c, S. 74). Von diesen waren in 3 Experimenten synergistische Wechselwirkungen zwischen Genistein und Glu nachweisbar.

Eine „niedriger“ Konzentrationsbereich von Genistein (100 μ M-450 μ M) zeigte mit 1 mM Glutamat keinen synergistischen Hemmeffekt auf die Arachidonsäure-abhängige Thrombozytenaggregation (Gemisch vs. Genistein: $p = 0,014$, Gemisch vs. Substanz: $p = 0,077$). Wurde die Genisteinkonzentration auf 150 μ M bis 500 μ M gesteigert („mittleres Genistein“), so wa-

ren bei diesen Konzentrationen synergistische Wechselwirkungen beider Substanzen aggregometrisch nachweisbar: Die Aggregation wurde durch das Gemisch vollständig gehemmt, wobei die Aggregation durch Genistein allein in diesem Konzentrationsbereich zwar verzögert wurde, jedoch allein keine Hemmung bewirkte. Nur in Form des Gemisches aus Genistein und Glutamat, konnte eine Hemmung der Aggregation erreicht werden (Gemisch vs. Genistein: $p = 0,046$, Gemisch vs. Glu: $p = 0,046$; Anhang, Tabelle 48, 49). Eine vollständige Hemmung der Aggregation wurde im „hohen“ Genisteinkonzentrationsbereich von 200 μM bis 400 μM und 1 mM Glu sowohl durch Genistein alleine als auch durch das Gemisch aus beiden hervorgerufen (Gemisch vs. Genistein: $p = 0,841$, Gemisch vs. Substanz: $p = 0,008$). Gleichartige Versuche wurden zusätzlich mit niedrigeren Glutamatkonzentrationen von 1 μM ($n = 6$) sowie 1 nM ($n = 3$) durchgeführt. Beide Konzentrationen ergaben mit variablen Genisteinkonzentrationen keine synergistischen Wechselwirkungen auf die durch Arachidonsäure induzierten Aggregationen. Alle weiteren Versuche auf Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren und Genistein ergaben keine nachweisbaren Effekte.

4.4.2 Untersuchungen zu potenziellen Wechselwirkungen zwischen Dipeptiden und dem Isoflavon Genistein

Mehrere Dipeptide verstärkten in synergistischer Weise die durch Genistein hervorgerufenen Hemmungen der agonistenspezifischen Aggregationen. Getestet wurden die Verbindungen Glutamat-Glutamat (Glu-Glu), Aspartat-Glutamat (Asp-Glu), Glutamat-Aspartat (Glu-Asp), Aspartat-Aspartat (Asp-Asp), Serin-Glutamat (Ser-Glu), Valin-Aspartat (Val-Asp), Isoleucin-Leucin (Ile-Leu) und Glutamin-Glutamin (Gln-Gln). Alle Ergebnisse zu diesen Versuchsserien wurden im Anhang (Tabelle 37, 40, 43) dargestellt.

4.4.2.1 ADP-induzierte Thrombozytenaggregation

Die Gemische aus Glu-Glu, Asp-Glu oder Glu-Asp (jeweils 1 mM) und 250 μM Genistein hemmten jeweils in synergistischer Weise die Aggregation (Abbildung 31, S. 76). Bei Glu-Glu und Genistein als Gemisch wurde eine Aggregation von $48,8 \pm 8,9 \%$ ($n = 15$) beobachtet. Es lag eine synergistische Wechselwirkung zwischen diesen beiden Substanzen vor, da das Gemisch eine signifikant stärkere Hemmung hervorrief als die beiden Verbindungen jeweils alleine (Gemisch vs. Genistein: $p = 0,011$, Gemisch vs. Glu-Glu: $p = 0,002$, Anhang, Tabelle 37).

Vergleichbare synergistische Wechselwirkungen wurden auch beim Gemisch aus Asp-Glu (1 mM) und Genistein (250 μM) beobachtet (Gemisch vs. Genistein: $p = 0,024$, Gemisch vs. Asp-Glu: $p = 0,001$): Hier betrug die Aggregation des Gemisches $45,9 \pm 13,4 \%$ ($n = 12$), des Genisteins $55,9 \pm 10,6 \%$ ($n = 59$) und des Dipeptids $71,2 \pm 14,9 \%$ ($n = 10$, Abbildung 31b).

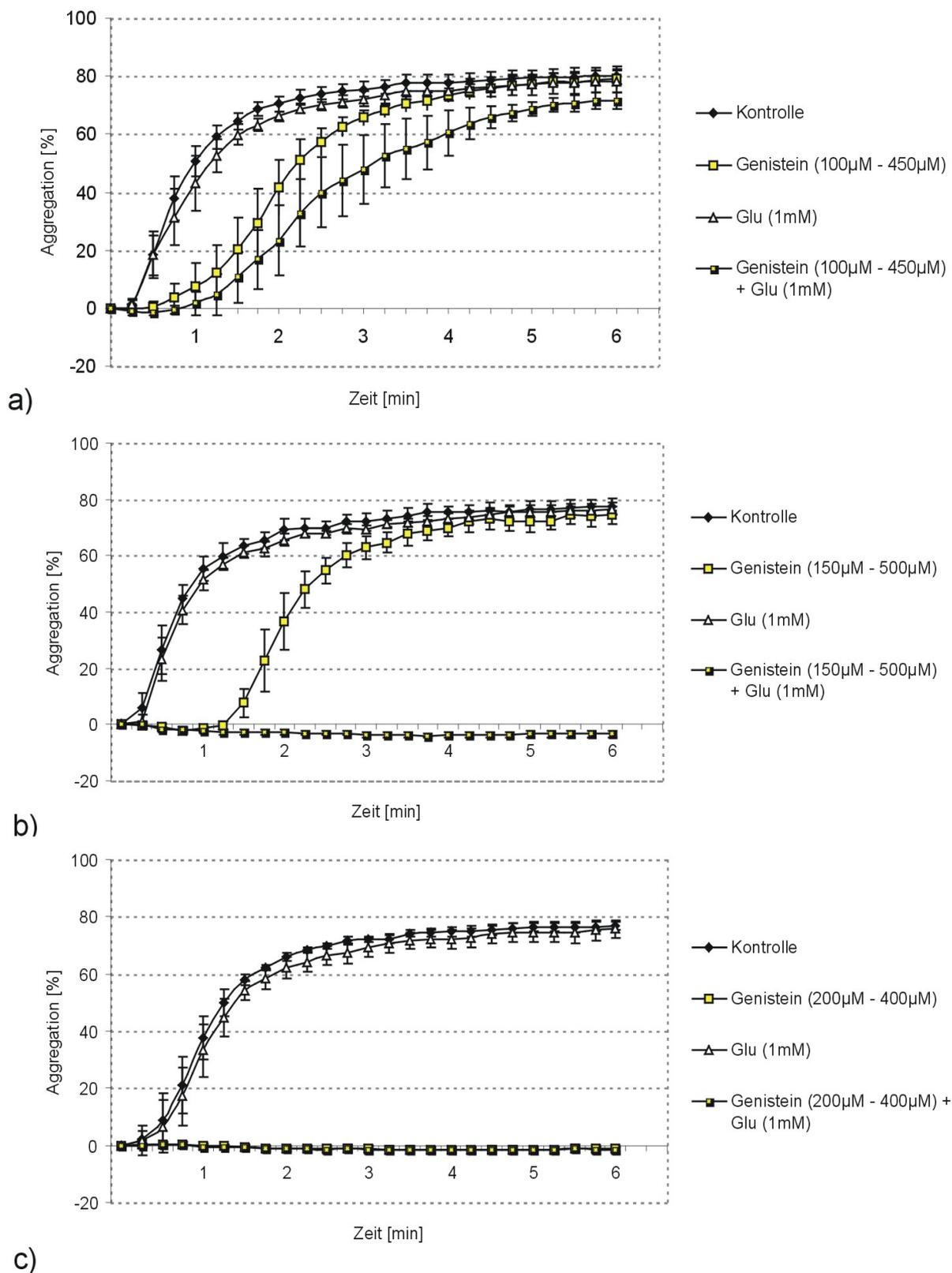


Abbildung 30. Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Glutamat auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.

Dargestellt wurden Wechselwirkungen zwischen Genistein („niedriger“, „mittlerer“, „hoher“ Konzentrationsbereich) und 1mM Glu als Gemische im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den jeweiligen Einzelsubstanzen.

Beim Dipeptid Glu-Asp wurden ebenfalls synergistische Effekte nachgewiesen (Gemisch vs. Genistein: $p = 0,007$, Gemisch vs. Glu-Asp $p=0,008$). Dabei betragen die Aggregationen des Gemisches $45,6 \pm 4,9 \%$ ($n = 5$), die von $250 \mu\text{M}$ Genistein $59,2 \pm 9,7 \%$ ($n = 20$) und die von 1 mM Glu-Asp $69,9 \pm 6,9 \%$ ($n = 5$, Abbildung 31c, S. 76; Anhang, Tabelle 37).

4.4.2.2 *Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation*

Glu-Asp hemmte synergistisch mit Genistein ebenfalls die Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation (Abbildung 32, S. 77). Die durchschnittliche Aggregation in Gegenwart des Gemisches aus 1 mM Glu-Asp und $250 \mu\text{M}$ Genistein betrug $15,3 \pm 11,0 \%$ ($n = 5$) und unterschied sich damit signifikant sowohl vom Genistein ($40,2 \pm 24,4 \%$, $n = 20$; Gemisch vs. Genistein: $p = 0,035$) als auch vom Dipeptid Glu-Asp ($76,2 \pm 4,0 \%$, $n = 5$; Gemisch vs. Glu-Asp: $p = 0,008$; Abbildung 32a).

Alle anderen Dipeptide zeigten hinsichtlich der Adrenalin-induzierten Thrombozytenaggregation keine synergistischen Effekte mit Genistein (Anhang, Tabelle 40).

4.4.2.3 *Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation*

Das Dipeptid Glu-Glu (1 mM) hemmte zusammen mit $250 \mu\text{M}$ Genistein synergistisch die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation (Gemisch vs. Genistein: $p = 0,017$, Gemisch vs. Glu-Glu: $p = 0,003$; Abbildung 32b, S. 77). Die Aggregation des Gemisches lag bei $51,4 \pm 19,1 \%$ ($n = 16$), die des Genisteins bei $63,7 \pm 12,1 \%$ ($n = 55$) und die des Dipeptids Glu-Glu bei $70,7 \pm 9,0 \%$ ($n = 11$).

Ferner zeichnete sich das 1 mM Dipeptid Glu-Asp durch eine synergistische Hemmung mit $250 \mu\text{M}$ Genistein aus (Abbildung 32c, S. 76; Gemisch vs. Genistein: $p = 0,041$; Gemisch vs. Glu-Asp: $p = 0,016$). Dabei lag die Aggregation des Gemisches bei $55,6 \pm 28,6 \%$ ($n = 5$), die des Genisteins bei $70,4 \pm 16,2 \%$ ($n = 21$) und die des Dipeptids Glu-Asp bei $76,1 \pm 2,9 \%$ ($n = 5$).

Alle anderen Dipeptide verstärkten die Genisteinwirkung in der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation nicht (Anhang, Tabelle 43).

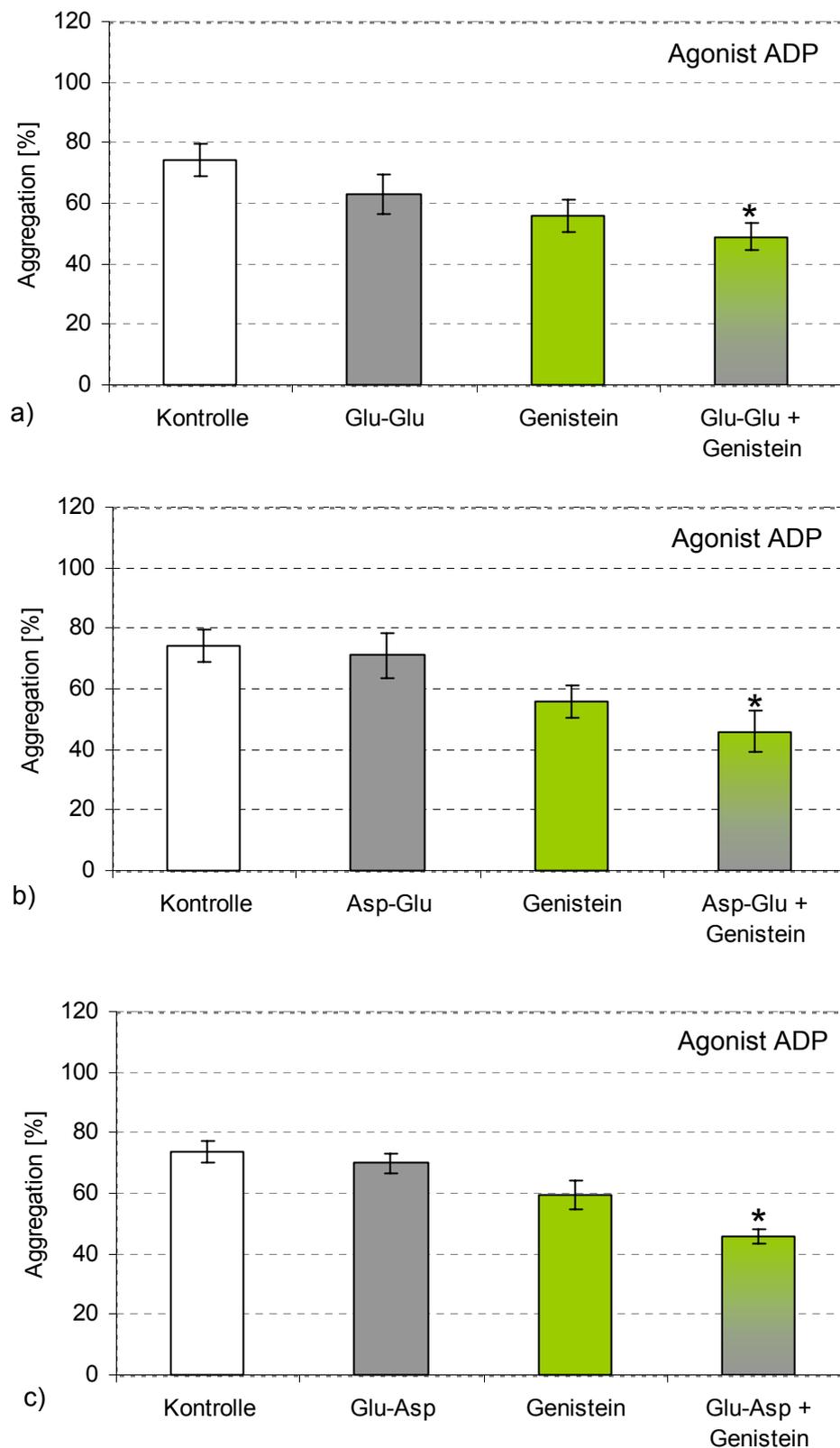


Abbildung 31. Darstellung der synergistischen Wechselwirkungen zwischen Genistein und Dipeptiden in der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation mit a) Glutamat-Glutamat, b) Aspartat-Glutamat und c) Glutamat-Aspartat als Dipeptide.

Dargestellt wurden die synergistischen Wechselwirkungen zwischen 250 μ M Genistein und a) 1 mM Glu-Glu, b) 1 mM Asp-Glu sowie c) 1 mM Glu-Asp als Gemisch (250 μ M Genistein + 1 mM Dipeptid) im Vergleich zu der Kontrolle sowie zu den jeweiligen Einzelsubstanzen. *Signifikanz $p < 0,05$ (Gemisch vs. Genistein, Gemisch vs. Dipeptid)

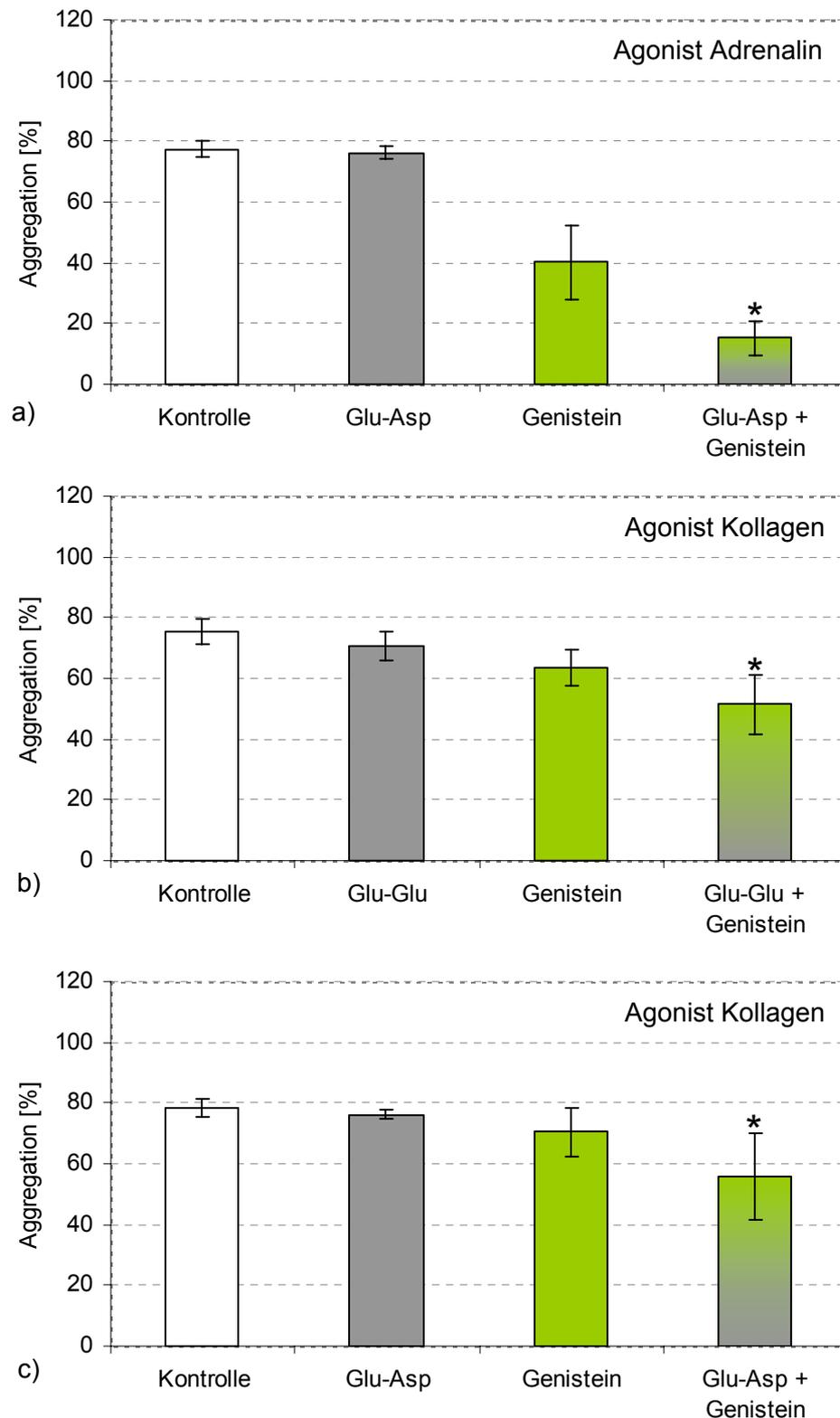


Abbildung 32. Darstellung der synergistischen Wechselwirkungen zwischen Genistein und Dipeptiden in der Adrenalin-induzierten Thrombozytenaggregation mit a) Glutamat-Aspartat als Dipeptid und der synergistischen Wechselwirkung in den Kollagen-induzierten Aggregationen mit b) Glutamat-Glutamat und c) Glutamat-Aspartat als Dipeptide.

Dargestellt wurden synergistischen Wechselwirkungen zwischen 250 μ M Genistein und 1 mM Glu-Asp (a, c) und 1 mM Glu-Glu (b) als Gemische (250 μ M Genistein + 1 mM Dipeptid) im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den jeweiligen Einzelsubstanzen. *Signifikanz $p < 0,05$ (Gemisch vs. Genistein, Gemisch vs. Dipeptid)

4.4.2.4 *Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation*

Das Dipeptid Glu-Glu (1 mM) wirkte mit Genistein in jedem durchgeführten Test (n = 8) synergistisch (Abbildung 33a-c, S. 80). Im „niedrigen“ Konzentrationsbereich des Genisteins (100 μ M-300 μ M) wurden keine synergistischen Wechselwirkungen zwischen Genistein und dem Dipeptid Glu-Glu beobachtet (Gemisch vs. Genistein: p = 0,478, Gemisch vs. Glu-Glu: p = 0,562; Anhang, Tabelle 48, Tabelle 49), die jedoch im „mittleren“ Bereich auftraten (125 μ M-350 μ M; Gemisch vs. Genistein: p = 0,000, Gemisch vs. Glu-Glu: p = 0,000). In „hohen“ Genisteinkonzentrationsbereichen (250 μ M-400 μ M) reichte der alleinige Zusatz von Genistein aus, um eine vollständige Hemmung der Arachidonsäure-induzierten Aggregation der Thrombozyten hervorzurufen (Gemisch vs. Genistein: p = 0,541; Gemisch vs. Glu-Glu: p = 0,000).

Es wurden gleichartige Experimente mit einer Dipeptidkonzentration von 1 μ M (n = 5) durchgeführt. Auch bei diesen niedrigen Dipeptidkonzentrationen wurden synergistische Wechselwirkungen auf die Hemmung der Arachidonsäure induzierten Thrombozytenaggregation beobachtet (Abbildung 34a-c, S. 81; Anhang, Tabelle 48, Tabelle 49): Keine Effekte wurden bei niedrigen Genisteinkonzentrationen (150 μ M-300 μ M; Gemisch vs. Genistein: p = 0,310, Gemisch vs. Glu-Glu: p = 0,310), synergistische bei mittleren Genisteinkonzentrationen (175 μ M-400 μ M; Gemisch vs. Genistein: p = 0,002, Gemisch vs. Glu-Glu: p = 0,002) und vollständige Aggregationshemmung bei hohen Genisteinkonzentrationen (250 μ M-500 μ M; Gemisch vs. Genistein: p = 0,686, Gemisch vs. Glu-Glu: p = 0,029) beobachtet.

Asp-Glu (1 mM), welches in 7 unabhängigen Versuchen getestet wurde (Abbildung 35a-c, S. 82) zeigte in 5 Versuchen synergistische Wechselwirkungen zwischen Genistein (100 μ M-225 μ M) und dem Dipeptid (Gemisch vs. Genistein: p = 0,001, Gemisch vs. Asp-Glu: p = 0,001; Anhang, Tabelle 48, Tabelle 49). „Niedrige“ Genisteinkonzentrationen (50 μ M-150 μ M) erbrachten keine synergistischen Wechselwirkungen zwischen den beiden Substanzen (Gemisch vs. Genistein: p = 0,796, Gemisch vs. Asp-Glu: p = 0,761), während „hohe“ Genisteinkonzentrationen (100 μ M-250 μ M) alleine eine vollständige Hemmung der Aggregation der Thrombozyten bewirkten (Gemisch vs. Genistein: p = 0,343, Gemisch vs. Asp-Glu: p = 0,057).

Asp-Glu wurde zusätzlich in Konzentrationen von 1 μ M getestet. In 3 von 4 Versuchen wurden synergistische Wechselwirkungen beobachtet (Abbildung 36a-c, S. 83; Keine Hemmung durch Genistein: Gemisch vs. Genistein: p = 0,486, Gemisch vs. Asp-Glu: p = 0,343; synergistischer Effekt: Gemisch vs. Genistein: p = 0,046, Gemisch vs. Asp-Glu: p = 0,046; Vollhemmung durch Genistein: Gemisch vs. Genistein: p = 0,818, Gemisch vs. Asp-Glu: p = 0,008; Anhang, Tabelle 48, Tabelle 49).

Das Dipeptid Asp-Asp (1 mM) wirkte zusammen mit Genistein ebenfalls inhibitorisch auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation (n = 5, Abbildung 37a-c, S. 84).

In einem „niedrigen“ Genisteinkonzentrationsbereich von 100 µM-250 µM zeigte weder das Gemisch aus beiden Substanzen noch die Einzelsubstanzen hemmende Wirkungen auf die Aggregation der Thrombozyten (Gemisch vs. Genistein: p = 0,200, Gemisch vs. Asp-Asp: p = 0,486; Anhang, Tabelle 48, Tabelle 49). Bei „mittleren“ Genisteinkonzentrationen von 50 µM-350 µM war das Gemisch aus Asp-Asp und Genistein synergistisch wirksam (Gemisch vs. Genistein: p = 0,008, Gemisch vs. Asp-Asp: p = 0,008), wohingegen bei „höheren“ Genisteinkonzentrationen (100 µM-450 µM) Genistein allein genügte, um einen Hemmeffekt der Thrombozytenaggregation auszulösen (Gemisch vs. Genistein: p = 0,548, Gemisch vs. Asp-Asp: p = 0,008).

Ser-Glu (1 mM) erwies sich als ein weiteres wirksames Dipeptid (n = 6, Abbildung 38a-c, S. 85; Anhang, Tabelle 48, Tabelle 49). In „niedrigen“ Genisteinkonzentrationen von 25 µM bis 350 µM zeigten sich keine Wechselwirkungen (Gemisch vs. Genistein: p = 0,818, Gemisch vs. Ser-Glu: p = 0,589). In einem „mittleren“ Konzentrationsbereich von 50 µM bis 300 µM wurde ein Synergismus zwischen 1 mM Ser-Glu und Genistein beobachtet (Gemisch vs. Genistein: p = 0,029, Gemisch vs. Ser-Glu: p = 0,029). Wurde die Genisteinkonzentration auf 100 µM bis maximal 500 µM gesteigert („hohes“ Genistein), so hemmte Genistein sowohl alleine als auch in Kombination mit 1 mM Ser-Glu die Thrombozytenaggregation (Gemisch vs. Genistein: p = 0,730, Gemisch vs. Ser-Glu: p = 0,000).

Synergistische Wirkungen zeigte Genistein ebenfalls in Kombination mit Val-Asp (1 mM) auf die Arachidonsäure induzierte Aggregation (n = 5, Abbildung 39a-c, S. 86; Keine Hemmung durch Genistein: Gemisch vs. Genistein: p = 0,161, Gemisch vs. Val-Asp: p = 0,161; synergistischer Effekt: Gemisch vs. Genistein: p = 0,002, Gemisch vs. Val-Asp: p = 0,002; Vollhemmung durch Genistein: Gemisch vs. Genistein: p = 0,356, Gemisch vs. Val-Asp: p = 0,029; Anhang, Tabelle 48, Tabelle 49).

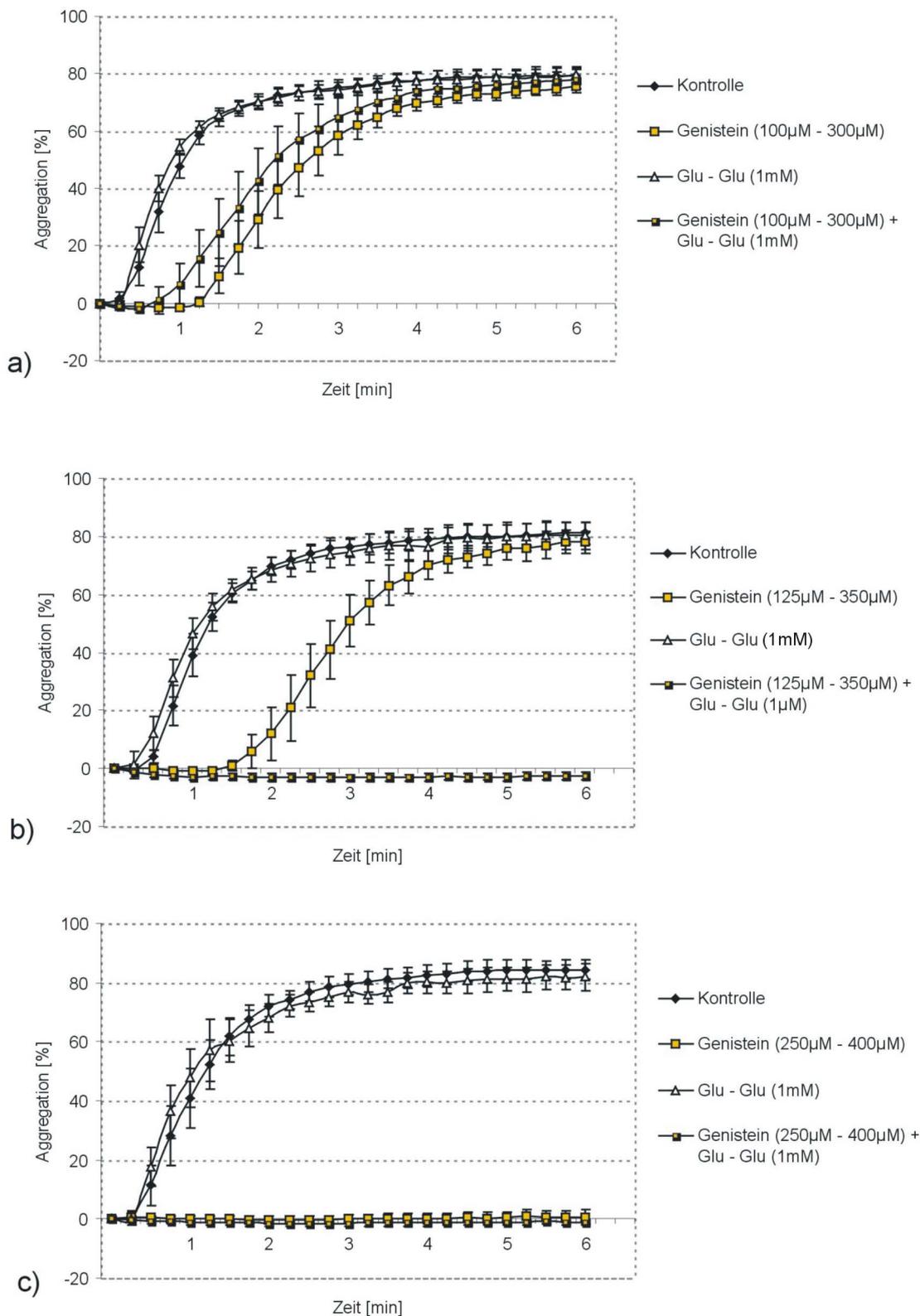


Abbildung 33. Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Glutamat-Glutamat auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.

Dargestellt wurden Wechselwirkungen zwischen Genistein („niedriger“, „mittlerer“, „hoher“ Konzentrationsbereich) und 1 mM Glutamat-Glutamat (Glu-Glu) als Gemische im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den jeweiligen Einzelsubstanzen.

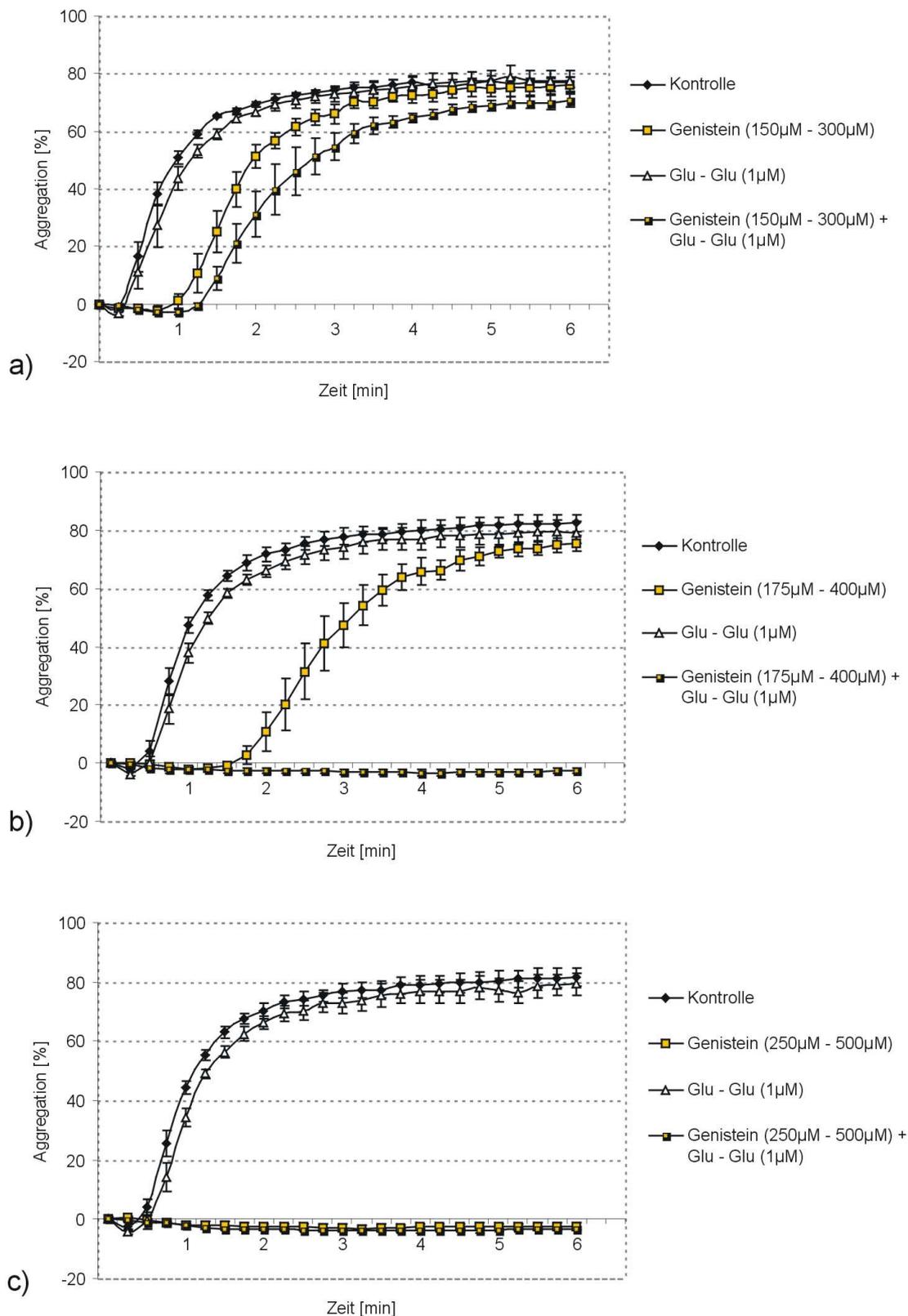


Abbildung 34. Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Glutamat-Glutamat auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.

Dargestellt wurden Wechselwirkungen zwischen Genistein („niedriger“, „mittlerer“, „hoher“ Konzentrationsbereich) und 1 μM Glutamat-Glutamat (Glu-Glu) als Gemische im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den jeweiligen Einzelsubstanzen.

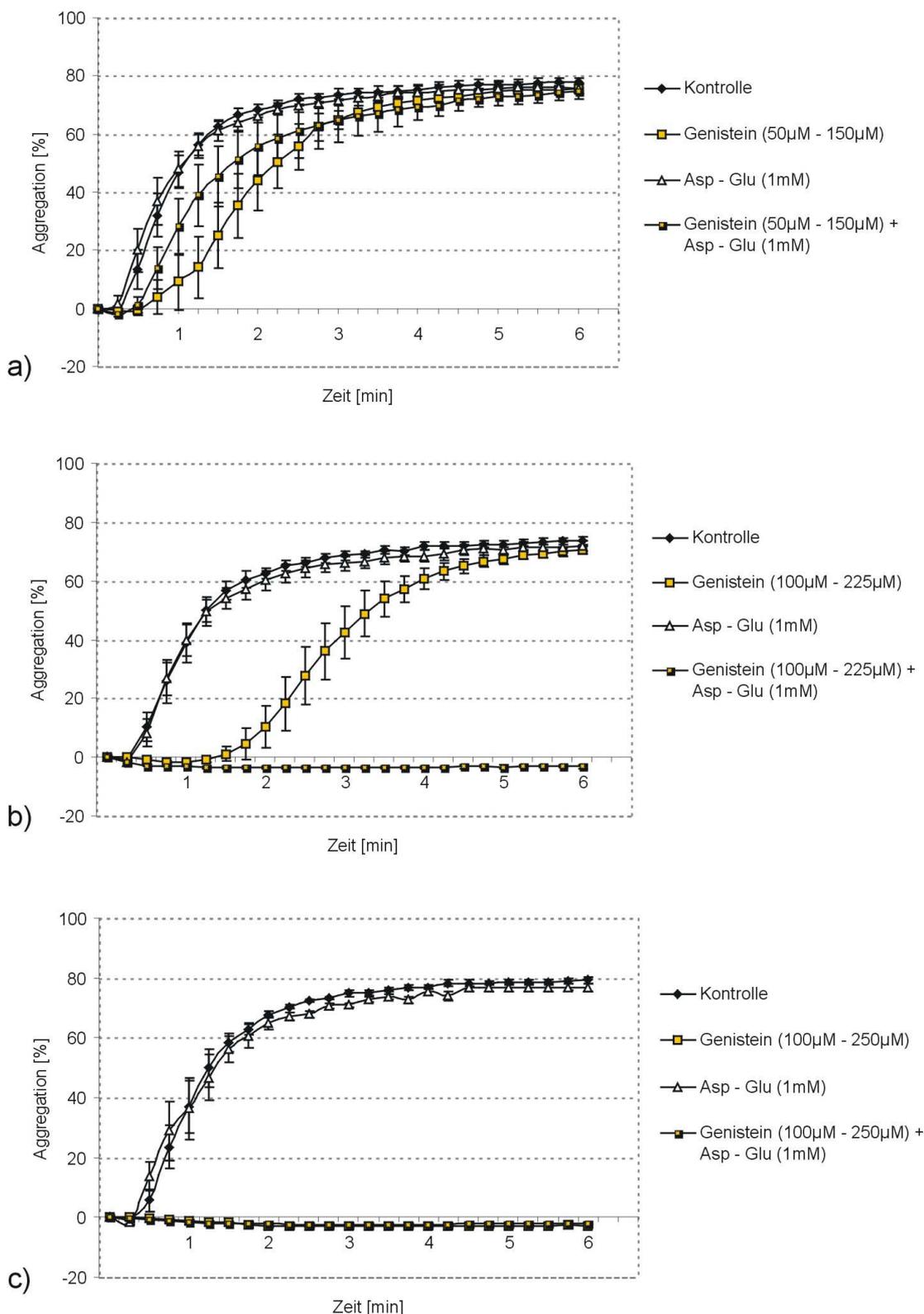


Abbildung 35. Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Aspartat-Glutamat auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.

Dargestellt wurden Wechselwirkungen zwischen Genistein („niedriger“, „mittlerer“, „hoher“ Konzentrationsbereich) und 1 mM Aspartat-Glutamat (Asp-Glu) als Gemische im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den jeweiligen Einzelsubstanzen.

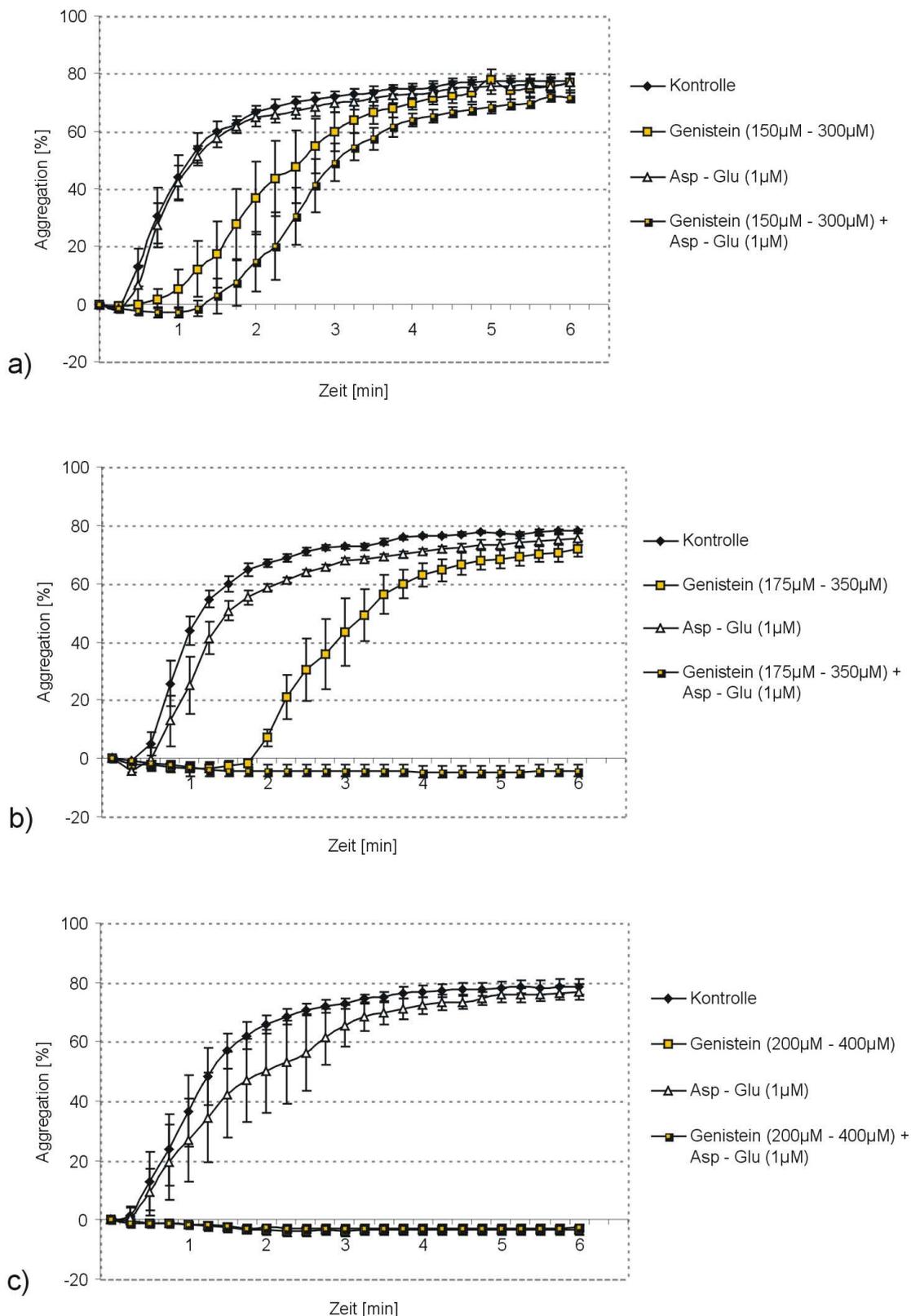


Abbildung 36. Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Aspartat-Glutamat auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischem Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.

Dargestellt wurden Wechselwirkungen zwischen Genistein („niedriger“, „mittlerer“, „hoher“ Konzentrationsbereich) und 1 µM Aspartat-Glutamat (Asp-Glu) als Gemische im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den jeweiligen Einzelsubstanzen.

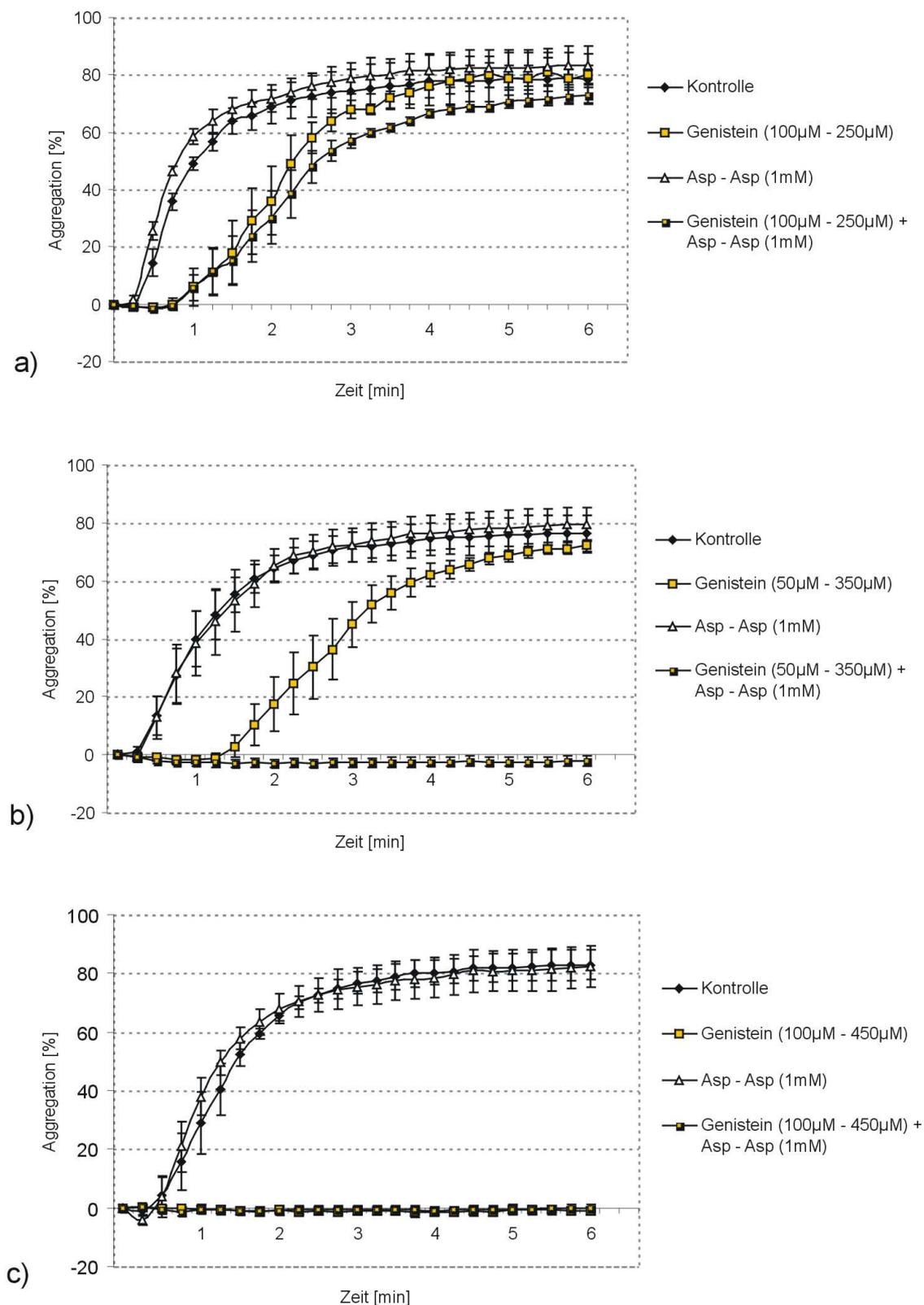


Abbildung 37. Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Aspartat-Aspartat auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.

Dargestellt wurden Wechselwirkungen zwischen Genistein („niedriger“, „mittlerer“, „hoher“ Konzentrationsbereich) und 1 mM Aspartat-Aspartat (Asp-Asp) als Gemische im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den jeweiligen Einzelsubstanzen.

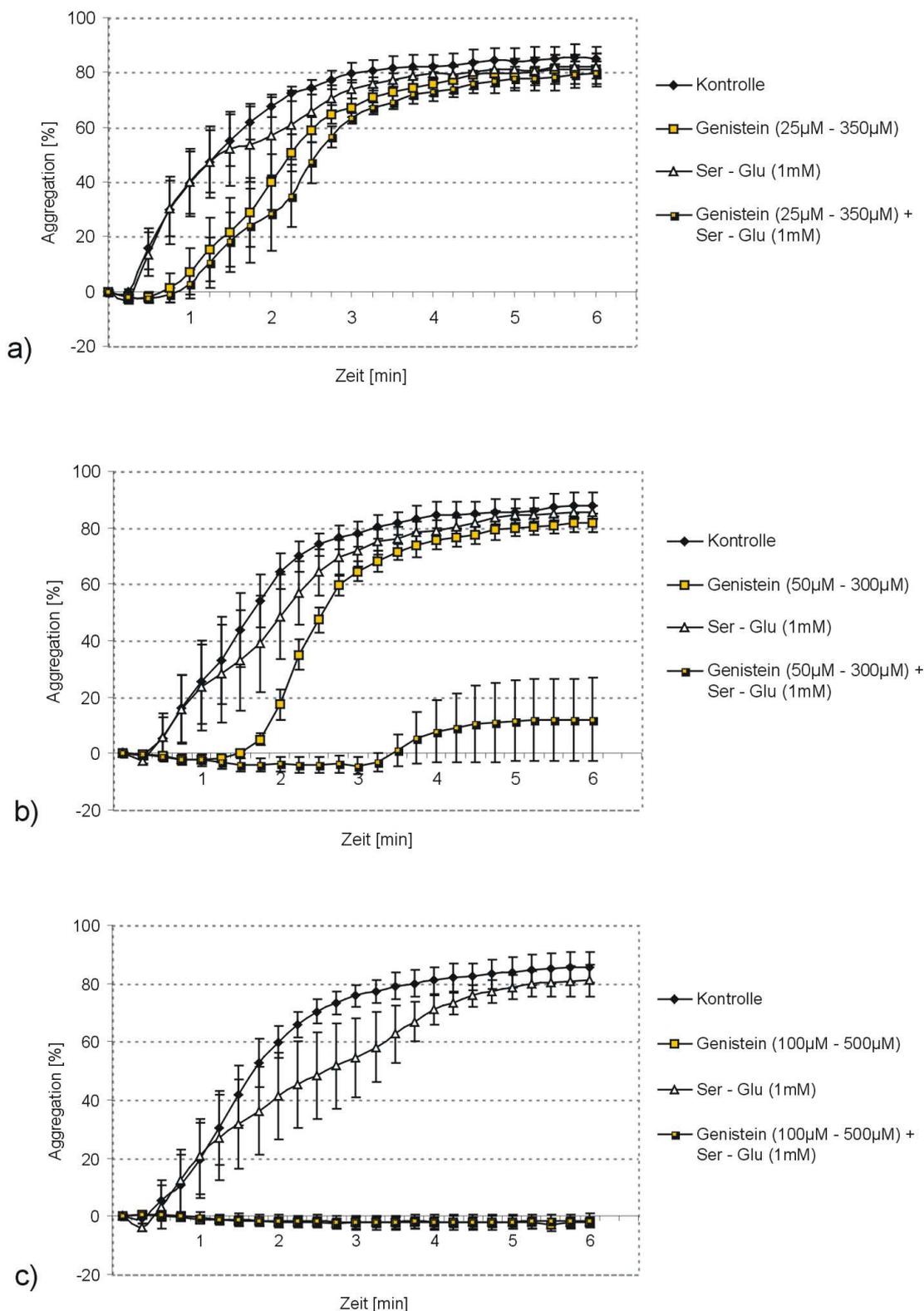


Abbildung 38. Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Serin-Glutamat auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischem Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.

Dargestellt wurden Wechselwirkungen zwischen Genistein („niedriger“, „mittlerer“, „hoher“ Konzentrationsbereich) und 1 mM Serin-Glutamat (Ser-Glu) als Gemische im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den jeweiligen Einzelsubstanzen.

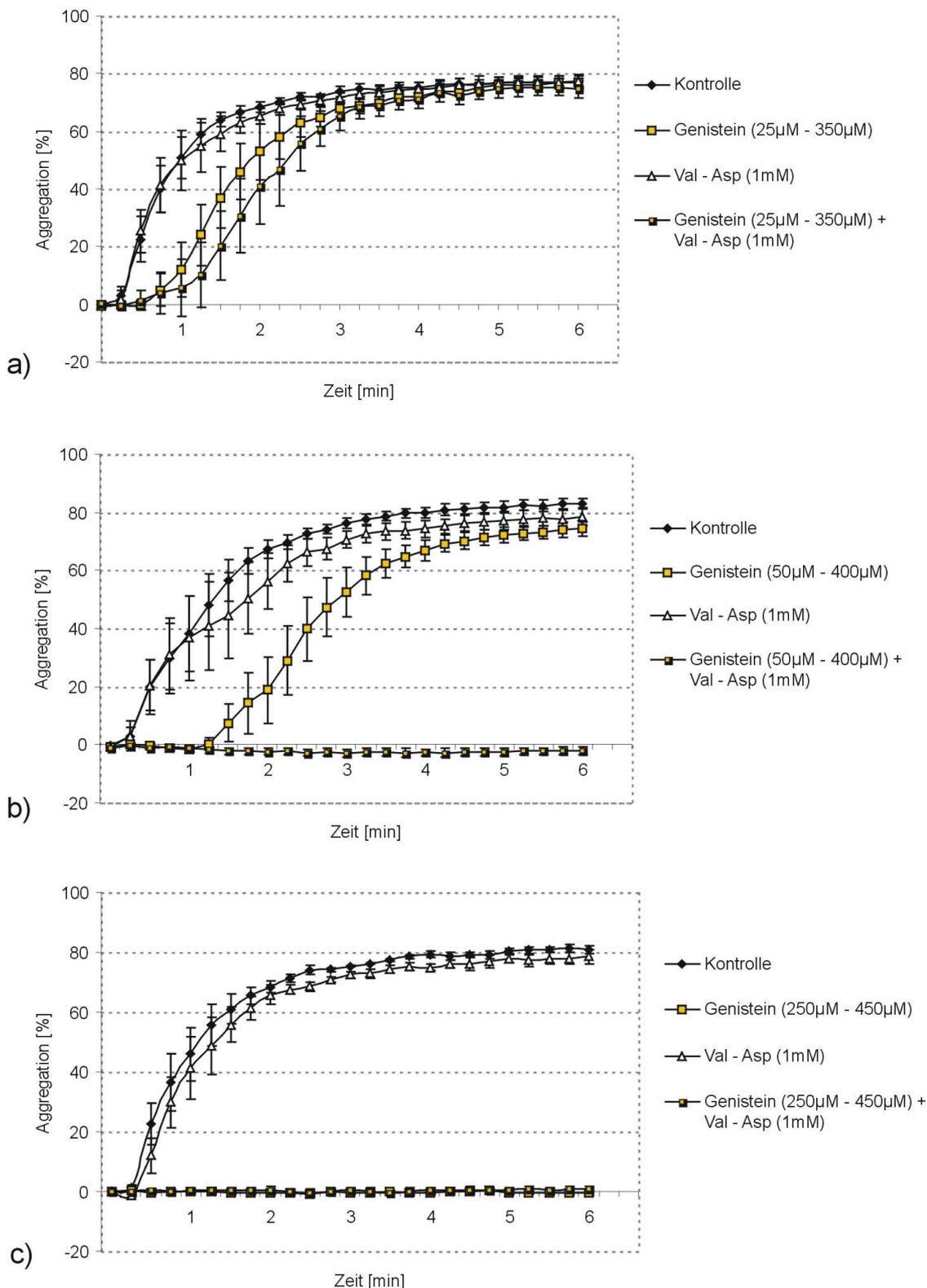


Abbildung 39. Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Valin-Aspartat auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischem Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.

Dargestellt wurden Wechselwirkungen zwischen Genistein („niedriger“, „mittlerer“, „hoher“ Konzentrationsbereich) und 1 mM Valin-Aspartat (Val-Asp) als Gemische im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den jeweiligen Einzelsubstanzen.

4.4.3 Untersuchungen zu potenziellen Wechselwirkungen zwischen Tripeptiden und dem Isoflavon Genistein

Folgende Tripeptide wurden getestet: Glutamat-Glutamat-Glutamat (Glu-Glu-Glu), Aspartat-Aspartat-Aspartat (Asp-Asp-Asp), Leucin-Leucin-Leucin (Leu-Leu-Leu), Valin-Prolin-Leucin (Val-Pro-Leu), Lysin-Lysin-Lysin (Lys-Lys-Lys).

4.4.3.1 ADP-induzierte Thrombozytenaggregation

Synergistische Steigerungen der durch Genistein hervorgerufenen Hemmungen der ADP-abhängigen Thrombozytenaggregation konnten bei den Tripeptiden Asp-Asp-Asp, Lys-Lys-Lys und Val-Pro-Leu festgestellt werden (Anhang, Tabelle 38).

Die durchschnittliche Aggregation in Gegenwart des Genisteins und 1 mM Asp-Asp-Asp lag bei $33,9 \pm 6,1$ % ($n = 5$). Sie war damit deutlich niedriger als bei Zugabe von entweder 250 μ M Genistein ($55,9 \pm 10,6$ %; $n = 59$, Gemisch vs. Genistein: $p = 0,000$) oder von 1 mM Tripeptid ($65,8 \pm 7,3$ %, $n = 5$, Gemisch vs. Asp-Asp-Asp: $p = 0,008$; Abbildung 40a, S. 90).

Bei einem Gemisch aus Lys-Lys-Lys und Genistein betrug die Aggregation $41,9 \pm 7,9$ % ($n = 6$) und lag damit unterhalb derjenigen, die bei Zugabe von 250 μ M Genistein ($56,5 \pm 11,7$ %, $n = 54$, Gemisch vs. Genistein: $p = 0,003$) bzw. von 1 mM Lys-Lys-Lys ($63,8 \pm 9,3$ %, $n = 6$, Gemisch vs. Lys-Lys-Lys: $p = 0,009$) gemessen wurden (Abbildung 40b, S. 90).

Gleichartige Ergebnisse ergaben Analysen mit dem Tripeptid Val-Pro-Leu (Gemisch: $43,5 \pm 4,4$ %, $n = 5$, 250 μ M Genistein: $55,9 \pm 10,6$ %, $n = 59$, Gemisch vs. Genistein: $p = 0,002$; Val-Pro-Leu: $69,7 \pm 13,5$ %, $n = 5$, Gemisch vs. Val-Pro-Leu: $p = 0,032$; Abbildung 40c, S. 90).

4.4.3.2 Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation

Bezüglich der durch Adrenalin induzierten Thrombozytenaggregation konnten keine Tripeptide identifiziert werden, die zusammen mit Genistein synergistisch die Aggregation der Thrombozyten hemmten (Anhang, Tabelle 41).

4.4.3.3 Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation

Bei Untersuchungen zur synergistischen Verstärkung der genisteinabhängigen Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation waren die Tripeptide Glu-Glu-Glu und Asp-Asp-Asp wirksam (Abbildung 41, S. 90, Anhang, Tabelle 44).

Bei dem Tripeptid Glu-Glu-Glu (1 mM) wurde eine synergistische Wechselwirkung mit 250 μ M Genistein festgestellt (Gemisch vs. Genistein: $p = 0,007$, Gemisch vs. Glu-Glu-Glu: $p = 0,007$). Demnach kam das Gemisch auf eine Aggregation von $40,3 \pm 23,4$ % ($n = 8$), Genistein auf $63,7 \pm 12,1$ % ($n = 55$) und Glu-Glu-Glu alleine auf $71,9 \pm 13,1$ % ($n = 8$; Abbildung 41a, S. 91).

Asp-Asp-Asp konnte in 1 mM Konzentration ebenfalls die durch Genistein hervorgerufene Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation verstärken (Gemisch vs. Genistein: $p = 0,010$; Gemisch vs. Asp-Asp-Asp: $p = 0,008$). Die Aggregation des Gemisches belief sich auf $39,4 \pm 22,5 \%$ ($n = 5$), wohingegen Genistein alleine auf eine Aggregation von $63,7 \pm 12,1 \%$ ($n = 55$) und Asp-Asp-Asp auf $72,7 \pm 4,2 \%$ ($n = 5$; Abbildung 41b, S. 91) kam.

4.4.3.4 *Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation*

Das Tripeptid Glu-Glu-Glu verstärkte die genisteinabhängige Hemmung der durch Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation am wirksamsten. In allen getesteten Konzentrationen (1 mM, Abbildung 42a-c, S. 92; 1 μ M, Abbildung 43a-c, S. 93; 1 nM, Abbildung 44a-c, S. 94) traten synergistische Wechselwirkungen zwischen Genistein und dem Tripeptid auf. Dieser Befund wurde bei keinem anderen Peptid und keiner Aminosäure erhoben.

Synergistische Wechselwirkungen zwischen Genistein und dem Tripeptid Glu-Glu-Glu (1mM, Abbildung 42a-c) traten bei 50 μ M bis 300 μ M Genistein („mittleres“ Genistein) auf (Gemisch vs. Genistein: $p = 0,000$, Gemisch vs. Glu-Glu-Glu: $p = 0,000$; Anhang, Tabelle 48, Tabelle 49). Keine Effekte wurden bei Konzentrationen von 100 μ M bis 270 μ M („niedriges“ Genistein) beobachtet (Gemisch vs. Genistein: $p = 0,029$, Gemisch vs. Glu-Glu-Glu: $p = 0,057$). In einem Genisteinkonzentrationsbereich von 250 μ M bis 400 μ M („hohes“ Genistein) unterschieden sich die durch Genistein und das Gemisch hervorgerufenen Hemmungen der Aggregationen nicht voneinander (Gemisch vs. Genistein: $p = 0,690$, Gemisch vs. Glu-Glu-Glu: $p = 0,068$).

Glu-Glu-Glu (1 μ M, Abbildung 43a-c) verstärkte in einem Genisteinkonzentrationsbereich von 150 μ M bis 350 μ M („niedriges“ Genistein) die Arachidonsäure-induzierte Aggregation nicht (Gemisch vs. Genistein: $p = 0,383$, Gemisch vs. Glu-Glu-Glu: $p = 0,074$; Anhang, Tabelle 48, Tabelle 49). Dagegen traten synergistische Wechselwirkungen in einem Konzentrationsbereich von 200 μ M bis 400 μ M („mittleres“ Genistein) auf (Gemisch vs. Genistein: $p = 0,001$, Gemisch vs. Glu-Glu-Glu: $p = 0,001$). In einem Bereich von 275 μ M bis 450 μ M („hohes“ Genistein) hemmte Genistein allein die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation vollständig (Gemisch vs. Genistein: $p = 0,548$, Gemisch vs. Glu-Glu-Glu: $p = 0,008$).

Weitere Analysen wurden mit 1 nM Glu-Glu-Glu durchgeführt. Von 7 Versuchen erwiesen sich 4 als positiv. Kein anderes Peptid war in 1mM, 1 μ M und 1nM synergistisch mit Genistein wirksam (Abbildung 44a-c; Keine Hemmung durch Genistein: Gemisch vs. Genistein: $p = 0,589$, Gemisch vs. Glu-Glu-Glu: $p = 0,240$; synergistischer Effekt: Gemisch vs. Genistein: $p = 0,008$, Gemisch vs. Glu-Glu-Glu: $p = 0,008$; Vollhemmung durch Genistein: Gemisch vs. Genistein: $p = 0,791$, Gemisch vs. Glu-Glu-Glu: $p = 0,000$; Anhang, Tabelle 48,

Tabelle 49).

Das Tripeptid Asp-Asp-Asp wirkte ebenfalls synergistisch mit Genistein auf die Arachidonsäure-induzierte Aggregation. Diese Wechselwirkungen wurden mit 1 mM Asp-Asp-Asp (Abbildung 45a-c, S. 95; Anhang, Tabelle 48, Tabelle 49) und 1 µM Asp-Asp-Asp beobachtet (Abbildung 46a-c, S. 96; Anhang, Tabelle 48, Tabelle 49).

Insgesamt wurden in Abhängigkeit des Agonisten folgende Verbindungen identifiziert, die mit Genistein synergistische Wechselwirkungen auf die Thrombozytenfunktion hervorriefen: In der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation wurden die Dipeptide Glu-Glu, Asp-Glu, Glu-Asp und die Tripeptide Lys-Lys-Lys, Val-Pro-Leu sowie Asp-Asp-Asp identifiziert. Glu modulierte zusammen mit Genistein die Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation und Asn, Glu-Glu, Glu-Asp, Glu-Glu-Glu und Asp-Asp-Asp die Kollagen-induzierte Aggregation. Hemmende Effekte wurden ebenfalls in der Arachidonsäure-induzierten Aggregation beobachtet. In Abhängigkeit inter-individueller Genisteinkonzentrationen waren Glu, Glu-Glu, Asp-Glu, Asp-Asp, Ser-Glu und Val-Asp sowie Glu-Glu-Glu und Asp-Asp-Asp wirksam. Diese Effekte wurden mit Peptid-, bzw. Aminosäurekonzentrationen von 1 mM bei allen Agonisten hervorgerufen, wohingegen bei der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregationen in Abhängigkeit vom Peptid zusätzliche Effekte bei 1 µM bzw. 1 nM nachgewiesen wurden (Tabelle 21, bzw. Tabelle 31 S. 131).

Tabelle 21. Synergistische Wechselwirkungen unterschiedlicher Substanzen mit Genistein auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen

Verbindung	ADP	Adrenalin	Kollagen	Arachidonsäure ¹⁾
Asn			+	
Glu				+
Glu-Glu	+		+	+, ++
Asp-Glu	+			+, ++
Asp-Asp				+
Glu-Asp	+	+	+	
Ser-Glu				+
Val-Asp				+
Glu-Glu-Glu			+	+, ++, +++
Lys-Lys-Lys	+			
Val-Pro-Leu	+			
Asp-Asp-Asp	+		+	+, ++

Synergistisch mit 250 µM Genistein wirkende Verbindungen in unterschiedlichen Konzentrationen (+ 1 mM, ++ 1 µM, +++ 1 nM) auf die ADP, Adrenalin, Kollagen und Arachidonsäure induzierten Thrombozytenaggregationen, Signifikanz $p < 0,05$. ¹⁾Die Darstellung synergistischer Wechselwirkungen erfolgte bei der Arachidonsäure als Agonist bei variablen Genisteinkonzentrationen.

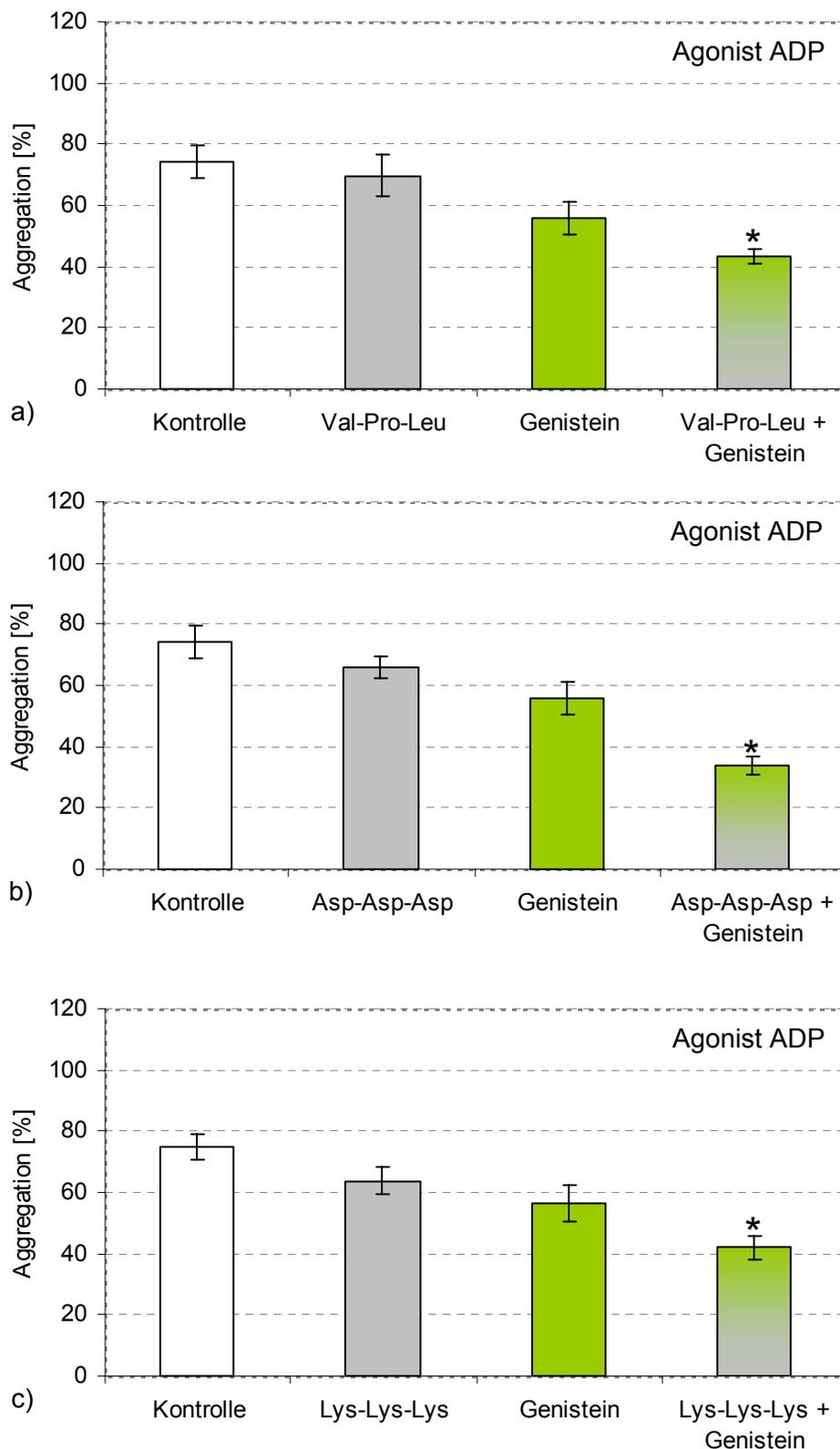


Abbildung 40. Darstellung der synergistischen Wechselwirkungen zwischen Genistein und Tripeptiden auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) Valin-Prolin-Leucin, b) Aspartat-Aspartat-Aspartat und c) Lysin-Lysin-Lysin als Tripeptide.

Dargestellt wurden synergistische Wechselwirkungen zwischen 250 μ M Genistein und a) 1 mM Valin-Prolin-Leucin (Val-Pro-Leu), b) 1 mM Aspartat-Aspartat-Aspartat (Asp-Asp-Asp) und c) 1 mM Lysin-Lysin-Lysin (Lys-Lys-Lys) als Gemisch (250 μ M Genistein + 1 mM Tripeptid) im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den jeweiligen Einzelsubstanzen. * Signifikanz $p < 0,05$ (Gemisch vs. Genistein, Gemisch vs. Kontrolle)

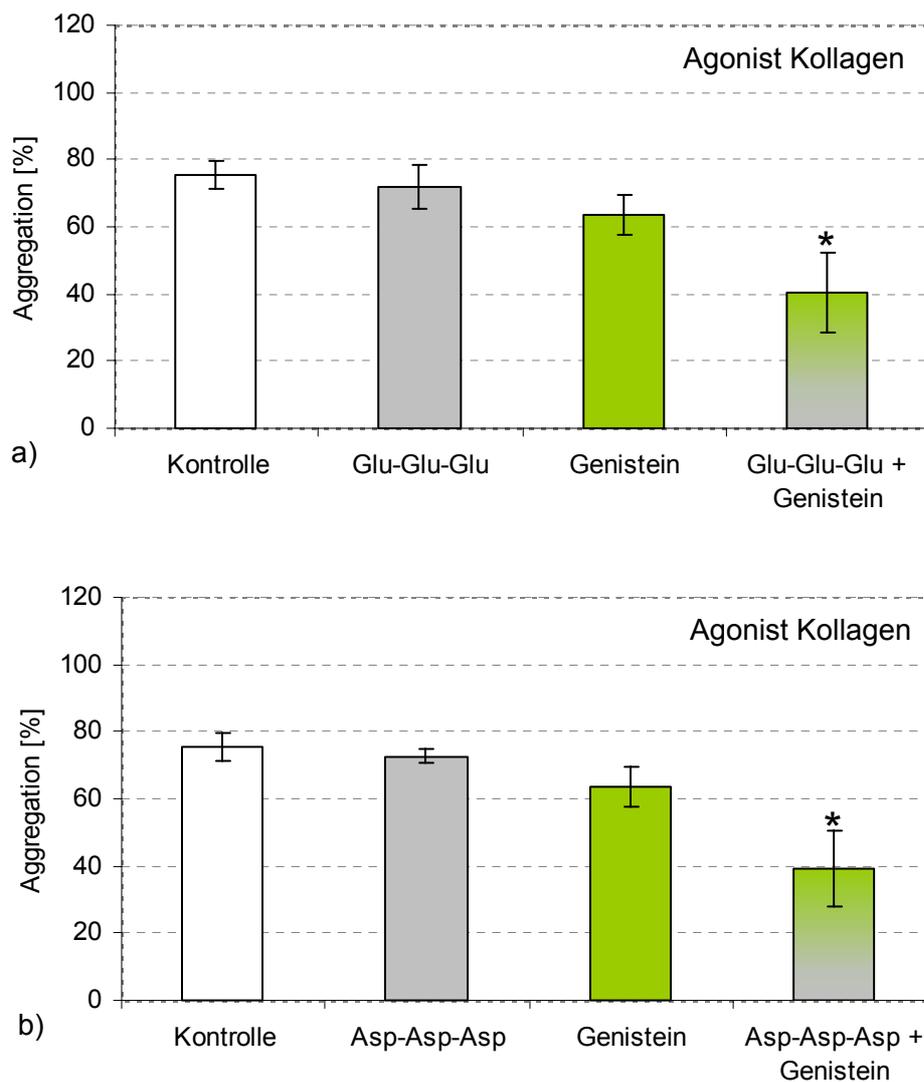


Abbildung 41. Darstellung der synergistischen Wechselwirkungen zwischen Genistein und Tripeptiden auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation mit a) Glutamat-Glutamat-Glutamat und b) Aspartat-Aspartat-Aspartat als Tripeptide.

Dargestellt wurden synergistische Wechselwirkungen zwischen 250 μ M Genistein und a) 1 mM Glutamat-Glutamat-Glutamat (Glu-Glu-Glu) und b) 1 mM Aspartat-Aspartat-Aspartat (Asp-Asp-Asp) als Gemisch (250 μ M Genistein + 1 mM Tripeptid) im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den jeweiligen Einzelsubstanzen. * Signifikanz $p < 0,05$ (Gemisch vs. Genistein, Gemisch vs. Kontrolle)

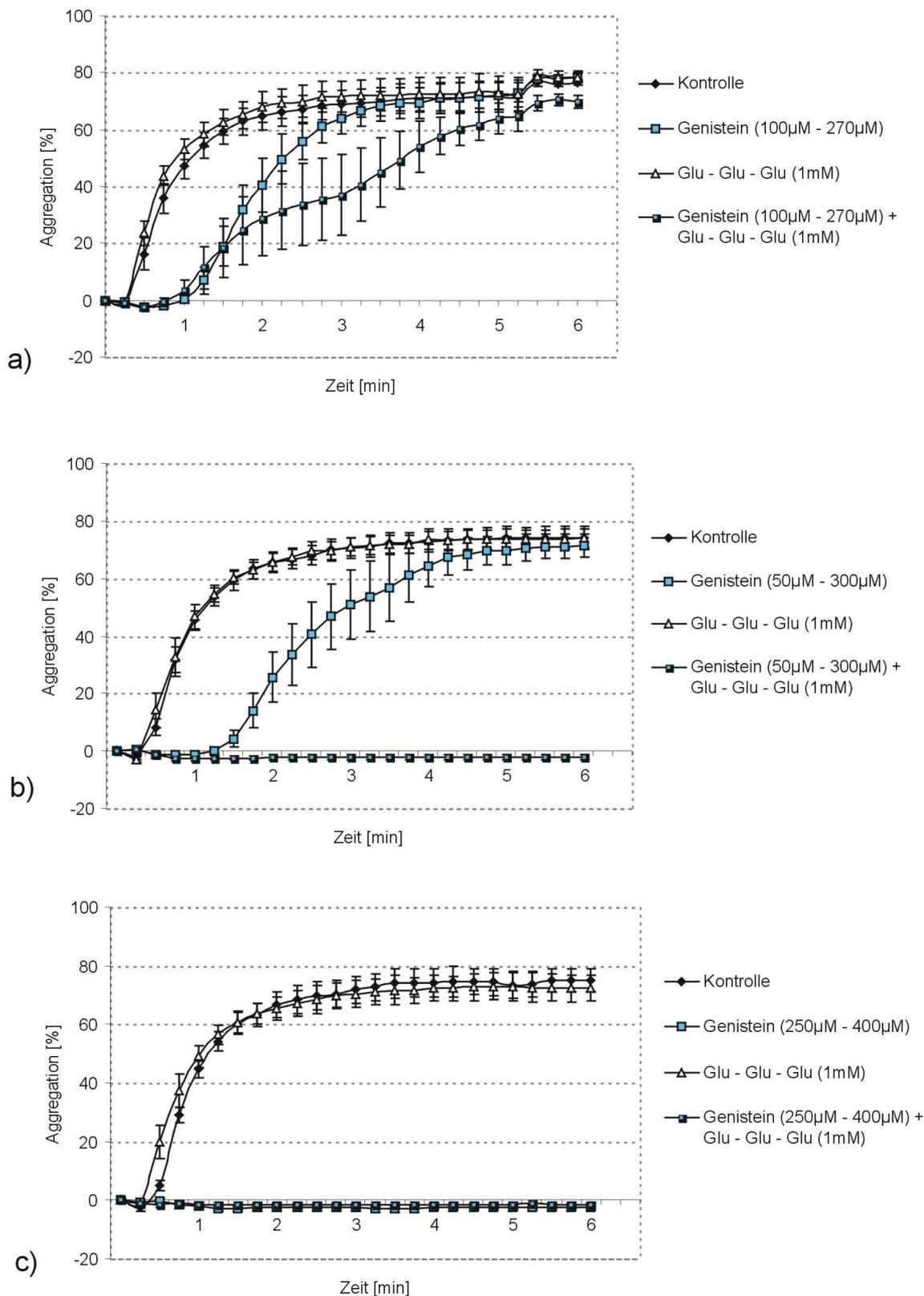


Abbildung 42. Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Glutamat-Glutamat-Glutamat in der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.

Dargestellt wurden die Wechselwirkungen zwischen Genistein („niedriger“, „mittlerer“, „hoher“ Konzentrationsbereich) und 1 mM Glutamat-Glutamat-Glutamat (Glu-Glu-Glu) als Gemische im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den jeweiligen Einzelsubstanzen.

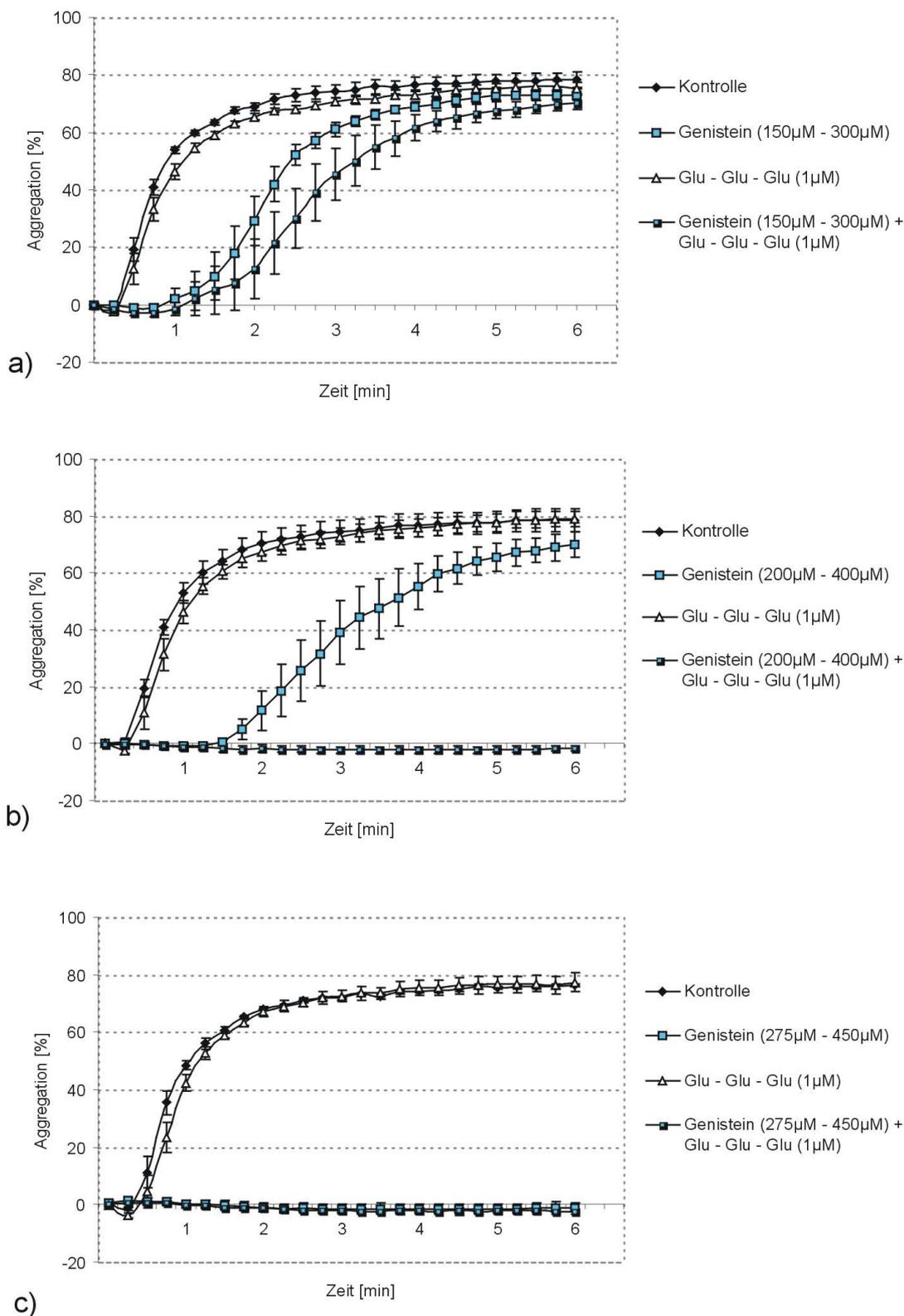


Abbildung 43. Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Glutamat-Glutamat-Glutamat in der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.

Dargestellt wurden die Wechselwirkungen zwischen Genistein („niedriger“, „mittlerer“, „hoher“ Konzentrationsbereich) und 1 µM Glutamat-Glutamat-Glutamat (Glu-Glu-Glu) als Gemische im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den jeweiligen Einzelsubstanzen.

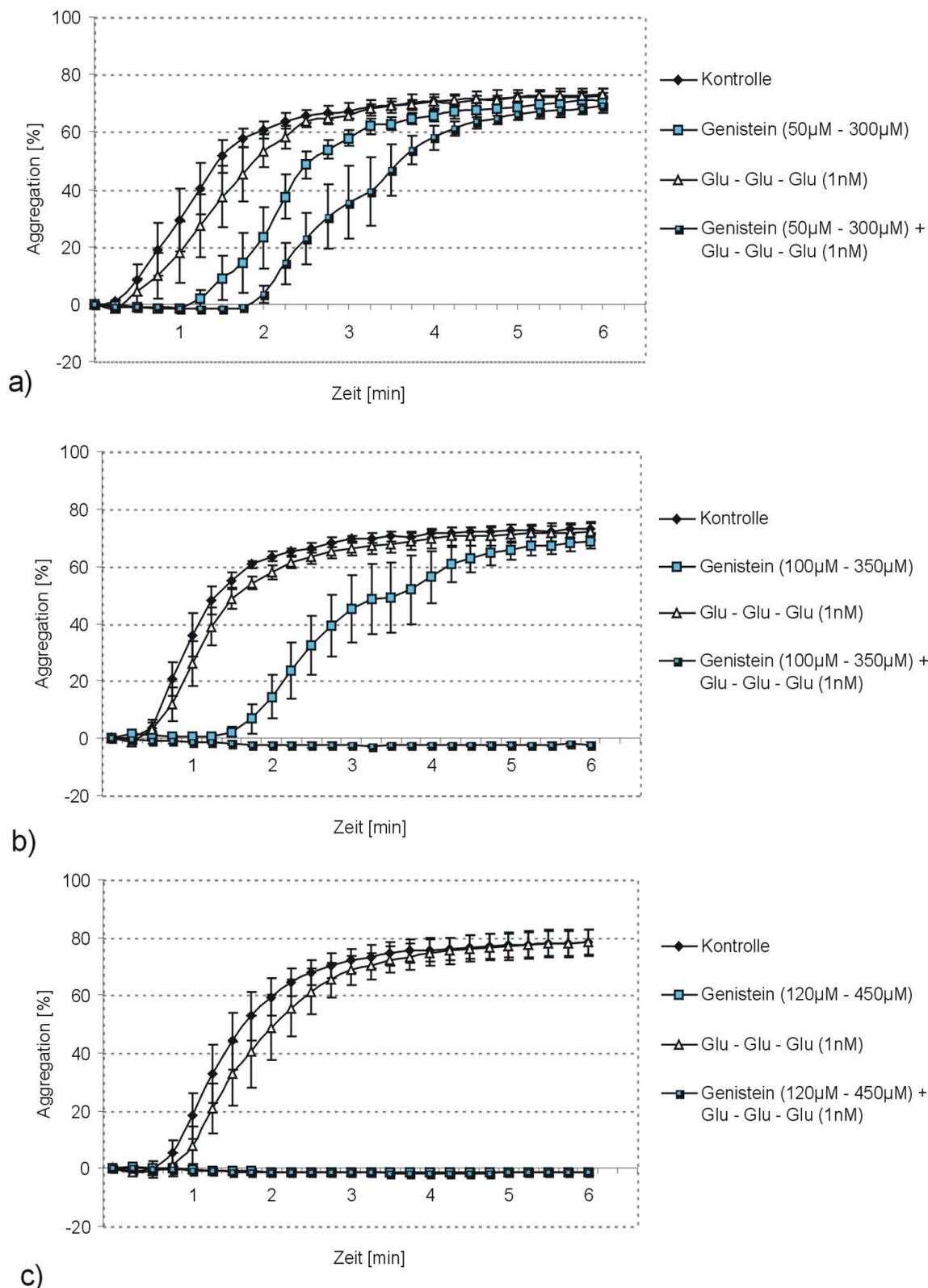


Abbildung 44. Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Glutamat-Glutamat-Glutamat in der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine. Dargestellt wurden die Wechselwirkungen zwischen Genistein („niedriger“, „mittlerer“, „hoher“ Konzentrationsbereich) und 1 nM Glutamat-Glutamat-Glutamat (Glu-Glu-Glu) als Gemische im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den jeweiligen Einzelsubstanzen.

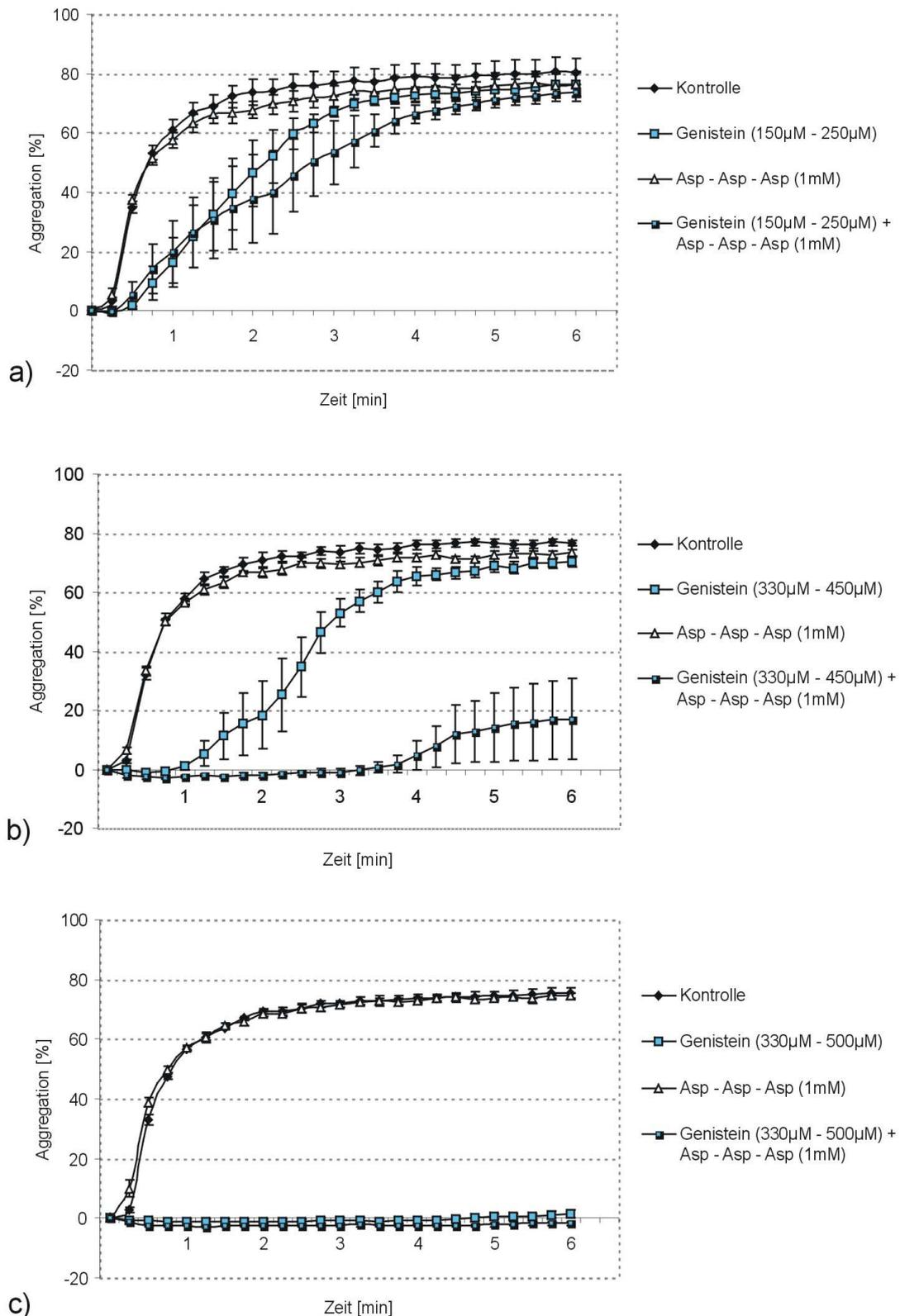


Abbildung 45. Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Aspartat-Aspartat-Aspartat in der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine. Dargestellt wurden die Wechselwirkungen zwischen Genistein („niedriger“, „mittlerer“, „hoher“ Konzentrationsbereich) und 1 mM Aspartat-Aspartat-Aspartat (Asp-Asp-Asp) als Gemische im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den jeweiligen Einzelsubstanzen.

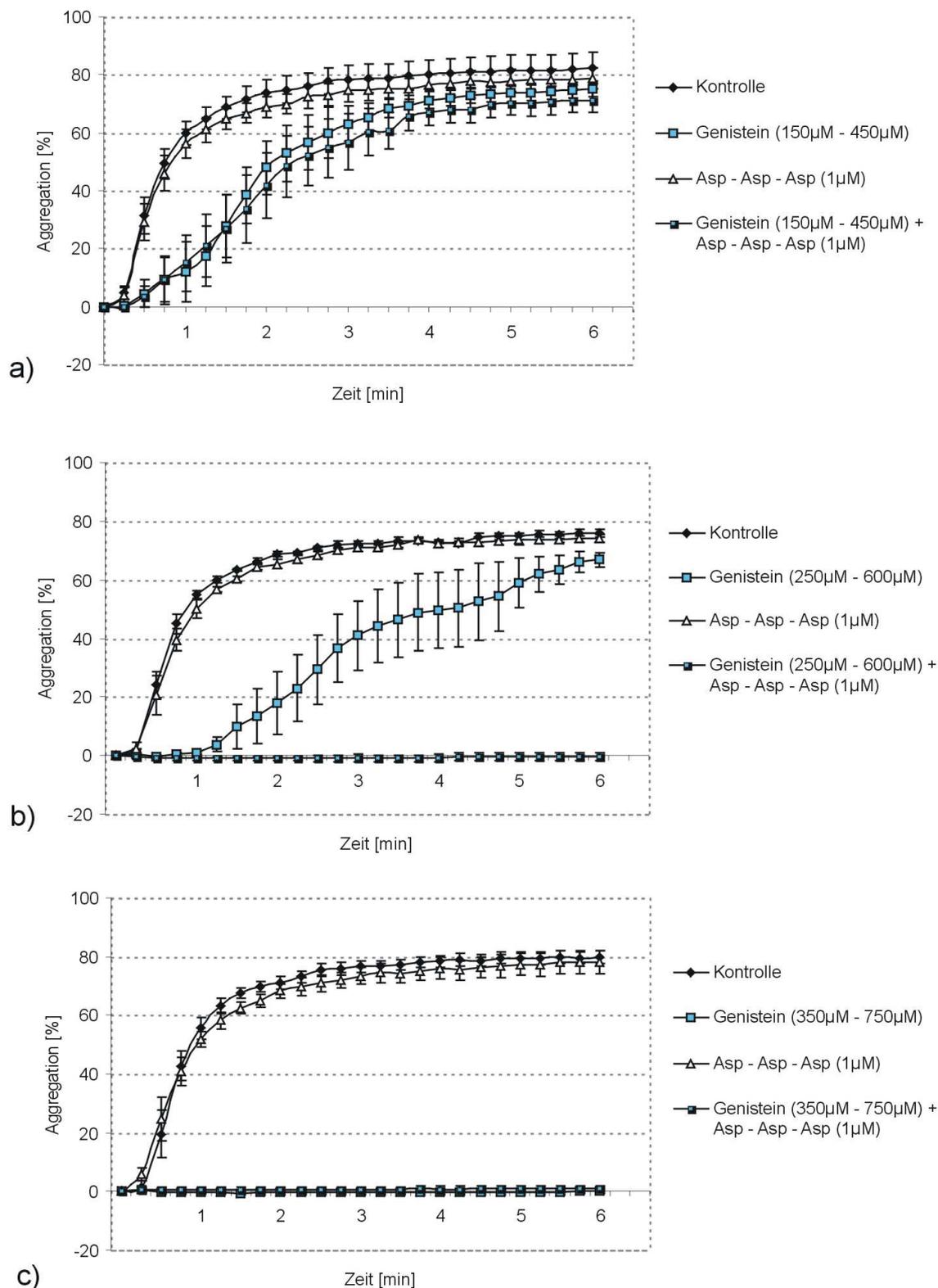


Abbildung 46. Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Genistein und Aspartat-Aspartat-Aspartat in der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation mit a) keinem synergistischen Effekt, b) synergistischem Effekt und c) Volleffekt durch Genistein alleine.

Dargestellt wurden die Wechselwirkungen zwischen Genistein („niedriger“, „mittlerer“, „hoher“ Konzentrationsbereich) und 1 µM Aspartat-Aspartat-Aspartat (Asp-Asp-Asp) als Gemische im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den jeweiligen Einzelsubstanzen.

4.5 Testsubstanzen in der aggregometrischen Analyse bei herzkranken Patienten

Neben gesunden Probanden wurden aggregometrische Messungen, sofern möglich, auch bei herzkranken Patienten durchgeführt. Bei der überwiegenden Zahl der herzkranken Patienten war eine aggregometrische Analyse auf Grund der lebensnotwendigen Medikation nicht möglich. Deshalb konnten nur ausgewählte Peptide, die sich bei Gesunden als wirksam erwiesen, auch an herzkranken Personen getestet werden. Dazu wurden Versuche mit dem Dipeptid Glu-Glu und mit dem Tripeptid Glu-Glu-Glu durchgeführt. Untersuchungen zu möglichen Wirkungen der Peptide auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation war in den meisten Fällen nicht möglich, da die Medikamente die Arachidonsäure-abhängigen Signalkaskaden beeinflussten. Bei der übrig gebliebenen kleinen Population konnte nur der Einfluss von Glu-Glu alleine auf die Arachidonsäure-induzierte Blutplättchenaggregation analysiert werden.

4.5.1 Untersuchungen der Testsubstanzen auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen bei herzkranken Patienten

4.5.1.1 *Dipeptid Glu-Glu und Tripeptid Glu-Glu-Glu*

Beide Peptide in einer Konzentration von 1 mM hatten keinen Einfluss auf die Agonisten-induzierten Aggregationen der Thrombozyten (Anhang, Tabelle 50).

4.5.1.2 *Genistein*

Genistein hemmte in einer Konzentration von 250 μ M alle Agonisten-induzierten Aggregationen der Thrombozyten (Abbildung 47, S. 98; ADP als Agonist: Genistein vs. Kontrolle: $p = 0,000$; Adrenalin als Agonist: Genistein vs. Kontrolle: $p = 0,000$; Kollagen als Agonist: $p = 0,000$; Arachidonsäure als Agonist: $p = 0,029$; Anhang, Tabelle 50).

Die ebenfalls bei den gesunden Probanden nachgewiesenen Hemmeffekte durch 250 μ M Genistein konnten auch an Thrombozyten herzkranker Patienten beobachtet werden. Genistein hemmte damit die Aggregationen nicht nur von gesunden Probanden, sondern auch von herzkranken Patienten.

4.5.2 Untersuchungen zu potenziellen Wechselwirkungen zwischen den Testsubstanzen auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen bei herzkranken Patienten

Auf Grund der geringen Patientenzahl konnten keine vergleichbar umfassenden Untersuchungen wie bei gesunden Probanden zum potenziellen Synergismus zwischen Genistein und Peptiden vorgenommen werden. Aus diesem Grund wurden die Peptide Glu-Glu und Glu-Glu-Glu ausgewählt und hinsichtlich ihrer potenziellen Wirkungen auf die genisteinabhängige Wirkung der durch ADP, Adrenalin und Kollagen induzierten Thrombozytenaggregationen untersucht. Bezüglich der Arachidonsäure-induzierten Aggregation wurden keine Tests mit variablen Genisteinkonzentrationen durchgeführt.

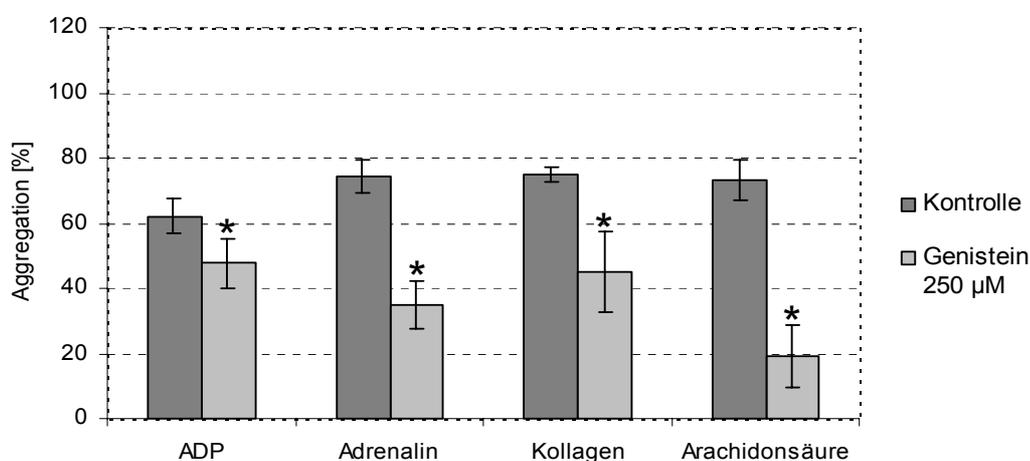


Abbildung 47. Wirkung des Genisteins auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen herzkranker Patienten mit ADP, Adrenalin, Kollagen und Arachidonsäure als Agonisten. Dargestellt wurden die durchschnittlichen Aggregationen der mit 250 µM Genistein inkubierten Plasmen herzkranker Patienten. *Signifikanz $p < 0,05$ (vs. Kontrolle)

4.5.2.1 ADP-induzierte Thrombozytenaggregation

In der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation wurden keine synergistische Wechselwirkungen zwischen 1 mM Glu-Glu bzw. 1 mM Glu-Glu-Glu und 250 µM Genistein festgestellt (Anhang, Tabelle 50).

4.5.2.2 Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation

Das Gemisch aus 1 mM Glu-Glu und 250 µM Genistein zeigte synergistische Wechselwirkungen auf die Adrenalin-induzierte Aggregation der Blutplättchen (Gemisch vs. Genistein $p = 0,008$; Gemisch vs. Glu-Glu $p = 0,000$; Abbildung 48 a, S. 100; Anhang Tabelle 50). Die Aggregation des Gemisches betrug $17,4 \pm 12,4$ % ($n = 10$) und hemmte die Thrombozyten

damit jeweils stärker als Genistein ($34,9 \pm 14,4 \%$, $n = 15$) bzw. das Dipeptid alleine ($70,1 \pm 10,6 \%$, $n = 10$).

Auch Glu-Glu-Glu (1 mM) zeigte mit Genistein synergistische Wechselwirkungen (Gemisch vs. Genistein $p = 0,006$, Gemisch vs. Glu-Glu-Glu $p = 0,008$; Abbildung 48b, S. 100). So betrug die Aggregation $20,8 \pm 8,4 \%$ ($n = 5$). 250 μ M Genistein bewirkte eine Aggregation der Thrombozyten von $34,9 \pm 14,4 \%$ ($n = 15$) und das Tripeptid eine von $65,2 \pm 10,9 \%$ ($n = 5$).

4.5.2.3 *Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation*

In der durch Kollagen-induzierten Aggregation zeigte sich das Gemisch aus Glu-Glu und Genistein als nicht wirksam, jedoch konnten synergistische Effekte durch Glu-Glu-Glu zusammen mit Genistein auf die Kollagen-induzierte Aggregation identifiziert werden (Gemisch vs. Genistein $p = 0,018$, Gemisch vs. Glu-Glu-Glu $p = 0,046$; Abbildung 48c, S. 100; Anhang Tabelle 50). Die Aggregation des Gemisches betrug $14,0 \pm 6,8 \%$ ($n = 3$), die des Genisteins $44,9 \pm 24,0 \%$ ($n = 14$) und die des Tripeptids $72,5 \pm 2,1 \%$ ($n = 3$).

4.6 **Thrombozytärer Aktivierungszustand von gesunden Probanden und herzkranken Patienten anhand durchflusszytometrischer Untersuchungen**

Vollblutproben von gesunden Probanden und Patienten mit Vorhofflimmern und/oder KHK wurden mit ausgewählten Antikörpern markiert und der Anteil der positiv markierten Thrombozyten zur Auswertung herangezogen. Folgende Antikörper wurden für die durchflusszytometrische Analyse benutzt: CD 41PE/CD 45FITC, CD 62PE/PAC-1FITC/CD 41PerCP und CD 62PE. Die Daten der einzelnen Patientengruppen sind in der Tabelle 22 (S. 101) dargestellt.

4.6.1 **CD 62PE**

Durchschnittliche waren $72,8 \pm 9,1\%$ der Thrombozyten gesunder Probanden (bezogen auf 5000 *Gated Events*) nach Aktivierung CD 62PE ($n = 35$) positiv markiert (Tabelle 22, S. 101). Die Untersuchungen der Patientengruppen KHK, VHF und KHK+VHF ergaben eine CD 62-Markierung von $72,3 \pm 10,3 \%$ ($n = 36$), sodass keine Unterschiede zwischen Patienten und Probanden feststellbar waren (Tabelle 22, S. 101; KHK vs. Probanden: $p = 0,421$; VHF vs. Probanden: $p = 0,613$; KHK+VHF vs. Probanden: $p = 0,866$; KHK vs. VHF: $p = 0,281$; KHK vs. KHK+VHF: $p = 0,469$; VHF vs. KHK+VHF $p = 0,798$).

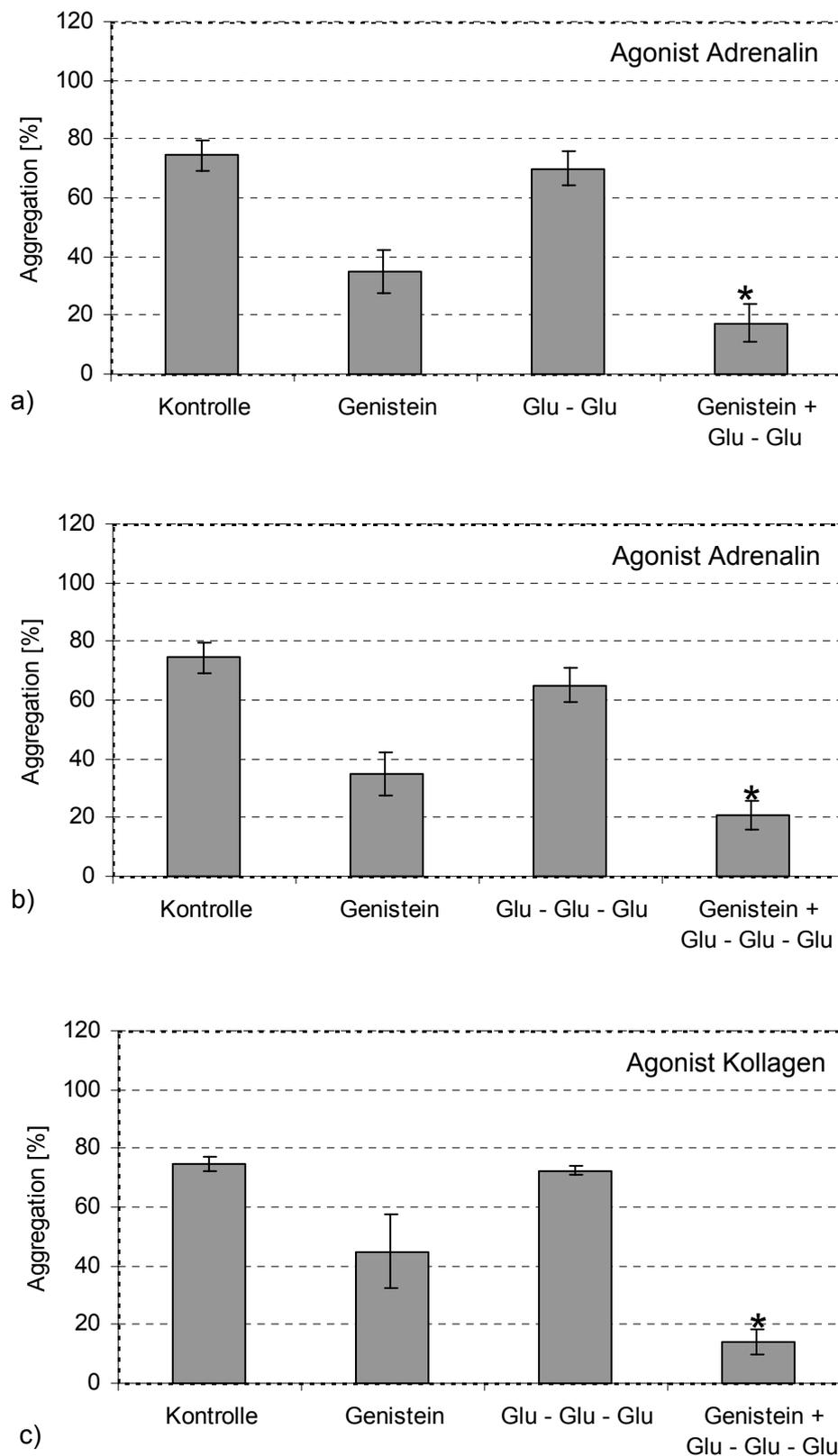


Abbildung 48. Darstellung der synergistischen Wechselwirkungen bei herzkranken Patienten zwischen Genistein und Peptiden in den Adrenalin- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregationen mit Glutamat-Glutamat (a) und Glutamat-Glutamat-Glutamat (b, c) als Peptide. Dargestellt wurden synergistische Wechselwirkungen zwischen 250 μ M Genistein und 1 mM Glu-Glu (a) sowie 1 mM Glu-Glu-Glu (b,c) als Gemisch (250 μ M Genistein + 1 mM Peptid). *Signifikanz $p < 0,05$ (Gemisch vs. Genistein, Gemisch vs. Peptid)

4.6.2 CD 41PE/CD 45FITC

Berechnet wurden die prozentualen Anteile der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate, die sich dadurch auszeichneten, dass die markierten Thrombozyten sowohl CD 41 als auch CD 45 trugen. Dies war bei $7,9 \pm 3,2 \%$ ($n = 35$) der Thrombozyten von Probanden (bezogen auf 5000 *Gated Events*) der Fall. Unterschiede zu den Patientengruppen KHK, VHF, KHK+VHF ($8,1 \pm 3,4 \%$ ($n = 36$)) konnten nicht festgestellt werden (KHK vs. Probanden: $p = 0,581$; VHF vs. Probanden: $p = 0,124$; KHK vs. KHK+VHF: $p = 0,438$; VHF vs. KHK+VHF $p = 0,743$; Tabelle 22).

4.6.3 CD 41PerCP/PAC-1FITC/CD 62PE

Der Anteil der dreifachmarkierten, d.h. aktivierten Thrombozyten der Probanden lag bei $28,3 \pm 13,2 \%$ ($n = 31$, Tabelle 22) und die der gesamten Patienten bei $36,9 \pm 23,5 \%$ ($n = 31$). Nach Differenzierung der Patienten nach Krankheitsbildern fand sich ein Unterschied zwischen Probanden und Patienten mit VHF (VHF vs. Probanden: $p = 0,012$). Die Patienten dieser Gruppe wiesen eine durchschnittliche Antikörpermarkierung von $49,7 \pm 24,3 \%$ ($n = 9$) auf und waren damit deutlich stärker aktivierbar, als diejenigen von gesunden Probanden. Ferner war ein Unterschied zwischen Patienten mit VHF und Patienten mit diagnostizierter KHK feststellbar (VHF vs. KHK: $p = 0,037$). Der Anteil der dreifachmarkierten, positiven Thrombozyten der VHF-Patienten lag bei $49,7 \pm 24,3 \%$ ($n = 9$) und die der KHK-Patienten bei $28,5 \pm 19,9 \%$ ($n = 16$). Diese waren somit stärker durch ADP aktivierbar als die Thrombozyten von KHK- Patienten ($28,5 \pm 19,9 \%$, $n = 16$).

Tabelle 22. Anteil positiv markierter Thrombozyten bei gesunden Probanden und herzkranken Patienten mit CD 62PE, CD 41PE/CD 45FITC und CD 62 PE/PAC-1 FITC/ CD 41PerCP als Marker.

		Anteil positiv markierter Thrombozyten [%]		
		CD 62	CD 41/CD 45	CD 62/PAC-1/CD 41
Probanden		72,8±9,1	7,9±3,2	28,3±13,2
Patienten				
	KHK	70,9±11,4	7,2±2,7	28,5±19,9
	VHF	75,6±5,3	9,5±2,6	49,7±24,3
	KHK + VHF	72,8±10,6	9,0±4,4	40,0±21,5

Durchflusszytometrisch wurden 5000 Thrombozyten von gesunden Probanden und herzkranken Patienten untersucht, die mit ausgewählten Antikörpern markiert wurden. Für die CD 62PE und CD 41PE/CD 45FITC Markierungen wurden 35 Messungen gesunder Probanden und 36 jeweils von herzkranken Patienten durchgeführt (CD 62PE: KHK $n = 20$, VHF $n = 8$, KHK+VHF $n = 8$, CD 41PE/CD 45FITC: KHK $n = 19$, VHF $n = 8$, KHK+VHF $n = 9$). Zur Bestimmung der Dreifachmarkierung wurden 31 Messungen von gesunden Probanden und herzkranken Patienten durchgeführt (KHK $n = 16$, VHF $n = 9$, KHK+VHF $n = 6$).

5 DISKUSSION

Da ernährungsbedingte Erkrankungen, unter anderem auch die Herz-Kreislaufkrankungen weiter zunehmen (WHO, 2002), ist der Bedarf und die Nachfrage nach neuen therapeutischen Ansätzen zur Medikation, Prävention und Aufklärung ernährungsbedingter Erkrankungen groß. Während allerdings zum Beispiel die Beeinflussung des Lipidstoffwechsels durch Nahrungskomponenten vorrangig untersucht wurde (ANDERSON et al., 1995; KIRK et al., 1998; POTTER, 1998; WONG et al., 1998; SETCHELL und CASSIDY, 1999; FRIEDEMANN und BRANDON, 2001), fehlten bisher Studien zur Modulation der Thrombozytenfunktion durch bioaktive Komponenten aus Soja sowohl bei Gesunden als auch bei Herzkranken.

In der aktuellen Studie wurde eine hemmende Wirkung der Peptide Glu-Glu, Val-Asp und Lys-Lys-Lys auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation festgestellt. Val-Asp hemmte ferner die Adrenalin-induzierte Aggregation der Thrombozyten, wohingegen das Tripeptid Leu-Leu-Leu die Kollagen-induzierte Aggregation stimulierte. Auf die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation war weder eine Aminosäure noch ein Di- oder Tripeptid alleine wirksam. Darüber hinaus wurden neben einer thrombozytenhemmenden Wirkung des Isoflavons Genistein synergistische Wechselwirkungen zwischen Genistein und/oder Aminosäuren und Peptiden auf die Aggregation der Thrombozyten nachgewiesen. Dazu wurden folgende Substanzen identifiziert, die die Empfindlichkeit der Thrombozyten für die hemmende Wirkung des Genisteins verstärkten: Glu-Glu, Asp-Glu, Glu-Asp, Lys-Lys-Lys, Val-Pro-Leu, Asp-Asp-Asp auf die ADP-induzierten, Glu-Asp auf die Adrenalin-induzierten, Asn, Glu-Glu, Glu-Asp, Glu-Glu-Glu und Asp-Asp-Asp auf die Kollagen-induzierten und Glu, Glu-Glu, Asp-Glu, Asp-Asp, Ser-Glu, Val-Asp, Glu-Glu-Glu sowie Asp-Asp-Asp auf die Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregationen.

5.1 Methodendiskussion

5.1.1 Probanden- und Patientenkollektiv

Für die aggregometrischen Untersuchungen wurde ein gesundes Probandenkollektiv gewählt, wobei doppelt so viele weibliche als männliche Probanden an der Studie teilnahmen. Das Patientenkollektiv setzte sich dagegen aus vorrangig männlichen und älteren Personen zusammen. In der vorliegenden Studie konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in den Aggregationsverläufen festgestellt werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie stellten EMERY et al. (1995) fest, dass es zwischen gesunden älteren und gesunden jungen Probanden keine altersabhängigen Unterschiede hinsichtlich der Kollagen- und Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregationen gab.

5.1.2 Aggregometrie

In dieser Arbeit wurde die Methode der Aggregometrie gewählt, um die allgemeinen Thrombozytenaggregationen gesunder und herzkranker Patienten anhand eines breiten Spektrums an Agonisten beurteilen zu können. Nicht nur zur Identifizierung angeborener Thrombozytenfunktionsstörungen, sondern auch in zahlreichen Studien, die sich mit der Beurteilung der Thrombozytenfunktion beschäftigen, wurde und wird diese Methode angewandt (EMERY et al., 1995; LIAO et al., 1996; KONDO et al., 2002; BUDDE, 2002; BREDDIN und HARDER, 2003; JESSIE und KRISHNAKANTHA, 2005).

In der vorliegenden Studie konnten mithilfe eines Vier-Kanal-Aggregometers 4 Versuchsansätze gleichzeitig analysiert und ausgewertet werden. So war es möglich, diese Versuchsansätze direkt miteinander zu vergleichen. Eine unkomplizierte Anwendung der Methode machte die Analysen leichter.

In zahlreichen Studien ist die Aggregometrie eine etablierte Methode, um den Funktionszustand von Thrombozyten beurteilen zu können (HESSE et al., 2001; SPANNAGL und CALATZIS, 2002) und ist das am häufigsten verwendete System zur Untersuchung der Plättchenfunktion (BREDDIN und HARDER, 2003).

5.1.3 Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel besaßen keinen Einfluss auf die ADP-, Adrenalin- und Kollagen-induzierten Aggregationen der Thrombozyten. Dimethylsulfoxid (DMSO) ist derzeit eine weit verbreitete Trägersubstanz für Medikamente, die zur Entzündungstherapie eingesetzt wird. Außerdem ist es in Studien ein Lösungsmittel für zahlreiche Substanzen: So wurden von LIAO et al. (1996) DMSO als Kontrollsubstanz in der Untersuchung von Demethyldiisoeugenol (DMDE) auf die Thrombozytenaggregation in einer Konzentration von 0,5 % benutzt (LIAO et al., 1996). DMSO besaß keinen Einfluss auf die Thrombin-induzierte Aggregation. Ebenso ergaben Untersuchungen von 0,1 % (KONDO et al., 2002; CRANC et al., 2005) und 0,75 % DMSO (WANG et al., 2002) keine thrombozytenmodulierenden Effekte.

In der Arbeit von SHANMUGANAYAGAM et al. (2002) wurden die Befunde ebenfalls nicht durch DMSO modifiziert. In diesen Untersuchungen wurden DMSO-Konzentrationen von 0 % bis 1,25 % verwendet. Auch die höchste Konzentration besaß keinen Einfluss auf die durch ADP-, Adrenalin- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregationen. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation wurde in der vorliegenden Studie durch Zugabe von DMSO geringfügig verstärkt, wobei jedoch alle Aggregationen im Bereich des Referenzwertes des Agonisten lagen.

Auch isotonische Kochsalzlösung besaß keinen Einfluss auf die Agonisten-induzierten

Thrombozytenaggregationen. Allerdings wurde, ebenso wie bei DMSO, die Arachidonsäure-induzierte Aggregation geringfügig gesteigert. Es konnten jedoch keine aktivierten Plättchen durch isotonische Kochsalzlösung beobachtet werden. Ein dementsprechender Effekt wurde bisher nicht beschrieben. Beide Substanzen eigneten sich demnach uneingeschränkt als Lösungsmittel der Testsubstanzen für aggregometrische Analysen.

Es sei an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, dass eine lösungsmittelspezifische Kontrolle stets in jedem Versuchsansatz zur Untersuchung bioaktiver Substanzen auf die Modulation der Thrombozytenaggregation mitgeführt wurde, um für alle Versuche vergleichbare Bedingungen zu gewährleisten und um Eigeneffekte der Lösungsmittel ausschließen zu können.

5.1.4 Inkubationszeit und Inkubationstemperatur

In Vorversuchen wurde der Frage nachgegangen, wie lange die Testsubstanzen vorinkubieren sollten. Es hat sich in anderen Untersuchungen gezeigt, dass Thrombozyten nach Blutentnahmen mindestens 30 min stehen müssen ehe sie aggregometrisch untersucht werden können, da Thrombozyten zunächst refraktär sind, d.h. in einem Zustand der Unempfindlichkeit verharren (BUDDE, 2002). In der Literatur wird weiterhin kontrovers diskutiert, ob die Standzeit des Plasmas von der Blutentnahme oder von der Gewinnung des plättchenreichen Plasmas gerechnet werden sollte (BUDDE, 2002). In dieser Studie wurden 30 min Standzeit nach Gewinnung des plättchenreichen Plasmas und zusätzlich 10 min Vorinkubationszeit auf Grund der Ergebnisse der Vorversuche festgelegt. In den Vorversuchen wurde darüber hinaus festgestellt, dass sich ab einer Inkubationszeit von 30 min die Aggregationen änderten (Abbildung 23, S. 61). Diese Feststellung deckt sich mit den Ausführungen von BUDDE (2002). Mit einer in der vorliegenden Arbeit festgelegten 10 minütigen Inkubationszeit konnten die Thrombozyten ausreichend lange mit den Prüfsubstanzen vorinkubiert werden, ohne die Thrombozyten durch eine ausgedehnten Standzeit in ihrer Aggregationsfähigkeit zu verändern.

BUDDE (2002) schlug vor, Thrombozyten bei Raumtemperatur zu lagern. Es zeigte sich jedoch in den Vorversuchen der Studie, dass es keine relevanten Unterschiede zwischen einer Aufbewahrungstemperatur von 23 °C oder 37 °C gab. Daher konnten alle Analysen bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt und die thrombozytenreichen Plasmen bei 37 °C aufbewahrt werden.

5.1.5 Agonisten

In der Studie wurden 20 µM ADP, 100 µM Adrenalin, 83 µg/mL Kollagen und 500 µg/mL Ara-

chidonsäure eingesetzt. Es gibt nur wenige Arbeiten, welche die Aggregationen der Thrombozyten mit mehreren Induktoren wie ADP, Adrenalin, Kollagen und Arachidonsäure untersuchten (Tabelle 23, S. 106): SIESS et al. (1982) überprüften mit den genannten Agonisten die Aggregationen von gesunden Probanden vor und nach Bewegung, Rauchen und Noradrenalin-Infusion. BEGHETTI et al. (2003) untersuchten mit den aufgeführten Agonisten die durch Stickstoffmonoxid (NO) beeinflussbare Aggregation der Thrombozyten. TSUCHIYA et al. (1999) untersuchten neben den Agonisten ADP, Adrenalin und Kollagen zusätzlich PAF (Plättchen-aktivierender Faktor) und Thrombin. Damit stellt die vorliegende Arbeit eine der wenigen dar, welche mit 4 Agonisten umfassend die Thrombozytenaggregation untersuchte. Ansonsten gibt es zahlreiche Studien, welche die Plättchenaggregation nur mit einem einzigen Agonisten untersuchten (BOULOS et al., 2000; PIGNATELLI et al., 2000; KONDO et al., 2002; SHANMUGANAYAGAM et al., 2002; FONTANA et al., 2003; SAEED et al., 2003; SAEED und RASCHEED, 2003; MERTEN et al., 2005; Tabelle 23, S. 106).

In dieser Studie wurden die vom Gerätehersteller empfohlene Agonistenkonzentrationen eingesetzt. Es wurde im Verlauf der Experimente darauf geachtet, dass es zu keinen Schwankungen in den Zusammensetzungen der Agonistenstammlösungen kam. Außerdem wurden alle Agonisten jeweils von einem Hersteller benutzt. Nach BREDDIN (2005) können insbesondere sowohl unterschiedliche Bezugsquellen als auch unterschiedliche Aufarbeitungen der Agonisten (z.B. ein anderes ADP-Salz, unterschiedliche Kollagene) zu unterschiedlichen Resultaten führen.

In welchen Konzentrationen die Agonisten in den einzelnen Studien verwendet wurden, war durchaus unterschiedlich (Tabelle 23, S. 106): So wurden zum Teil deutlich niedrigere oder auch deutlich höhere Konzentrationen eingesetzt als in der vorliegenden Studie: So untersuchten FONTANA et al. (2003) die ADP-induzierte Plättchenaggregation mit 1 μ M, 2 μ M und 5 μ M ADP. SUNEETHA et al. (2005) verwendeten dagegen 2500 μ M ADP und BEGHETTI et al. (2003) 7000 μ g/ml Kollagen.

5.1.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine etablierte Methode, die oft für wissenschaftliche Fragestellungen verwendet wird, die eine Entwicklung von der reinen Forschungsmethode zum standardisierten Verfahren in der Routinediagnostik durchgemacht hat (BROWN und WITTEW, 2000; SACK et al., 2000) und die sich für die Analyse zahlreicher biologischer Systeme (BROWN und WITTEW, 2000) wie zum Beispiel zur Detektion von Thrombozytenfunktionsstörungen eignet (SCHMITZ et al., 1998; SACK et al., 2000; MCCABE et al., 2004).

Die durchflusszytometrischen Bestimmungen der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate, die P-Selektin und PAC-1-Expression sowie die Probenaufbereitung waren in der vorliegenden

Studie mit einem geringen präparativen und zeitlichen Aufwand für die Messung verbunden und zudem hoch sensitiv.

Tabelle 23. Vergleich der eingesetzten Agonistenkonzentrationen mit denen anderer aggregometrischen Studien

Agonisten	ADP [μM]	Adrenalin [μM]	Kollagen [μg/mL]	Arachidon- säure [μg/mL]
Konzentrationen in dieser Studie				
	20	100	83	500
Konzentrationen in anderen publizierten Studien				
SIESS et al. (1982)	0,5-2,5; 5	0,2-5	0,25-10	548
BEGHETTI et al. (2003)	5	2	7000	500
MISCHKE und SCHULZE (2004)	0,5-50	5-50	500-20000	
BASLAR et al. (2004)	10	100	4,4	
JESSIE und KRISHNAKANTHA (2005)	61	76	11	
SUNEETHA et al. (2005)	2500	2500	1300 [mg/mL]	
TSUCHIYA et al. (1999)	60	40	50	
SAEED et al. (2004)		1000		610
WANG et al. (2002)	4		5	
MERTEN et al. (2005)	5			
FONTANA et al. (2003)	1; 2; 5			
SAEED und RASHEED (2003)		0,5-20		
KONDO et al. (2002)			1;3	
PIGNATELLI et al. (2000)			2; 4	
RIMBACH et al. (2004)			1,5	
SHANMUGANAYAGAM et al. (2002)			2	
SAEED et al. (2003)				610
BOULOS et al. (2000)				21

In der Tabelle wurden die in dieser Studie verwendeten ADP-, Adrenalin-, Kollagen- und Arachidonsäurekonzentrationen denen anderer wissenschaftlichen Studien gegenübergestellt. Es wurden gegebenenfalls die Konzentrationen auf die jeweilige Einheit umgerechnet, sofern sie von den Angaben dieser Studie abwichen. Generell wurden die Einheiten der vorliegenden Studie verwendet, die auf die Angaben des Herstellers MÖLAB (2002) zurückgehen. Die Studien sind mit den Autorennamen aufgelistet und wurden absteigend nach Anzahl der verwendeten Agonisten geordnet.

Die hohe Sensitivität der Methode wurde ebenfalls durch MATZDORFF (2000) beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde die Durchflusszytometrie für die Funktionsdiagnostik der Thrombozyten bei Gesunden und bei Herzkranken eingesetzt.

CD 62 (P-Selektin) ist der am häufigsten verwendete Antikörper zum Nachweis aktivierter

Thrombozyten bei herzkranken Patienten (CAHILL et al., 1996; MINAMINO et al., 1998; MATZDORFF, 2000; KAMATH et al., 2002; WEIKERT et al., 2002; MCCABE et al., 2004; PAGLIERONI et al., 2004) und wurde auch aus diesem Grund in dieser Studie untersucht. Eine erhöhte Bindung des Antikörpers für CD 62 zeigt eine erhöhte Thrombozytenaktivierung an. Trotzdem gab es in der Literatur auch Studien, die keine Erhöhung der CD 62-Expression feststellen konnten (NURDEN et al., 1994; MATZDORFF, 2000; MCCABE et al., 2004; MERTEN et al., 2005). Die Messung der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate zur Charakterisierung des Aktivierungszustandes bei herzkranken Patienten wurde in einigen Studien beschrieben (OTT et al., 1996; SACK et al., 2000).

Aber auch andere Antikörper können zur Untersuchung von Thrombozyten herzkranker Patienten verwendet werden (PAC-1, LIBS, RIBS, CD 63). So erkennt PAC-1 die Bindungsseite des aktivierten GP IIb/IIIa-Rezeptors, sobald der aktivierte Rezeptor seine Konformation geändert hat und Fibrinogen noch nicht gebunden wurde. Eine verstärkte Bindung von PAC-1 spricht für ein koronares Ereignis (Koronarspasmus; MATZDORFF, 2000). Deshalb wurde auch dieser Antikörper zusammen mit CD 62 und CD 41, welcher zur Identifikation der Thrombozytenpopulationen benutzt wurde, nach ADP-Aktivierung untersucht. Diese Markierungskombination dreier Antikörper bietet nach den Erfahrungen der Studie eine äußerst sensitive Analyse der Aktivierungszustände von Thrombozyten herzkranker Patienten. Nach den Befunden der aktuellen Untersuchung ist dieses Verfahren im besonderen Maße dafür geeignet, zwischen den Aktivierungszuständen von Blutplättchen aus Patienten mit Vorhofflimmern und denen von gesunden Probanden zu differenzieren.

5.2 Produkte der Sojabohne und Sojabohneninhaltsstoffe

Ungefähr 30000 verschiedene Lebensmittel enthalten Sojaprodukte (AMERICAN SOYBEAN ASSOCIATION, 2001). Neben Fermentationsprodukten wie Miso, Natto, Tempeh und Tofu (Abbildung 49, S. 108) werden zum Beispiel entfettetes Sojamehl für die Herstellung von Backwaren, Sportlernahrung oder Teigwaren und Sojaweißprodukte für Fertiggerichte, Diätgetränke oder Säuglingsnahrungen verwendet. Sojalezithin findet sich bekanntermaßen als Lebensmittelzusatzstoff in Schokolade oder Kleingebäck (AMERICAN SOYBEAN ASSOCIATION, 2001).

Der Anteil der Gesamtisoflavone, von denen das Genistein in der vorliegenden Studie auf die Modulation der Thrombozytenfunktion untersucht wurde, ist je nach Verarbeitungsgrad der Sojabohne in den jeweiligen Produkten unterschiedlich. Wie in Tabelle 24 (S. 109) darlegt wird, enthalten reine Sojabohnen einen Isoflavongehalt von 57,9 mg/100 g bis 381,2 mg/100 g Nahrungsmittel. Die erheblichen Schwankungen sind von verschiedenen Faktoren, wie Reifungsgrad, Kultivierung und/oder von klimatischen Einflüssen abhängig (DIXON, 2004).

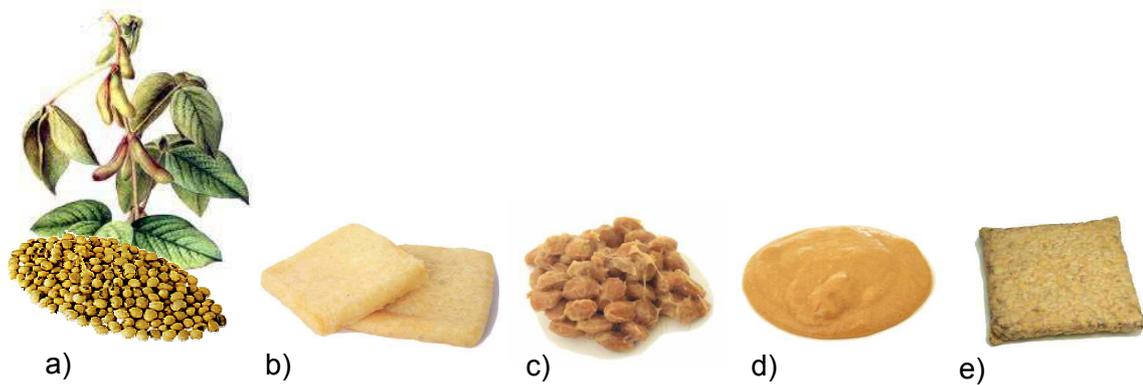


Abbildung 49. Verschiedene Produkte aus Sojabohnen.

In der Abbildung wurden verschiedene Sojaprodukte aufgelistet mit a) Sojabohnenpflanze und native Sojabohnen³, b) Tofuscheiben⁴, c) Natto (Sojabohnenölkäse, wird aus gegorenen Sojabohnen gewonnen)⁴, d) Butter (wird aus gebratenen Sojabohnen hergestellt)⁴ und e) Tempeh (gegorene und in Form gebrachte Sojabohnen)⁴.

1 g pulverisierte Sojabohnensamen kann bis zu 800 µg Daidzein und bis zu 500 µg Genistein in Form ihrer Glykoside enthalten (DIXON, 2004). 1 g reines Sojaprotein, welches aus Sojabohnensamen isoliert wurde, besitzt immer noch Konzentrationen von 150 µg Daidzein und 250 µg Genistein (DIXON, 2004).

Die Konzentrationen der Isoflavone nehmen mit zunehmenden Verarbeitungsgrad rapide ab. Fermentierte Produkte oder Sojaöl enthalten kaum Isoflavone (DIXON, 2004). In Tofu, ein Hauptsojaprodukt, sind dagegen Gehalte von 7,9 mg/ 100 g bis 67,4 mg/100 g Nahrungsmittel nachgewiesen worden (Tabelle 24, S. 109).

Mit einem Anteil von ungefähr 40 % sind die Sojabohne bzw. ihre Samen außerdem sehr proteinreich. Neben einem erhöhten Anteil an Protein kommen in den Sojabohnensamen vermehrt ungesättigte Fettsäuren vor (Tabelle 25, S. 109).

Es ist demnach schwierig, klar definierte Verbindungen der Sojabohne auf Grund ihrer Komplexität zu definieren, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit nach oraler Nahrungsaufnahme im peripheren Blut nachgewiesen werden können.

Tabelle 24. Gesamtisoflavongehalt und Genisteinkonzentrationen in verschiedenen Nahrungsmitteln

Lebensmittel	Genistein [mg/100g Frischgewicht]	Gesamt- isoflavongehalt [mg/100g]
Sojabohnen	30-92	57,9-381,2
Sojamilch	3-17	3,4-17,5
Tofu	8-20	7,9-67,4
Sojasprossen	2	k.A.
Kleesprossen	0,1-0,4	k.A.
Bohnen	0-0,7	k.A.
Erbsen	0-0,6	7,3

In der Tabelle werden die Gesamtisoflavongehalte in verschiedenen Lebensmitteln nach CASSIDY et al. (2000) und die Genisteinkonzentrationen (KULLING UND WATZEL, 2003) verschiedener Lebensmittel dargestellt. Die Werte schwanken sehr nach Lebensmittel und Verarbeitung. Ein einheitlicher Wert lässt sich aus diesem Grund nicht angeben.

Tabelle 25. Übersicht der Inhaltsstoffe in Sojabohnensamen

Komponenten	Plasmakonzentration [μM]
Protein	ca. 40 %
Öl	ca. 18 %
Fettsäuren	
gesättigt	< 0,4 % Myristinsäure C _{14:0} < 0,5 % Arachidonsäure C _{20:0} 2 – 7 % Stearinsäure C _{18:0} 4 – 11 % Palmitinsäure C _{16:0}
ungesättigt	4 – 12 % α -Linolensäure C _{18:3} 23 – 32 % Ölsäure C _{18:1} 48 – 52 % Linolsäure C _{18:2}
Lezithin	ca. 2%
Kohlenhydrate	34 %
Asche	4,9 %

Die Daten der Konzentrationen der Inhaltsstoffe der Sojabohnensamen entstammen der Arbeit von ZELLER (1999).

5.3 Zielsetzung der Studie

Die vorliegende Studie sollte durch den Nachweis thrombozytenmodulierender Substanzen die Grundlage für die Identifikation bzw. Entwicklung neuer Substanzen schaffen, die im Rahmen von Herz-Kreislaufkrankungen durch Hemmung der Thrombozyten protektiv gegen die Entstehung und Progression der Atherosklerose wirken. Da die Atherosklerose weiterhin zu den häufigsten Ursachen für Herzinfarkte oder Schlaganfälle zählt, ist eine Erforschung geeigneter präventiver und therapeutischer Maßnahmen wichtig. Nicht zuletzt spielen aktivierte Thrombozyten mit anschließender Thrombusbildung in diesen Krankheitsprozessen eine entscheidende Rolle. In dieser Studie sollten nicht nur bioaktive Substanzen identifiziert, sondern auch mögliche Wechselwirkungen dieser Verbindungen auf die Regulation der Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen untersucht werden.

Ziel dieser Untersuchungen war daher die Beantwortung der Frage, inwiefern es in der Sojabohne bioaktive Moleküle gibt, welche die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen kardioprotektiv beeinflussen können.

In der Tat gibt es bereits Studien, die die Wirkung von Sojaproteinen auf den Cholesterinstoffwechsel untersuchten (ANDERSON et al., 1995; KIRK et al., 1998; POTTER, 1998; WONG et al., 1998; SETCHELL und CASSIDY, 1999; FRIEDEMANN und BRANDON, 2001). Erstmals wurde 1967 durch HODGES et al. die cholesterinsenkende Wirkung durch Sojaproteine beschrieben. Eine Metaanalyse von ANDERSON et al. (1995) ergab, dass der Plasmacholesterinspiegel in 34 der ursprünglich 38 ausgewerteten Studien gesenkt werden konnte, ohne das HDL-Cholesterin zu beeinflussen. Der cholesterinsenkende Effekt des Sojaproteins war bei Probanden mit einem hohen Cholesterinspiegel stärker ausgeprägt als bei gesunden Probanden. Dazu wurden den Probanden eine sojahaltige Diät mit einer errechneten Sojaproteinaufnahme von 47 g/Tag verabreicht.

Daraufhin legte die FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1999) einen sogenannten „*Health Claim*“ für Sojaprotein fest: 25 g Sojaprotein am Tag im Rahmen einer fett- und cholesterinarmen Ernährung könnte das Risiko von Herzerkrankungen verringern.

Erst durch die Arbeit von CROUSE et al. (1999) kristallisierte sich heraus, dass die Isoflavone des Sojaproteins für diesen hypocholestrinämischen Effekt verantwortlich waren. CROUSE et al. untersuchten 156 Frauen und Männer, die einen erhöhten Gesamtcholesterinspiegel sowie erhöhtes LDL-Cholesterin im Plasma aufwiesen. Die Probanden nahmen 25 g Sojaprotein (Vergleichsgruppe: Kasein) zu sich, welches unterschiedliche Isoflavonkonzentrationen enthielt (0 mg/Tag bis 62 mg/Tag). Es waren nur die Sojaproteingetränke wirksam, die Isoflavone enthielten. Ethanolextrahiertes Sojaprotein war vergleichsweise unwirksam (CROUSE et al., 1999).

Eine potenzielle Beeinflussung der Thrombozyten durch Sojabohneninhaltsstoffe wurde in

den genannten Studien nicht untersucht, obwohl eine direkte Beteiligung aktivierter Thrombozyten an koronaren Ereignissen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall unbestritten ist.

Da den Probanden in der genannten Studie von CROUSE et al. (1999) eine sojaproteinreiche Diät mit einer definierten Menge an Sojaprotein verabreicht wurde, um anschließend einen cholesterinsenkenden Effekt im Plasma nachweisen zu können, muss davon ausgegangen werden, dass bei jedem Probanden der Weg von der Einnahme der sojahaltigen Diät bis zum nachweisbaren Effekt auf unterschiedliche Art und Weise erfolgt und weitere, individuellen Faktoren in diesen Prozess eingreifen.

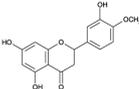
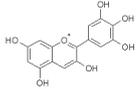
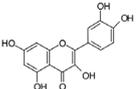
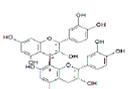
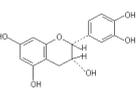
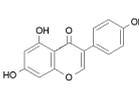
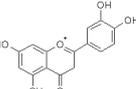
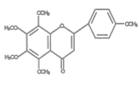
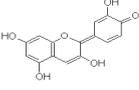
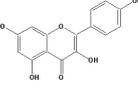
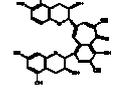
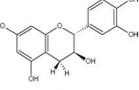
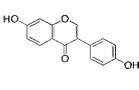
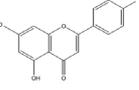
Für die Strategie der vorliegenden Studie war es deshalb wichtig, für jede experimentelle Untersuchung annähernd gleiche Bedingungen zu schaffen, was nur mit einer *in vitro* Studie möglich war. Bezugnehmend auf die Studie von CROUSE et al. (1999) bestand grundsätzlich die Möglichkeit, Sojahydrolysate oder ethanolextrahierte im Vergleich zu unextrahierten Sojaproteinen *in vitro* zu testen. Da jedoch der Weg einer chemisch klar definierten Substanz aus dem Sojaprotein zum Wirkort, d.h. zu den Thrombozyten unklar und sicherlich einer komplexen Metabolisierung unterlegen ist, wurden in Anlehnung an *in vivo* Bedingungen zunächst Dipeptide herausgesucht, die resorbierbar waren (ADIBI, 2003; KOTTRA et al., 2002; DANIEL und KOTTRA, 2004) und in den Sojaproteinen Glycinin und β -Conglycinin vermehrt vorkommen (Anhang, Tabelle 35). Darüber hinaus wurden weitere Substanzen getestet, bei denen auf Grund der Strukturverwandtschaft eine Wirksamkeit angenommen werden konnte. Tetrapeptide wurden nicht in die Untersuchungen einbezogen, da eine Resorption keineswegs wissenschaftlich belegt und ein spezielles Transportsystem noch nicht charakterisiert wurde.

Genistein ist eine häufig untersuchte Substanz der Sojabohne und der Einfluss des Genisteins auf die Thrombozytenaggregation wurde ebenfalls in einigen wenigen Studien beschrieben (GAUDETTE und HOLUB, 1990; NAKASHIMA et al., 1991; KONDO et al., 2002; RIMBACH et al., 2004). In der vorliegenden Studie wurde dazu ergänzend die thrombozytenhemmende Wirkung des Genisteins anhand einer breiten Palette an physiologischen Agonisten nachgewiesen. Daraufhin konnten vorrangig die Aggregationen der mit Aminosäuren oder Peptiden inkubierten Plasmen im Vergleich zum Genistein getestet werden.

5.4 Physiologie der Flavonoide

Bis jetzt haben sich ungefähr 100 Studien mit der Resorption einzelner Flavonoide beschäftigt (MANACH und DONOVAN, 2004). Die Daten weisen große Unterschiede in Abhängigkeit von den Flavonoiden auf, obwohl Flavonoide strukturähnlich sind (Tabelle 26, S. 112).

Tabelle 26. Hauptklassen der Flavonoide mit ausgewählten Beispielen

Flavonoide						
Flavanone	Anthozyane	Flavonole	Polyflavanole	Flavanole	Isoflavone	Flavone
Hesperetin  in: Orangen, Zitronen	Delphinidin  in: Kirschen	Quercetin  in: Zwiebeln, Tomate, Birke	Procyanidin B2  in: Weißdorn, Moosbeeren	Epicatechin  in: Grünen Tee	Genistein  in: Sojabohnen	Luteolin  in: Grünen Oliven
Tangeretin  in: Orangen, Zitronen	Cyanidin  in: Beeren	Kämpferol  in: Grünkohl, Endivien	Theaflavin  in: Schwarzen Tee	Catechin  in: Äpfel, Rotwein, Pfirsich	Daidzein  in: Sojabohnen	Apigenin  in: Gingko biloba, Sellerie

Dargestellt sind die Flavonoide in Form von Gruppen mit jeweils 2 ausgewählten Beispielen mit den Strukturformeln des Flavonoidaglykons und seinem Vorkommen unter besonderer Hervorhebung des Isoflavons Genistein, welches blau gekennzeichnet wurde. Die Tabelle wurde nach MURPHY et al. (2003) modifiziert.

Bei gesunden Probanden konnte eine intestinale Resorption von 0 % bis 60 % der verabreichten Dosis ermittelt und eine Halbwertszeit von 2 h bis 28 h bestimmt werden (MANACH und DONOVAN, 2004). Durch den „First-Pass“-Effekt des Darms und der Leber werden die Flavonoide metabolisiert und können daher im Plasma in methylierter, glucuronierter und/oder sulfatierter Form vorliegen.

Die Isoflavone der Sojabohne liegen in der Pflanze in Form ihrer Glykoside gebunden vor und werden erst durch bakterielle, hydrolytische Spaltung im Darm in Aglykone umgewandelt (PRASAIN et al., 2004). Bis vor kurzem wurde in der Forschung die Meinung vertreten, dass die β -glykosidische Bindung innerhalb der Flavonoide ausschließlich durch Bakterien des Darms gespalten wird und diese nur in Form ihrer Aglykone resorbiert werden können. Diese Vorstellung wurde durch PFORTE et al. (1999) widerlegt. Es sind im Plasma sowohl Glykoside als auch Aglykone nachweisbar.

Sind zum Beispiel Isoflavonaglykone nicht durch intestinale Bakterien freigesetzt worden, können die in die Zelle aufgenommenen Glykoside durch intra- oder extrazelluläre β -Glucosidasen zu Aglykonen modifiziert werden (SETCHELL und CASSIDY, 1999; SETCHELL et al., 2002a, 2002b). In der apikalen Membran können Flavonoidglykoside, durch das Enzym Laktose-Phlorizinhydrolase hydrolysiert werden. Dieses Enzym ist in den Darmzotten des Dün-

darms lokalisiert (DAY et al., 2000; PRASAIN et al., 2004).

Glykosidisch gebundene Isoflavone gelangen wahrscheinlich über einen aktiven Transport via Glukosetransporter in die Mukosazelle. Dieses wurde auch für andere Flavonoide, zum Beispiel für Quercetinmono- und Quercetindiglykoside der Zwiebel nachgewiesen. Sie stellen Substrate für den intestinalen Na⁺-abhängigen D-Glukosetransporter SGLT 1 dar (GEE et al., 1998; WILLIAMSON et al., 2000). Durch das intestinale Multidrug-Resistance-Protein MRP 2 sind Darmepithelzellen außerdem in der Lage, auf der apikalen, d.h. die zum Darmlumen gerichtete Seite, Glykoside wieder in das Darmlumen herauszuschleusen (WALGREN et al., 1998).

Werden Isoflavone als Aglykone aufgenommen, so wird auf Grund ihrer Lipophilie eine Resorption durch passive Diffusion diskutiert (PRASAIN et al., 2004). Noch in den Enterozyten (Darmepithelzellen) werden Isoflavone mit Glucuronsäure durch das Phase-II-Enzym UDP-Glucuronyltransferase rekonjugiert, um anschließend aus der Epithelzelle ins portalvenöse Blut zu gelangen (PRASAIN et al., 2004). In der Leber unterliegen sie weiteren Glucuronidierungs-, Methylierungs- und Sulfatierungsschritten durch hepatische Enzyme (PRASAIN et al., 2004). In Form von Monoglucuroniden können sie in die systemische Zirkulation eintreten oder werden sowohl renal als auch biliär ausgeschieden. Im letzteren Fall ist eine erneute Resorption in Form der Aglykone sowie eine Beteiligung am enterohepatischen Kreislauf möglich. Im Vergleich zu anderen Flavonoiden wie Anthocyane, Catechin oder Hesperidin besitzt Genistein die beste Bioverfügbarkeit, die im Vergleich zu anderen Flavonoiden ermittelt wurde (FLESCHHUT, 2004; Abbildung 50, S. 114).

Wie aus Abbildung 50 deutlich wird, wurden für jedes Flavonoid Studien ausgewertet, in denen die Konzentration nach einer einmaligen Gabe von 50 mg Aglykonäquivalent im Plasma ermittelt wurden. Dabei schnitt Genistein mit einem maximalen Wert von ungefähr 2,23 µM am besten ab (FLESCHHUT, 2004). Auffällig war weiterhin das späte Konzentrationsmaximum der Isoflavone Genistein und Catechin, die ihre höchste Konzentration erst nach 7 h bis 7,5 h im Plasma erreichten. Anthocyane, Quercetin oder Catechin hatten im Vergleich zum Genistein zusätzlich zu einer schlechteren Bioverfügbarkeit ein zeitlich früheres Konzentrationsmaximum im Plasma (FLESCHHUT, 2004). Für Genistein bedeutet das *in vivo* einen höheren und länger andauernden Wirkspiegel im Plasma.

5.5 Wirkungen der Flavonoide

Mit der Erforschung der Pflanzenöstrogene wurden die Isoflavone der Sojabohne auf Grund ihrer östrogenartigen Struktur vermehrt auf ihre Wirkungen untersucht. Neben der Isolierung von Genistein und Daidzein aus Sojabohnen wurden Östron, Östradiol, Östriol, Formonone-

tin, Coumestrol, Sitosterol oder Biochanin A und B aus verschiedenen Pflanzen isoliert und als Phytoöstrogene charakterisiert (LAURITZEN, 2001). Inzwischen sind die verschiedensten Flavonoide auf ihre Wirkungen untersucht worden.

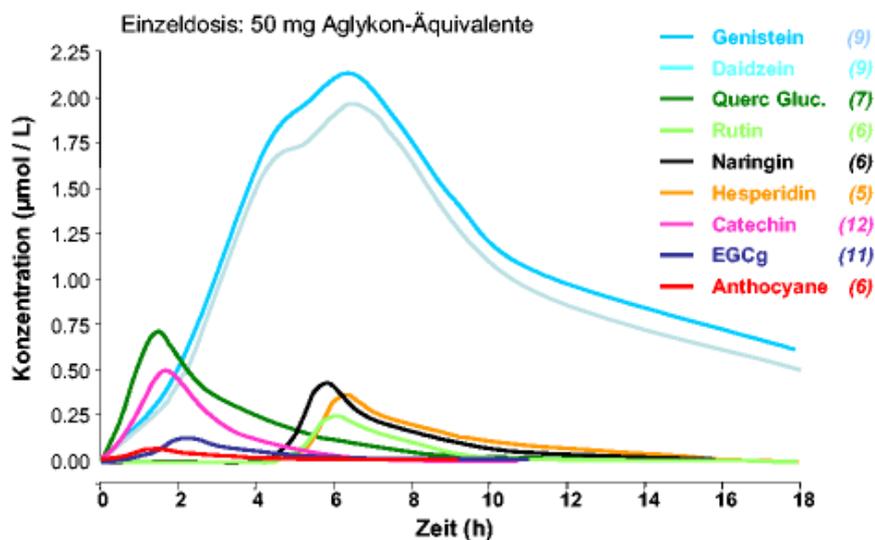


Abbildung 50. Vergleich der Bioverfügbarkeit verschiedener Flavonoide.

Dargestellt sind gemittelte Werte der Konzentration verschiedener Flavonoide im Plasma zu verschiedenen Zeitpunkten von Probanden, die jeweils eine Menge von 50 mg Aglykonäquivalent einnahmen. Die in Klammern stehenden Zahlen entsprechen der Anzahl der Studien, die in der Literaturrecherche für das jeweilige Flavonoid ermittelt wurden. Die Grafik wurde modifiziert nach (FLESCHHUT, 2004).

Auch die Einflüsse der Flavonoide auf die Modulation der Thrombozytenfunktion sind in verschiedenen Arbeiten untersucht worden: Von Catechin (PIGNATELLI et al., 2000; MURPHY et al., 2003), Epicatechin (MURPHY et al., 2003), Quercetin (PIGNATELLI et al., 2000, HUBBARD et al., 2003), Kämpferol und Myricetin (NIJVELDT et al., 2001) oder polyphenolreichen Lebensmitteln (REIN et al., 2000; LILL et al., 2003; PEARSON et al., 2003; VITSEVA et al., 2005) wurden hemmende Wirkungen auf die Thrombozytenaggregation beschrieben.

5.5.1 Wirkung des Isoflavons Genistein auf die Thrombozyten

Die Wirkung des Genisteins auf die Thrombozytenfunktion kann als multifaktoriell bezeichnet werden. Viele intrazelluläre und extrazelluläre Signalkaskaden der Thrombozytenaktivierung beeinflussen sich gegenseitig und stehen in einem „Cross Talk“ zueinander. Es ist demnach schwierig, die in dieser Studie nachgewiesenen Hemmungen der Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen durch Genistein auf eine spezifische Signalkaskade in den Thrombozyten zurückzuführen. Trotzdem wird im Folgenden mithilfe des aktuellen, wissen-

schaftlichen Kenntnisstandes nach möglichen Erklärungen für die Wirkung des Genisteins gesucht.

Bereits 1953 und 1954 erschienen erste Untersuchungen zur östrogenen Aktivität von Genistein durch CARTER et al. (1953) bzw. BIGGERS und CURNOW (1954). Erste Befunde von AKIYAMA et al. zeigten 1987 Genistein als einen spezifischen Tyrosinkinaseinhibitor und GAUDETTE und HOLUB (1990) beobachteten, dass Genistein die Phosphoinositolphosphorylierung in stimulierten Plättchen hemmen konnte. Diese Arbeiten wurden von NAKASHIMA et al. (1990) durch den Nachweis der hemmende Effekte des Genisteins anhand Thrombin- und Kollagen-stimulierter Plättchen ergänzt und zudem nachgewiesen, dass Genistein nicht ausschließlich über eine Hemmung der Tyrosinkinasen wirken muss (NAKASHIMA et al., 1990).

Wahrscheinlich wirkt Genistein über die Beeinflussung verschiedener Signalkaskaden modulierend auf die Thrombozytenaggregation. Genistein hemmt den Na^+/H^+ -Austauscher in den Thrombozyten (GENDE, 2000). Durch eine gesteigerte Thrombozytenaktivierung wird auch der zelluläre pH-Wert beeinflusst, der die osmotisch-regulierte Formveränderung der Thrombozyten steuert. Fällt der intrazelluläre pH-Wert, so wird dieser Austauscher auf Grund der erhöhten Protonenkonzentration zur Wiederherstellung des pH-Wertes angeregt. Wie Genistein in der Studie von GENDE (2000) diesen Austauscher hemmte, ist noch nicht bekannt. Jedoch wurde von dem Autor die Funktion des Genisteins als ein Tyrosinkinaseinhibitor für diesen Effekt verantwortlich gemacht. Genistein wirkte dadurch einer Formveränderung der Thrombozyten entgegen.

Im Folgenden wird auf die Wirkung des Genisteins auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenfunktionen eingegangen. Genistein war in der vorliegenden und in anderen Studien ein wirksamer Inhibitor der Thrombozytenaggregation (GAUDETTE und HOLUB, 1990; NAKASHIMA et al., 1991; KONDO et al., 2002; RIMBACH et al., 2004).

5.5.1.1 *Wirkungen des Genisteins auf die ADP- und Adrenalin-induzierten Thrombozytenaggregationen*

Es ist in neueren Studien festgestellt worden, dass Genistein auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation folgendermaßen einwirkt: Die ADP-vermittelte Aktivierung der Thrombozyten verläuft über die Bindung des Aktivators ADP zum einen über den purinergen Rezeptor P_2X_1 und zum anderen über die Rezeptoren P_2Y_1 und P_2Y_{12} (WILDE et al., 2000; JUNG und MOROI, 2001; CATTANEO, 2002; FONTANA et al., 2003; ROZALSKI et al., 2005; Abbildung 8, S. 19, Abbildung 51, S. 116). Eine Aktivierung des P_2Y_1 bewirkt eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums und löst dadurch die Freisetzung granulärer Inhaltsstoffe (z.B. ADP, P-Selektin) aus. Die Aktivierung des P_2Y_{12} senkt zudem den intrazellulären Spiegel an zyklischem AMP (cAMP) und wirkt über gemeinsame Signalprodukte mit dem aktivierten P_2Y_1 . Gemeinsam

bewirken sie die Konformationsänderung des Adhäsionsintegrins $\alpha_2\beta_1$ (GP Ia/IIa; R_0 , R_1 , R_2) für die Kollagen-vermittelte Aktivierung der Thrombozyten (Abbildung 51).

Genistein hemmte in der Studie von ASEICHEV und AZIZOVA (2004) die ADP-vermittelte Signaltransduktion und verringerte die intrazelluläre Kalziumkonzentration der Thrombin-induzierten Signalkaskade (DOBRYDNEVA et al., 2002). Diese Hemmung der intrazellulären Kalziumfreisetzung könnte ebenfalls eine Rolle in der ADP-vermittelten Aktivierung spielen, zumal nachgewiesen wurde, dass sowohl die Phospholipase C als auch die Proteinkinase C (siehe Abbildung 8, S. 19) zwei bei der Aktivierung der Rezeptoren beteiligten Enzyme durch Flavonoide gehemmt werden konnten (RAJ NARAYANA et al., 2001).

Adrenalin ist ein Aktivator der Thrombozytenaggregation, der zusammen mit anderen Aktivatoren wirkt und eine Hemmung der Adenylatzyklase und damit eine Erniedrigung der Spiegel an zyklischem AMP (cAMP) auslöst (SPALDING et al., 1998; SAEED et al., 2004; Abbildung 8, S. 19). Möglicherweise greift Genistein wie bei der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation in die Aktivierung der Kalziumkanäle ein, die zu einer Hemmung der intrazellulären Kalziumfreisetzung führt (Abbildung 51).

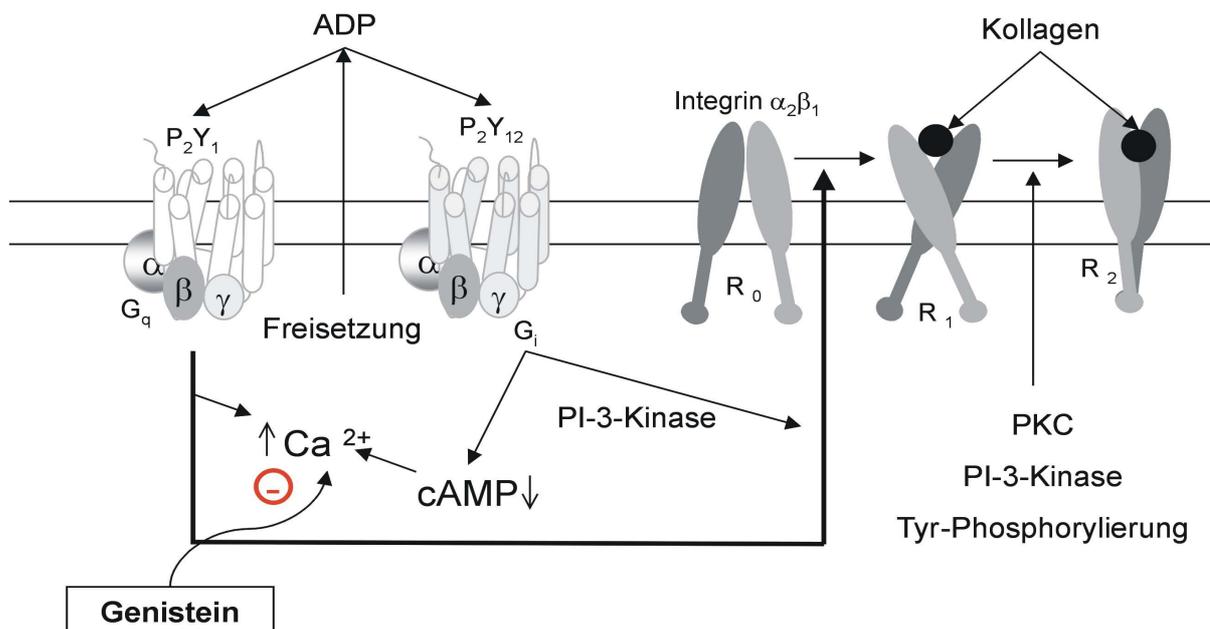


Abbildung 51. Ein möglicher Angriffspunkt des Genisteins in der ADP-vermittelten Thrombozytenaggregation.

Dargestellt wird der Zusammenhang zwischen ADP- und Kollagen-vermittelter Aggregation der Thrombozyten. ADP induziert die Konformationsänderungen der Rezeptoren P_2Y_1 und P_2Y_{12} . Durch die Aktivierung wird eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels ausgelöst. Zusätzlich bewirkt eine Aktivierung der ADP-Rezeptoren eine Konformationsänderung des Kollagenrezeptors (GP Ia/IIa, Integrin $\alpha_2\beta_1$), welcher sich unaktiviert im R_0 Zustand befindet und erst durch die Signalwege der ADP-vermittelten Aktivierung von einem niedrigen R_0 in den höheren Aktivierungszustand R_1 überführt werden kann. Der Wechsel des Kollagenrezeptors von R_1 in R_2 wird durch die Proteinkinase C (PKC), Phosphoinositol-3-Kinase und eine Phosphorylierung der tyrosinreichen Domänen (Tyr) des Rezeptors bewirkt. Genistein hemmt nach ASEICHEV und AZIZOVA (2004) direkt die intrazellulären Kalziumspiegel. Die Grafik wurde nach der Arbeit von JUNG und MOROI (2001) modifiziert.

5.5.1.2 Wirkungen des Genisteins auf die Kollagen- und Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregationen

Es wurde nachgewiesen, dass Flavonoide, unter anderem auch Genistein, an den Thromboxan A₂-Rezeptor (TxA₂-Rezeptor) binden können. Damit könnte die spezifischen Kollagen- (Abbildung 52, S. 118) und Arachidonsäure-induzierten Signalkaskaden (Abbildung 53, S. 118) gehemmt werden (NAKASHIMA et al., 1990; NIJVELDT et al., 2001).

Abbildung 52 (S. 118) bietet daher einen möglichen Erklärungsansatz für die Hemmung des Genisteins auf die Kollagen- und Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregationen, wie sie in dieser Studie nachgewiesen wurden: Wie in der Grafik deutlich wird, bindet das Kollagen bei Aktivierung der Thrombozyten mit seiner GP VI-Bindungsseite an das GP VI des Kollagenrezeptors (WATSON und GIBBINS, 1998). Durch eine kinasenvermittelte Phosphorylierung des GP VI werden anschließend Reaktionen aktiviert, die zur Aggregation der Thrombozyten führen. Genistein besitzt möglicherweise die Fähigkeit, die Kinase Syk zu hemmen (WANG et al., 1997; SCHOENE und GUIDRY, 1999; Abbildung 52, S. 118). Außerdem kann es an den Thromboxan A₂-Rezeptor binden (GUERRERO et al., 2005). Die Doppelbindung zwischen C₂ und C₃ sowie die Ketogruppe am C₄-Molekül des Genisteins wurde für die Bindung an den Rezeptor verantwortlich gemacht (GUERRERO et al., 2005). Die Hemmung des GP VI durch Blockade der Phosphorylierung der F_c-Ketten und der Kinase Syk durch das Flavonoid Quercetin wurde durch HUBBARD et al. nachgewiesen (2003).

Da die Ergebnisse der vorliegenden *in vitro* Studie auch die Hemmung des Genisteins auf die Arachidonsäure-induzierte Aggregation der Thrombozyten belegten, kann eine Beeinflussung des Arachidonsäurestoffwechsels durch Genistein angenommen werden (Abbildung 53, S. 118). Diese Hypothese kann durch mehrere Studien untermauert werden (Übersicht siehe NIJVELDT et al., 2001). Demnach hemmen Flavonoide unter anderem die Zyklooxygenase und bewirken so eine Reduktion der Thromboxan A₂-Synthese. Daraus resultiert eine Hemmung der Thrombozytenaggregation.

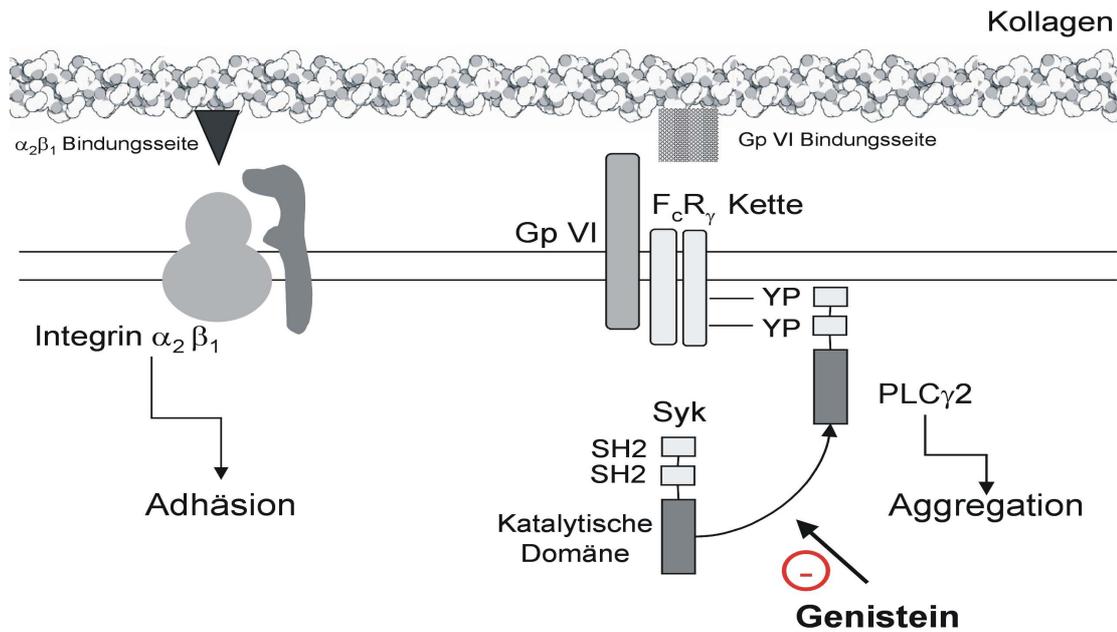


Abbildung 52. Die Hemmung der Syk-Phosphorylierung in der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation (Aktivierung des GP VI Rezeptors) durch Genistein.

Kollagen bindet sich mit der $\alpha_2\beta_1$ (GP Ia/IIa) Bindungsseite an das membranständige Integrin $\alpha_2\beta_1$ (GP Ia/IIa) und löst durch deren Aktivierung die Adhäsion des Thrombozyten z.B. an die Endothelzelle der Gefäßwand aus. Mit der GP VI Bindungsseite des Kollagens wird der Rezeptor GP VI aktiviert. Die Proteinkinase Syk phosphoryliert die F_cR γ Kette des Glykoproteins. Durch die anschließende Aktivierung der Phospholipase PLC γ 2 wird die Aggregation der Thrombozyten eingeleitet. Möglicherweise verhindert Genistein, dass die Proteinkinase Syk das GP VI phosphoryliert (SCHOENE und GUIDRY, 1999). Dadurch wäre der Weg der Thrombozytenaggregation unterbrochen. Die Abbildung wurde nach der Arbeit von WATSON und GIBBINS (1998) modifiziert.

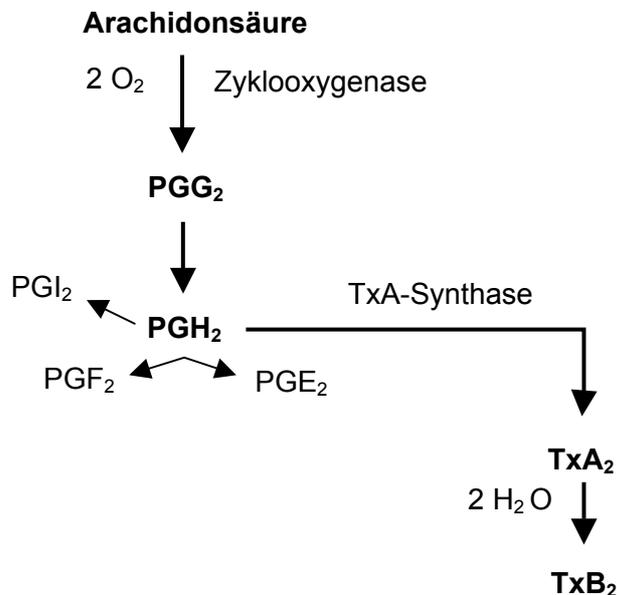


Abbildung 53. Arachidonsäurekaskade mit Bildung von Thromboxan A₂.

Arachidonsäure, die aus den Membranen freigesetzt wird, bildet durch das Enzym Zyklusoxigenase Prostaglandin G₂ (PGG₂), das wiederum in Prostaglandin H₂ umgewandelt werden kann. Durch den Einfluss der Thromboxansynthase bildet sich das Thromboxan A₂, das die Thrombozytenaggregation stimuliert. Unter physiologischen Bedingungen, d.h. im wässrigen Milieu, wird es schnell in Thromboxan B₂ umgewandelt.

5.5.2 Vergleich der eingesetzten Genisteinkonzentrationen mit denen anderer publizierten Studien

Genistein wurde in den Untersuchungen dieser Studie in Konzentrationen von 100 μM bis 500 μM eingesetzt. Diese Konzentrationen können vermutlich *in vivo* durch eine sojareiche Ernährung nicht erzielt werden.

Die humanen Plasmaspiegel an Genistein oder an anderen Isoflavonen variieren stark und sind von der Nahrungsaufnahme abhängig. Wie die Tabelle 27 zeigt, sind Serumkonzentrationen von Isoflavonen bei asiatischen Frauen und Männern viel höher als bei der westlichen Bevölkerung (MORTEN et al., 2002). NAGATA et al. (1998) bestimmten, dass die asiatischen Bewohner ungefähr 50 g Sojaprodukte mit einem Isoflavonanteil von 20 mg bis 50 mg täglich aufnehmen. Dazu wurden 1242 Männer und 3596 Frauen der japanischen Stadt Takayama unter anderem nach ihren Ernährungsgewohnheiten befragt (NAGATA et al., 1998). Trotzdem gab es auch in diesen Ländern zwischen der städtischen und der ländlichen Bevölkerung erhebliche Unterschiede in der Sojaproteinaufnahme (SETCHELL und CASSIDY, 1999). Bei einer täglichen Gesamtisoflavonaufnahme von ungefähr 50 mg sind Plasmakonzentrationen von 50 ng/mL bis 800 ng/mL bestimmt worden (SETCHELL und CASSIDY, 1999). Diese Konzentrationen entsprachen ungefähr den Bestimmungen, die von ADLERCREUTZ et al., 1993 angeführt wurden.

Tabelle 27. Serumkonzentrationen an Daidzein und Genistein

	Genistein [nmol/L] (Min-Max)	Daidzein [nmol/L] (Min-Max)
Frauen		
Japan	501,9 \pm 125,8 (0-4192)	246,8 \pm 64,9 (0-2407)
UK	27,7 \pm 4,8 (0,4-157)	12,5 \pm 1,8 (0,8-65)
Männer		
Japan	492,7 \pm 116,6 (0-4092)	282,5 \pm 72,7 (2,8-2273)
UK	33,2 \pm 8,0 (0,5-118)	17,9 \pm 5,6 (0,9-99,6)

In der Tabelle wurden die durchschnittlichen Serumkonzentrationen \pm Standardabweichung unter Angabe minimaler und maximaler Konzentrationen in nmol/L von Probanden weiblichen und männlichen Geschlechts unterschiedlicher Herkunft analysiert. Dabei wurden 125 weibliche und 102 männliche Personen asiatischer Herkunft und 133 weibliche bzw. 43 männliche Probanden aus Großbritannien (UK) untersucht. Die Tabelle entstammt MORTON et al. (2002).

Bei einer sojaarmen Ernährung, wie sie in der westlichen Ländern üblich ist, liegen die Plasmakonzentrationen lediglich zwischen 40 pg/mL und 80 pg/mL (SETCHELL und CASSIDY, 1999). Ähnliche Ergebnisse lieferte die schon erwähnte Untersuchung von MORTON et al.

(2002; Tabelle 27, S. 119). Demnach lag die durchschnittliche Genisteinkonzentration im Serum bei japanischen Frauen bei $501,9 \pm 125,8$ nmol/L und bei japanischen Männern bei $492,7 \pm 116,6$ nmol/L. Im Vergleich dazu wurden bei britischen Frauen eine durchschnittliche Serum-Genisteinkonzentration von $27,7 \pm 4,8$ nmol/L und bei Männern $33,2 \pm 8,0$ nmol/L bestimmt. Die in der vorliegenden Studie *in vitro* eingesetzten Konzentrationen sind daher mit den tatsächlich *in vivo* vorhandenen Plasmakonzentrationen nicht zu vergleichen. Deshalb wurden die *in vitro* Bedingungen (verwendete Genisteinkonzentrationen im Verhältnis zu den Agonistenkonzentrationen) mit anderen Publikationen verglichen. Tabelle 28 zeigt die in der vorliegenden *in vitro* Studie eingesetzten Genisteinkonzentrationen in Bezug auf die verwendete Konzentration für jeden Agonisten. Wird die alleinige Genisteinkonzentration mit anderen Publikationen verglichen, so wurden zum Beispiel in der Studie von KONDO et al. (2002) niedrigere Genisteinkonzentrationen von 10 μ M, 30 μ M und 100 μ M eingesetzt. Noch geringere Konzentrationen verwendeten RIMBACH et al. (2004; Tabelle 29, S. 121). Bei diesem Vergleich sollten jedoch nicht die Agonistenkonzentrationen, sondern das Verhältnis zwischen eingesetzter Agonistenkonzentration und Genisteinkonzentration betrachtet werden: Es ist davon auszugehen, dass für höhere Agonistenkonzentrationen auch höhere Konzentrationen an Testsubstanzen nötig sind, um die gleichen biologischen Effekte zu erzielen.

Tabelle 28. Verhältnis zwischen eingesetzten Genistein- und Agonistenkonzentrationen in der vorliegenden Studie

Konzentrationen dieser Studie	ADP	Adrenalin	Kollagen	Arachidonsäure
Genistein [μ M]	100	100	100	100
Konzentration Agonist [μ M]	20	100	0,6	1700
Quotient: $c_{\text{Genistein}} [\mu\text{M}] / c_{\text{Agonist}} [\mu\text{M}]$	5	1	166,7	0,06
Genistein [μ M]	250	250	250	250
Konzentration Agonist [μ M]	20	100	0,6	1700
Quotient: $c_{\text{Genistein}} [\mu\text{M}] / c_{\text{Agonist}} [\mu\text{M}]$	12,5	2,5	416,7	0,15
Genistein [μ M]	500	500	500	500
Konzentration Agonist [μ M]	20	100	0,6	1700
Quotient: $c_{\text{Genistein}} [\mu\text{M}] / c_{\text{Agonist}} [\mu\text{M}]$	25	5	833,3	0,29

In der Tabelle wurden die eingesetzten Genistein- und Agonistenkonzentrationen in μ M gegenübergestellt und der Quotient aus beiden errechnet. Gegebenenfalls wurden hierfür die Agonistenkonzentrationen auf μ M umgerechnet.

Tabelle 29. Verhältnis zwischen eingesetzten Genistein- und Agonistenkonzentrationen in anderen publizierten Studien

Testsubstanz	Kollagen	Kollagen
KONDO et al. (2002)		
Genistein [μM]	10	10
Konzentration Agonist [μM]	0,008	0,023
Quotient: $c_{\text{Genistein}} [\mu\text{M}] / c_{\text{Agonist}} [\mu\text{M}]$	1266	435
Genistein [μM]	30	30
Konzentration Agonist [μM]	0,008	0,023
Quotient: $c_{\text{Genistein}} [\mu\text{M}] / c_{\text{Agonist}} [\mu\text{M}]$	3750	1304
Genistein [μM]	100	100
Konzentration Agonist [μM]	0,008	0,023
Quotient: $c_{\text{Genistein}} [\mu\text{M}] / c_{\text{Agonist}} [\mu\text{M}]$	12658	4348
RIMBACH et al. (2004)		
Genistein [μM]	5	
Konzentration Agonist [μM]	0,012	
Quotient: $c_{\text{Genistein}} [\mu\text{M}] / c_{\text{Agonist}} [\mu\text{M}]$	417	
Genistein [μM]	25	
Konzentration Agonist [μM]	0,012	
Quotient: $c_{\text{Genistein}} [\mu\text{M}] / c_{\text{Agonist}} [\mu\text{M}]$	2083	
Genistein [μM]	50	
Konzentration Agonist [μM]	0,012	
Quotient: $c_{\text{Genistein}} [\mu\text{M}] / c_{\text{Agonist}} [\mu\text{M}]$	4167	

In der Tabelle wurden die eingesetzten Genistein- und Agonistenkonzentrationen in μM der Studien von KONDO et al. (2002) und RIMBACH et al. (2004) in der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation gegenübergestellt und der Quotient aus beiden errechnet. Gegebenenfalls wurden hierfür die Agonistenkonzentrationen auf μM umgerechnet.

Da es nur wenige Untersuchungen von Genistein auf die Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation gab, konnten die Quotienten, die sich aus den eingesetzten Genisteinkonzentrationen geteilt durch die Agonistenkonzentrationen berechneten, nur mit Kollagen als Agonist verglichen werden. In der vorliegenden Studie beliefen sich die Quotienten auf 167, 417 und 833 bei Genisteinkonzentrationen von 100 μM , 250 μM und 500 μM sowie einer Kollagenkonzentration von 0,6 μM (Tabelle 28, S. 120). Damit war das Verhältnis zwischen Genistein und Agonist in der vorliegenden Studie wesentlich niedriger als in den Untersu-

chungen von KONDO et al. (2002) und RIMBACH et al. (2004; Tabelle 29, S. 121). Es wurden somit – in Relation zum Agonisten – deutlich niedrigere Genisteinspiegel benötigt, um die entsprechenden thrombozytenhemmenden Effekte *in vitro* zu erzielen.

5.6 Physiologie der Proteine

5.6.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Nachdem das Protein im 19. Jahrhundert entdeckt wurde, ist seine Resorption intensiv erforscht worden. Die Meinung, Proteine würden vollständig im Darmlumen hydrolysiert und dann in Form von freien Aminosäuren vom Darm aufgenommen, war für lange Zeit vorherrschend (ADIBI, 1973). Erst seit ungefähr 30 Jahren ist bekannt, dass nicht nur Aminosäuren sondern auch Di- und Tripeptide weitere Spaltprodukte der mit der Nahrung zugeführten Proteine sind (ADIBI, 1973).

EMIL ABDERHALDEN äußerte diese Vermutung bereits Anfang des 20. Jahrhunderts (ABDERHALDEN, 1905). Arbeiten von ADIBI et al. bewiesen die Existenz einer entsprechenden Transportvorrichtung (ADIBI und MORSE, 1971; ADIBI und SOLEIMANPOUR, 1974). Durch ausgedehnte Studien wurde der Transporter PEPT 1 identifiziert (BOLL et al., 1994) und charakterisiert (Abbildung 3, S. 5; GANAPATHY und LEIBACH, 1985; GANAPATHY et al., 1987; THWAITES et al., 1994; ADIBI, 1997; FEI et al., 1998; DANIEL, 2004; BIEGEL et al., 2005; KLANG et al., 2005).

PEPT 1 ist, wie schon eingangs erwähnt, der bedeutendste Transporter und kann nicht nur in der Zellmembran, sondern auch intrazellulär in Lysosomen vorkommen (ZHOU et al., 2000). Wahrscheinlich existieren jedoch noch andere Transporter, die nicht mit dem PEPT 1 verwandt sind (ADIBI, 2003) und Di- oder Tripeptide transportieren können. PEPT 1 kann aber sequenzunabhängig alle 400 verschiedenen Dipeptide sowie alle 8000 verschiedenen Tripeptide, die aus den 20 proteinogenen Aminosäuren gebildet werden können, transportieren (ADIBI, 2003; KOTTRA et al., 2002; DANIEL und KOTTRA, 2004).

Nach der Aufnahme proteinreicher Nahrungsmittel werden die Sojaproteine enzymatisch in Hydrolysate gespalten und anschließend je nach Kapazität und Affinität des Peptidtransporters resorbiert.

Alle Dipeptide, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden und alleine oder in synergistischer Wechselwirkung mit Genistein die Thrombozytenfunktion modulierten, werden vermutlich mit unterschiedlichen Affinitäten zum PEPT 1 in die Mukosazelle hinein transportiert. Für diesen Transportvorgang sind die Ladungsverhältnisse der Di- und Tripeptide wichtig.

Einen bedeutsamen Beitrag zu diesem Thema stellt die Publikation von KOTTRA et al. (2002, Abbildung 54, S. 124) dar. Die Ergebnisse dieser Studie wurden durch die Untersuchungen von IRIE et al. (2005) ergänzt. Bei einem hohen pH-Wert werden vorrangig kationische Substrate transportiert. Bei einem neutralen pH-Wert werden zusätzlich neutrale Peptide transportiert, bei einem niedrigen pH-Wert jedoch nur negativ geladene Peptide transportiert. Diese negativ geladenen Dipeptide, wie die in Abbildung 54 (S. 124) dargestellten Dipeptide Gly-Asp oder Asp-Gly werden in Membrannähe protoniert, ehe sie transferiert werden können (KOTTRA et al., 2002). Es ist deshalb anzunehmen, dass die sauren Dipeptide Glu-Glu, Asp-Glu, Glu-Asp, Ser-Glu und Val-Asp entsprechend Protonen anlagern und anschließend durch PEPT 1 in neutraler Form transportiert werden, um intrazellulär die gewonnenen Protonen wieder abzugeben. PAN et al. (2001) wiesen Glu-Glu neben anderen Di- und Tripeptiden als Substrat des PEPT1 an isolierten Oozyten des Krallenfrosches nach. Arbeiten von KNÜTTER (2003) und DANIEL und KOTTRA (2004) befassten sich mit den strukturellen Anforderungen an Substraten und Inhibitoren apikaler H⁺/Peptidtransporter. Demnach wurden zum Beispiel Aminosäuren in D-Konfiguration schlechter transportiert als L-Aminosäuren. Auch die Aminogruppe am N-Terminus sowie die Carboxylgruppe am C-Terminus waren für eine gute Affinität zum Transporter wichtig (KNÜTTER, 2003). Die Peptidbindung selber musste in *trans*-Konformation vorliegen, wohingegen die bei Tripeptiden vorliegende zweite Peptidbindung nicht von Bedeutung war (KNÜTTER, 2003). Nach BRANDSCH et al. (1998) erkannte der Peptidtransporter PEPT 1 Unterschiede in der Peptidbindung. Fehlte außerdem eine Seitenkette, so verringerte sich die Affinität des Di- oder Tripeptids (KNÜTTER et al., 2003). Waren jedoch die Seitenketten geladen, so erhöhte sich die Transportkapazität insbesondere, wenn eine kationische Gruppe vorlag. Außerdem führte eine gesteigerte Hydrophobizität der Substanzen zu einer Erhöhung der Affinität zum Transporter (KNÜTTER et al., 2003). Aus diesen Gründen ist ebenfalls ein PEPT 1-abhängiger Transport der identifizierten Tripeptide Lys-Lys-Lys, Glu-Glu-Glu, Asp-Asp-Asp und Val-Pro-Leu wahrscheinlich.

Die Konzentrationen der Aminosäuren sind dagegen im Plasma sehr heterogen (Tabelle 30, S. 125). Demnach wurden im humanen Plasma zum Beispiel Konzentrationen von 270 µM Glycin, 326 µM Alanin 241 µM Glutamin gemessen (SILBERNAGEL, 1988). Andere Aminosäuren, wie Tyrosin (47 µM) oder Aspartat (2 µM) waren in viel niedrigeren Konzentrationen vorhanden. Von Glutamat sind „mittlere“ Konzentrationen von 72 µM bestimmt worden (SILBERNAGEL, 1988).

Leider gibt es nur wenige Studien, die die Plasmaspiegel von Di- und Tripeptiden nach Proteinaufnahme analysierten: Es ist nach der Untersuchung von ANAND et al. (2004) bekannt, dass zum Beispiel der Wirkstoff Acyclovir (z.B. im Medikament Zovirax[®]), welches gegen Herpesinfektionen eingesetzt wird, besser resorbierbar war, wenn es mit Val, Gly-Val oder Val-Val gekoppelt wurde.

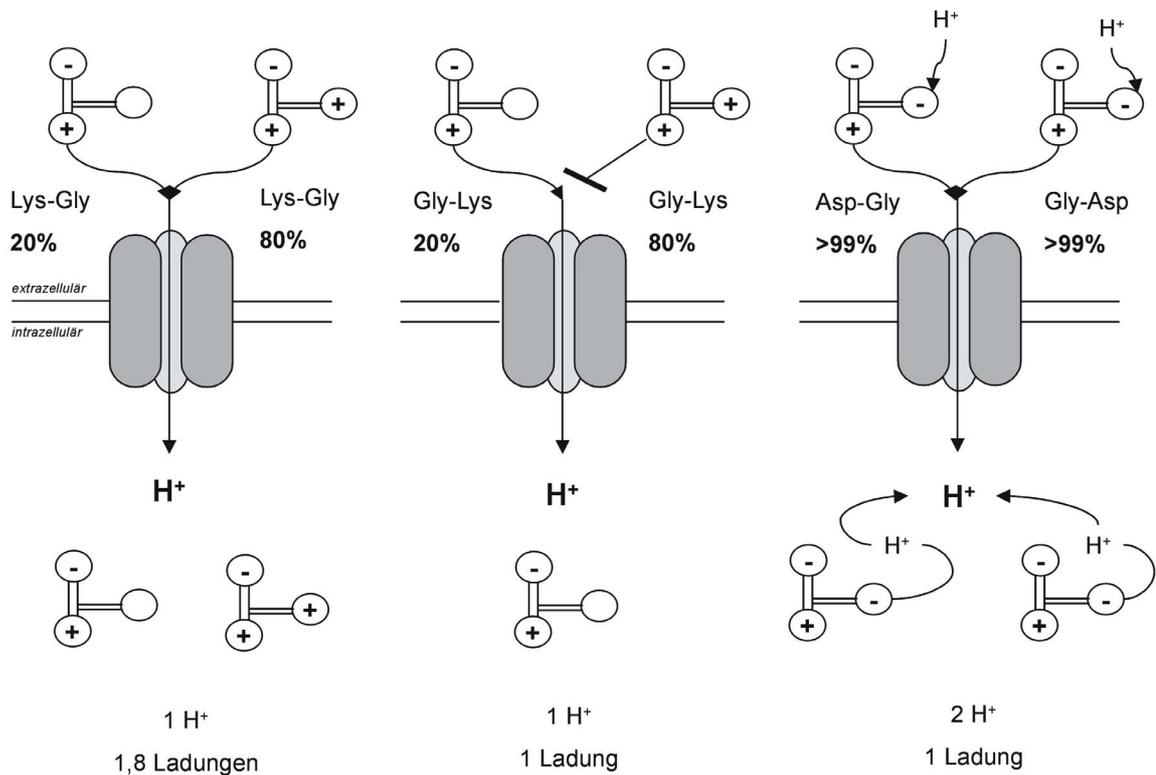


Abbildung 54. Schema nach KOTTRA et al. für den Transport von Dipeptiden durch den humanen Transporter PEPT 1 vom Darmlumen (extrazellulär) in die Mukosazelle (intrazellulär).

Die Innenbereiche des PEPT 1 können neutrale, carboxy-terminale Dipeptide oder Verbindungen, die eine positiv geladene Gruppe an der amino-terminalen Seite tragen, transportieren. Bei einem pH von 7,5 werden ungefähr 100 % von Lys-Gly jedoch nur 20 % von Gly-Lys als Substrate durch PEPT 1 transportiert. Grund ist ein pH abhängiger Transfer für Lys-Gly und ein höherer K_m -Wert für Gly-Lys. Peptide mit negativ geladenen Seitenketten werden in Membrannähe durch einen bestehenden Protonenrückfluss aus der Zelle protoniert und anschließend in neutraler Form transportiert. Das zusätzlich intrazellulär entstandene Proton bewirkt eine erhöhte Säurebildung auf der zytosolischen Seite. Die Grafik wurde nach KOTTRA et al. (2002) modifiziert.

5.6.2 Resorption und Metabolisierung von Sojaproteinen

Die Samen der Sojabohne enthalten mit ungefähr 40 % sehr hohe Mengen an Protein (Tabelle 25, S. 109). Besonders die 11S- und 7S-Proteine Glycinin und β -Conglycinin sind die Hauptkomponenten des Sojaproteins (SCHLERETH, 2001).

Di- und Tripeptide – auch aus Sojaprotein - sind folglich in der Lage, die Dünndarmbarriere zu überwinden. Spezielle Resorptionsstudien zur Bestimmung der Dipeptide aus Sojaproteinen und deren Konzentrationen im Plasma bzw. im Blut sind bisher nicht durchgeführt worden.

Welche Dipeptide nach sojaproteinreicher Nahrung im Plasma nachzuweisen sind, muss Gegenstand weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen sein.

In einer Resorptionsstudie der bioaktiven, im Muskelprotein vorkommende Substanz Carnosin (β -Alanyl-L-Histidin) von PARK et al. (2005) wurden den Probanden 200 g Rinderhack-

fleisch verabreicht, was ungefähr 124 g Carnosin pro 100 g Fleisch entsprach. Anschließend wurde die Konzentration von Carnosin im Plasma bestimmt. 2,5 h nach Nahrungsaufnahme wurden maximale Plasmakonzentrationen von 32,7 mg/mL Carnosin nachgewiesen (PARK et al., 2005).

Ähnliche Analysen sollten auch im Rahmen zukünftiger Studien zur Bestimmung bioaktiver Peptide im Plasma durchgeführt werden. Nach 12-stündiger Nahrungskarenz sollten die Probanden eine definierte soja-proteinhaltige Diät erhalten, um zu definierten Zeitpunkten den Anstieg der Di- oder Tripeptide im Plasma bestimmen zu können. Die Peptide könnten im Plasma mittels HPLC oder massenspektrometrisch identifiziert werden.

Eine proteinreiche Diät erhöht die Konzentration der Peptide im Darmlumen (FERRARIS et al., 1988). Im Tierexperiment von FERRARIS et al. (1988) wurde festgestellt, dass das Dipeptid L-Carnosin bei einer proteinreichen Diät durch den Verdauungstrakt besser transportiert wird als bei einer proteinarmen Diät. Die Autoren schlossen daraus, dass der Carnosintransport von der Aminosäure, Peptid- und Proteinkonzentration im Darm abhängig ist. Demnach wäre es möglich, dass bei einer sojaproteinreichen Nahrung die Konzentrationen an Dipeptiden im Darmlumen ansteigt und als Signal für eine Verstärkung der Genexpression des PEPT 1 fungiert (WALKER et al., 1998).

Tabelle 30. Humane Plasmakonzentrationen ausgewählter Aminosäuren

Aminosäuren	Plasmakonzentration [μ M]	Aminosäuren	Plasmakonzentration [μ M]
Alanin	326	Leucin	107
Arginin	88	Lysin	157
Aspartat	2	Methionin	18
Citrullin	25	Ornithin	69
Cystein	33	Phenylalanin	52
Glutamat	72	Prolin	178
Glutamin	241	Serin	124
Glycin	270	Taurin	79
Histidin	84	Threonin	143
1-Methylhistidin	9	Tyrosin	47
3-Methylhistidin	3	Valin	228
Isoleucin	59		

Dargestellt wurden unterschiedliche Konzentrationen an Aminosäuren im menschlichen Plasma. Die Tabelle wurde nach SILBERNAGEL (1988) modifiziert.

Es ist durch SHIRAGA et al. (1999) nachgewiesen worden, dass die Dipeptide Gly-Sar (ein nicht natives, hydrolysebeständiges Dipeptid), Gly-Phe, Phe-Val, Lys-Phe und Asp-Lys die Synthese des Transporters erhöhen können. Die einzelnen Aminosäuren Gly, Gln, Asp, Val und Ala ruften diesen Effekt im Gegensatz zu Lys, Arg und Phe nicht hervor (SHIRAGA et al., 1999). Daraus lässt sich schließen, dass eine proteinreiche Nahrungsaufnahme zu einer gesteigerten Expression der Peptidtransporter in der Bürstensaummembran der Mukosazellen führen kann. Dadurch wäre ein gesteigerter Peptidtransfer durch die Darmzelle möglich. Deshalb waren für die Analysen der Peptide nicht nur das gehäufte Auftreten der Substanzen in den Sojaproteinen Glycinin und β -Conglycinin wichtig, sondern auch der Aspekt der Resorbierbarkeit entscheidend.

Wichtig für die Bedeutung der Ergebnisse *in vivo* ist außerdem die Beantwortung der Frage, inwiefern die Peptide, die mit der Nahrung aufgenommen werden, tatsächlich in die Blutzirkulation eintreten können. Zwar ist dazu die Existenz des PEPT 1 auf der apikalen Seite der Darmzelle gesichert, jedoch wurde der transzelluläre Transport noch nicht ausreichend wissenschaftlich geklärt. Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es Hinweise auf das Vorhandensein von Transportproteinen in der basolateralen Membran (SHEPHERD et al., 2002), von denen bis jetzt keine gesicherten strukturellen Erkenntnisse vorliegen. Ob dieser basolaterale Transporter Protonen gekoppelt ist, wurde kontrovers diskutiert (SAITO und INUI, 1993; MATSUMOTO et al., 1994; TERADA et al., 1999).

5.7 Wirkungen der Sojaproteine

5.7.1 Wirkungen von Peptiden auf die Thrombozyten

In den nachfolgend erwähnten *in vitro* Studien zur Wirkung spezifischer Peptide aus Nahrungsproteinen wird die Frage der Resorbierbarkeit der Peptide als eine Voraussetzung für die Wirkung nach Nahrungsaufnahme nicht diskutiert und stand – im Gegensatz zu der vorliegenden Studie – nicht im Mittelpunkt der jeweiligen Fragestellungen.

Es ist zur Zeit wissenschaftlich nicht gesichert, dass Peptide mit mehr als 3 Aminosäuren die Darmbarriere überwinden können und im Blut erscheinen. Es ist anzunehmen, dass diese Oligopeptide in kleinere Sequenzen im Rahmen der Verdauungsprozesse enzymatisch gespalten werden. Zwar gibt es auf der Thrombozytenmembran zahlreiche Rezeptoren für endogen gebildete Peptide, z.B. TRAP oder Catecholamine die als Signalvermittler (z.B. Hormone) fungieren können (GERSZTENET et al., 1994; LANDESBERG et al., 2005). Jedoch spielen die endogen gebildeten Peptide in der Fragestellung der vorliegenden Studie keine zentrale Rolle. Deshalb standen die Untersuchungen mit Substanzen mit Vordergrund, die tatsächlich nach einer soja- und proteinreichen Nahrungszufuhr die Darmbarriere überwinden

können. Spezielle Peptidsequenzen aus Sojaproteinen, die die Thrombozytenaggregation beeinflussen, sind bisher nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Sojaproteine β -Conglycinin und Glycinin nach ihren Sequenzen aufgeteilt und die Dipeptide und Tripeptide herausgesucht, die am häufigsten im Sojaprotein vorkommen (Anhang, Tabelle 35). Deshalb können die nun folgenden Studien zwar nicht direkt mit den Ergebnissen dieser Studie verglichen werden, jedoch zeigen sie, dass gerade in der letzten Zeit die Wirkungen von Nahrungsproteinen intensiver erforscht werden und nach wie vor von wissenschaftlichen Interesse sind.

In der letzten Zeit wurde das Peptid Lunasin, eine aus 43 Aminosäuren bestehende Substanz der Sojabohne, welches auch in der Gerste vorkommt (DELUMEN; 2005), intensiv erforscht (GALVEZ et al., 2001). Es stellt das erste identifizierte, bioaktive Peptid des Sojaproteins dar. Thrombozytenhemmende Effekte sind bisher von Lunasin nicht beschrieben worden. Dagegen werden derzeit besonders die krebspräventiven Wirkungen untersucht (GALVEZ et al., 2001; DELUMEN, 2005). Lunasin unterbindet die Azetylierung der Histone im Zellkern von Mammakarzinomzellen und initiiert dadurch den Zelltod (DELUMEN, 2005). Eine mögliche *in vivo* Wirkung des Lunasins auf die Aggregation der Thrombozyten ist auf Grund der langen Kettenlänge dieses Peptids ungewiss, da es im Gastrointestinaltrakt in kleine Peptidbruchstücke gespalten werden würde. Am Carboxylende des Lunasins befinden sich 9 Asp sowie die Sequenz Arg-Gly-Asp. Arg-Gly-Asp wurde bereits in verschiedenen Proteinen und Peptiden anderer Lebewesen (z.B. Halysin, Trigamin, Lebetin, Rhodostomin aus Schlangengiften) als die thrombozyteninhibierende Sequenz des GP IIb/IIIa Rezeptors identifiziert (HUANG et al., 1991; KINI und CHOW, 2001; MARRAKCHI et al., 2001). Als eine weitere thrombozyteninhibierende Substanz der Sojabohne wurde 1-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydro- β -Carbolin identifiziert, welche aus einem Extrakt der Sojasauce isoliert wurde (TSUCHIYA et al., 1999).

Weitere Proteine, z.B. aus der Milch, wurden ebenso als Hemmstoffe der Aggregation identifiziert: So wiesen QIAN et al. (1995a) die Wirkung des Laktoferrins auf die Thrombin-induzierte Thrombozytenaggregation *in vitro* nach. Dazu wurde Laktoferrin und deren durch Pepsin hergestelltes Hydrolysat der Thrombozytensuspension vor Thrombinaktivierung (Konzentration 0,25 U/mL) zugesetzt. Die Autoren beobachteten eine dosisabhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation sowohl durch Laktoferrin als auch durch seine Pepsinhydrolysate. Eine anschließende chromatographische Bestimmung dieser Hydrolysate ergab ein inhibitorisches Peptid mit der Anfangssequenz Arg-Lys-Leu-Gly-Arg-Pro-Leu. Da jedoch durch einen Pepsinverdau Peptide mit unterschiedlichen Sequenzen und Größen bzw. Längen entstehen, wurde in der Studie von QIAN et al. (1995a) der Thrombozytensuspension keine Reinsubstanz, sondern ein Gemisch zugesetzt. In der vorliegenden Studie jedoch wurde dagegen in jedem Versuchsansatz Peptide definierter Sequenz und Konzentration zugesetzt. Ein Vergleich mit den Ergebnissen von QIAN et al. (1995a) ist deshalb nicht möglich.

Laktoferrinrezeptoren wurden jedoch in verschiedenen Zellen wie Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und in Blutplättchen nachgewiesen (LEVEUGLE et al., 1993; MANEVA et al., 1993; QIAN et al., 1995a).

Das Kasoplatelin und Kasopiastrin aus dem κ -Kasein der Milch hemmten die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation und die Bindung des Fibrinogens an die λ -Kette des GPIIb/IIIa Rezeptors (QIAN et al., 1995b; CLARE und SWAISGOOD, 2000). Die Peptidsequenzen Lys-Asp-Gln-Asp-Lys, Thr-Ala-Gln-Val-Tyr-Ser-Tyr-Glu-Val und Gln-Val-Tyr-Ser-Tyr-Glu-Val aus dem κ -Kasein der Schafmilch hemmten die Thrombin-induzierte Aggregation der Thrombozyten (QIAN et al., 1995b). Ein Vergleich der Ergebnisse mit der Studie von QIAN et al. (1995b) ist nicht möglich, da die Thrombin-induzierte Thrombozytenaggregation nicht im Rahmen der vorliegenden Studie untersucht wurde.

In vitro Arbeiten von WANG et al. (2004) belegten, dass das synthetische Peptid Polyaspartoyl-L-Arginin (PDR) bei oraler und intravenöser Injektion die ADP (1-5 mol/L)-, Kollagen (40-50 mg/L)- und Thrombin (60-70 U/L)-induzierten Aggregationen hemmten. Die Aggregation wurde ebenso wie in der vorliegenden Studie nach der Methode von BORN durchgeführt. Im Vergleich zu der vorliegenden Untersuchung wurden in der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation höhere ADP-Konzentrationen und geringfügig niedrigere Kollagenkonzentrationen verwendet. Da das PDR oral oder intravenös den Versuchstieren gegeben wurde, richtete sich die Konzentration der Testsubstanz nach dem Körpergewicht der Versuchstiere (15 mg/kg KG, 30 mg/kg KG, 60 mg/kg KG). In der vorliegenden Untersuchung wurden den Probanden oral keine Substanzen verabreicht, sondern die Testsubstanzen dem plättchenreichen Plasma nach der Blutabnahme zugegeben und anschließend die Aggregation beobachtet. Auf Grund der genannten Unterschiede im Studiendesign sind die Ergebnisse von WANG et al. (2004) nicht mit den Ergebnissen der aktuellen Arbeit vergleichbar.

In keiner Publikation wurden die in dieser Studie identifizierten bioaktiven Peptide als Modulatoren der Thrombozyten oder anderer biologischer Systeme identifiziert bzw. beschrieben.

Auffällig war, dass Genistein besonders in Verbindung mit glutamathaltigen Molekülen wirkte. Peptide, die häufig die Aminosäure Glutamat enthalten, sind als Sequenzelemente von Peptidhormonen oder Proteinen weit verbreitet: So sind sie Bestandteile des Hormons Gastrin (BUNDGAARD et al., 1997) und zudem Strukturbausteine von Natriumkanälen (VORA et al., 2005). Intestinale Zellen benutzen ferner Glutamat in größeren Mengen für ihre Alanin-, Laktat-, Prolin- oder Glutaminsynthese (REEDS et al., 2000). Nicht zuletzt ist die Aminosäure Glutamat ein Botenstoff des Gehirns, für den spezielle Glutamatrezeptoren im Gehirn vorhanden sind. Ferner befinden sich auf Lymphozyten Glutamatrezeptoren, wobei die Dipeptide Glu-Glu, Ala-Glu-Glu sowie Glu-Glu-Ala mit Glu um die Rezeptorbindung konkurrieren

(KOSTAVAN et al., 1997).

Da auf Lymphozyten Glutamatrezeptoren existieren, kann vermutet werden, dass derartige Rezeptoren möglicherweise auch auf der Membran der Thrombozyten exprimiert werden. Auf Thrombozyten befinden sich natriumabhängige Transporter, die in ähnlicher Form auch im Gehirn vorkommen (BEGNI et al., 2005; HOOGLAND et al., 2005). Dazu zählen EAAT 1, EAAT 2 und EAAT 3 (*Excitatory Amino Acid Transporter*), wobei EAAT 2 in der Plättchenmembran am häufigsten vertreten ist (HOOGLAND et al., 2005). Die Arbeit von HOOGLAND et al. (2005) deutete ferner darauf hin, dass der Glutamattransporter EAAT 2 in den α -Granula der Plättchen lokalisiert ist und durch eine Thrombinaktivierung freigesetzt werden kann. Durch ALIPRANDI et al. (2005) wurde festgestellt, dass nach einem Schlaganfall die Glutamatkonzentration im Plasma stark ansteigt, da Thrombozyten nach Aktivierung ihre Glutamatreserven an das Blut abgeben. Es ist daher davon auszugehen, dass Glutamat durch die genannten Transporter entweder das Zellinnere der Thrombozyten erreichen oder an Rezeptorsysteme der Thrombozyten binden kann. Daraus ergeben sich vor allem für die Diskussion der synergistischen Wechselwirkungen zwischen Genistein und besonders den sauren Dipeptiden wichtige Konsequenzen. Eine Hypothese zum Wirkmechanismus könnte sein, dass Glutamat mit weiteren Glu-enthaltenden Di- und Tripeptiden um die Bindung an den Glutamatrezeptor auf der Thrombozytenmembran konkurriert. Über rezeptorvermittelte Signalkaskaden könnten so intrazellulär Aktivierungsreaktionen gehemmt werden. Denkbar wäre ebenso ein Transport der bioaktiven Verbindungen über membranständige Glutamattransporter in das Zellinnere.

5.7.2 Vergleich der eingesetzten Peptidkonzentrationen mit denen anderer publizierten Studien

In der vorliegenden Arbeit wurden mit einheitlichen Peptidkonzentrationen von 1 mM gearbeitet. Da Aminosäuren im Wesentlichen die Thrombozytenaggregation nicht beeinflussten, werden im Folgenden nur die Peptidkonzentrationen der aktuellen Untersuchung mit denen anderer Studien verglichen. Peptide des Sojaproteins wurden bisher nicht aggregometrisch untersucht. Ein Vergleich mit Sojapeptiden ist daher nicht möglich. Die meisten Peptide, von denen eine hemmende Wirkung ausging, wurden anhand der Thrombin-induzierten Thrombozytenaggregation, die in der vorliegenden Studie nicht gemessen wurde, analysiert. Nur in der Studie von WANG et al. (2004), die die Wirkung des synthetischen Peptids PDR unter anderem auf die ADP- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregationen untersuchten, wurde ein vergleichbarer Studienaufbau zur Aggregometrie genutzt. Ein direkter Vergleich mit der Arbeit von WANG et al. (2004) ist jedoch nicht möglich, da das Peptid oral bzw. intravenös gegeben wurde.

5.8 Wechselwirkungen zwischen Genistein und Aminosäuren bzw. Peptiden

Die *in vitro* Untersuchungen an Thrombozyten gesunder Probanden zeigen, dass durch synergistische Wechselwirkungen vor allem zwischen sauren Dipeptiden und dem Isoflavon Genistein eine deutliche Hemmung der besonders durch ADP und Arachidonsäure ausgelösten Thrombozytenaggregationen hervorgerufen wurden. Wurde Arachidonsäure als Agonist benutzt, reichten sogar 1 nM Peptidkonzentrationen aus, um zusammen mit Genistein einen Hemmeffekt auszulösen (Tabelle 31, S. 131). Saure Peptide spielten daher in der Wirkung zusammen mit Genistein eine entscheidende Rolle. Diese Beobachtungen galten für Herzgesunde und für Patienten mit KHK und/oder Vorhofflimmern.

Da die in der vorliegenden Studie nachgewiesenen synergistischen Wechselwirkungen bisher nicht nachgewiesen wurden, können sie zum einen in Bezug auf die Interaktionspartner Genistein und Peptidsequenzen aus Sojaprotein nicht mit anderen Studien verglichen werden; zum anderen wurde in keiner bisher publizierten Studie eine potenzielle Interaktion zwischen verschiedenen Substanzen auf den biologischen Effekt – Hemmung der Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen – beschrieben.

Synergistische Wechselwirkungen sind allerdings zwischen anderen Substanzen – zum Beispiel zwischen verschiedenen Flavanolen oder Flavonoiden – in anderen biologischen Systemen beschrieben worden (RAVINDRANATH et al., 2004): So hemmten Quercetin und Kämpferol synergistisch die Zellproliferation humaner Krebszellen (ACKLAND et al., 2005). Genistein hemmte zusammen mit der biologisch aktiven Form des Vitamin D, des 1- α -25-Dihydroxycholecalciferols (RAO et al., 2002), Camptothecin (PAPAZISIS et al., 2005) oder zusammen mit 5-Fluorouracil (HWANG et al., 2005) das Wachstum verschiedener Krebszelllinien. Außerdem wirkte Genistein zusammen mit Zink synergistisch auf die Förderung des Knochenaufbaus durch eine Aktivierung der alkalischen Phosphatase (YAMAGUCHI et al., 2000).

Tabelle 31. Synergistische Wechselwirkungen unterschiedlicher Substanzen mit Genistein auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen

Verbindung	ADP	Adrenalin	Kollagen	Arachidonsäure ¹⁾
Asn			+	
Glu				+
Glu-Glu	+		+	+, ++
Asp-Glu	+			+, ++
Asp-Asp				+
Glu-Asp	+	+	+	
Ser-Glu				+
Val-Asp				+
Glu-Glu-Glu			+	+, ++, +++
Lys-Lys-Lys	+			
Val-Pro-Leu	+			
Asp-Asp-Asp	+		+	+, ++

Synergistisch mit 250 µM Genistein wirkende Verbindungen in unterschiedlichen Konzentrationen (+ 1 mM, ++ 1 µM, +++ 1 nM) auf die ADP, Adrenalin, Kollagen und Arachidonsäure induzierten Thrombozytenaggregationen, Signifikanz $p < 0,05$. ¹⁾ Die Darstellung synergistischer Wechselwirkungen erfolgte bei der Arachidonsäure als Agonist bei variablen Genisteinkonzentrationen.

5.9 Übertragbarkeit der *in vitro* erhobenen Befunde auf *in vivo* Bedingungen

Die aktuellen Ergebnisse zeigen jedoch für den gesunden Menschen eine neue Möglichkeit auf, einer koronaren Herzerkrankung oder einem Vorhofflimmern entgegenzuwirken. Mittels einer sojaproteinreichen Ernährung könnten die Thrombozyten in einem niedrigen Aktivierungszustand gehalten werden, ohne die Thrombozytenfunktion oder die Gerinnung außer Kraft zu setzen. Derzeit sind zur Selbstmedikation zahlreiche flavonoidhaltige Präparate in Drogerien und Reformhäusern beispielsweise zur Behandlung klimakterischer Beschwerden im Handel erhältlich.

Die kardioprotektive Wirkung von Inhaltsstoffen der Sojabohnen und ihre gesundheitspolitische Bedeutung ist nachgewiesen worden (ANDERSON et al., 1995). In zahlreichen Untersuchungen wurde festgestellt, dass eine sojareiche Ernährung zu günstigen Lipidprofilen führte (ANDERSON et al., 1995). Sojareiche Ernährung wirkt also über eine Beeinflussung des Fettstoffwechsels kardioprotektiv, da hohe Cholesterinspiegel eine Manifestation der Atherosklerose mit ihren Folgeerkrankungen begünstigen können (siehe Kapitel 1.2.3).

ANDERSON et al. (1995) berechneten in einer Metaanalyse von 38 klinischen Studien, die Wirkung der Sojaisoflavone auf den Lipidstoffwechsel und stellten fest, dass das Gesamt-

cholesterin um 9,3 %, das LDL-Cholesterin um 12,9 % und die Triglyceride um 10,5 % reduziert werden konnten, wobei das HDL-Cholesterin keinen Veränderungen unterlegen war.

Es soll an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen werden, dass es Studien gibt, die eine Verbesserung des Lipidprofils durch Sojaprotein nur bei gleichzeitiger Einnahme reiner Isoflavone beobachten (NESTEL et al., 1997; HODGSON et al., 1998). Das bedeutet, dass Isoflavone mit Proteinen gemeinsam auf den Cholesterinspiegel wirkten. Doch Studien zur Hemmung der Thrombozytenfunktion, d.h. zu einer Hemmung durch Inhaltsstoffe der Sojabohne fehlten bislang. In der vorliegenden Studie besteht somit eine Analogie in der gemeinsamen Wechselwirkung von Genistein und Peptiden auf die Thrombozytenfunktion zu den Studien von NESTEL et al. (1997) und HODGSON (1998).

Durch die thrombozytenhemmenden Wirkungen des Genisteins, der identifizierten Peptidsubstanzen und der gemeinsamen synergistischen Wechselwirkung wurde in der vorliegenden Studie ein neuer Ansatz zur Kardioprotektion geschaffen. Die Existenz synergistischer Wechselbeziehungen sojaproteinreicher Nahrungskomponenten im Plasma gesunder Probanden und herzkranker Patienten lieferten den ersten Beweis, dass in einem physiologischen Milieu eine Modulation der Thrombozytenaggregation möglich ist. Die gewonnenen Ergebnisse sind die Basis für nachfolgende *in vivo* Experimente.

Falls die hier *in vitro* erhobenen Befunde sich auf *in vivo* Bedingungen übertragen lassen, sind für die biologische Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse 4 Aspekte hervorzuheben: (1) Die synergistischen Wechselwirkungen stellen eine Grundlage für primäre Präventionsmaßnahmen zur Vorbeugung gesteigerter Thrombozytenaggregationen dar, die eine Manifestation von Herzerkrankungen verursachen oder begünstigen könnten. (2) Für die Therapie von Herzerkrankungen sind die erhobenen Befunde eine weitere Möglichkeit, Patienten mit KHK und/oder Vorhofflimmern mit einem genistein- und peptidhaltigen Medikament zur Vorbeugung nachfolgender Komplikationen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall zu behandeln und stellen damit ein Beitrag zur sekundären Prävention von Herzerkrankungen dar. (3) Eine weitere Möglichkeit besteht in der Entwicklung eines Kombinationspräparates aus etablierten Thrombozyten-aggregationshemmstoffen mit einem Präparat aus Genistein und Di- und Tripeptiden in der Behandlung von Herzerkrankungen. Eine ausreichende Bioverfügbarkeit ist allerdings eine unabdingbare Voraussetzung für die therapeutische Wirksamkeit der bioaktiven Moleküle in der Sojabohne. (4) Durch die in der vorliegenden Studie optimiertere durchflusszytometrische Methode durch die Markierung aktivierter Thrombozyten mit den spezifischen Antikörpern CD 62/PAC-1FITC/CD 41aPerCP wäre ein verbessertes Monitoring für die Diagnose und Therapie vor allem des Vorhofflimmerns gegeben.

Um zu überprüfen, inwieweit sich die in der vorliegenden Studie erhobenen Befunde auf *in vivo* Bedingungen übertragen lassen, ist die Durchführung weiterer Untersuchungen an ge-

sunden Probanden und herzkranken Patienten unverzichtbar. *In vivo* wären kurzzeitige oder langzeitige Effekte der einzelnen oder in synergistischer Weise mit Genistein wirkenden bioaktiven Peptide denkbar.

Um daher die Wirkung der in der vorliegenden Studie identifizierten bioaktiven Substanzen *in vivo* zu überprüfen, sollten die Versuche analog zur vorliegenden Studie an gesunden Probanden und an Patienten mit einem Vorhofflimmern und/oder einer KHK durchgeführt werden.

Kurzzeiteffekte:

Zur Überprüfung der Kurzzeiteffekte sollten daher die 3 Studienpopulationen (gesunde Probanden, VHF, KHK) in 4 Untergruppen aufgeteilt werden (Tabelle 32, S. 134): Placebogruppe, Peptidgruppe, Genisteingruppe sowie Peptid-Genisteingruppe. Um valide Daten zu erhalten, sollte jede Untergruppe jeweils aus mindestens 15 Personen bestehen. Auf Grund der Resorptionskinetik des Genisteins (1. Peak nach 2 h, 2. Peak nach 6 bis 8 h; BUSBY et al., 2002; ZUBIK und MEYDANI, 2003) sollte ferner ein Untersuchungszeitraum von jeweils 8 h mit zunächst 5 Blutentnahmen (vor Gabe bzw. 1, 2, 4 und 8 h nach Gabe der Substanzen) eingeplant werden. Unmittelbar nach den Blutentnahmen sollten die aggregometrischen Analysen mit physiologischen Induktoren der Thrombozytenaggregation erfolgen. Neben ADP, Adrenalin, Kollagen und Arachidonsäure könnte auch Thrombin als Agonisten eingesetzt werden. Dazu wären jedoch weitere aggregometrische Vorversuche *in vitro* nötig, da Thrombin als Agonist nicht in den aktuellen Untersuchungen eingesetzt wurde.

An gesunden Probanden könnten alle die in der vorliegenden Studie verwendeten Induktoren eingesetzt werden. Die aggregometrischen Analysen von KHK- und VHF-Patienten könnten jedoch nur mit den Agonisten ADP und Kollagen durchgeführt werden, da sich in der vorliegenden Studie gezeigt hat, dass auf Grund der Medikation die agonistenspezifischen Aggregationen herzkranker Patienten nicht mit jedem Induktor überprüft werden können.

Mittels der Durchflusszytometrie wurde in der vorliegenden Studie nachgewiesen, dass Patienten mit VHF chronisch aktivierte Thrombozyten besitzen. Es ist deshalb auch wichtig, neben der Aggregometrie die Funktionalität der Thrombozyten mit spezifischen Markern (P-Selektin, Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate, PAC-1, LIBS) durchflusszytometrisch zu charakterisieren. Weiterhin könnte die Bestimmung thrombozytärer Sekretionsmarker (Thromboxan B₂, P-Selektin, PF 4 und β -Thromboglobulin) ein zentraler Bestandteil der Studie sein.

Zur Beurteilung der Effekte wären die Bestimmungen der Plasmakonzentrationen des Genisteins und der Peptide essenziell. Genistein und Aminosäuren bzw. Peptide könnten chro-

matographisch (HPLC) und/oder massenspektrometrisch (GC-MS) analysiert werden (BUSBY et al., 2002; ZUBIK und MEYDANI, 2003).

Langzeiteffekte:

Substanzen, die sich in der Analyse der Kurzzeiteffekte als wirksam erweisen, sollten in den Untersuchungen zur Überprüfung von Langzeiteffekten eingesetzt werden.

In Analogie zur Analyse der Kurzzeiteffekte müssten ebenfalls die 3 Studienpopulationen in Abhängigkeit von der Substanzzufuhr in 4 Gruppen unterteilt werden. Auch hier sollte die Gruppenstärke jeweils mindestens 15 Personen betragen (Tabelle 32). Es wäre wünschenswert, wenn die Probanden die Substanzen täglich zu sich nähmen. Die tägliche Ernährung sollte zwar einer mitteleuropäischen Kost entsprechen, jedoch sollten proteinreiche und besonders flavonoidreiche Lebensmittel nicht oder nur in geringen Mengen verzehrt werden. Um zum Beispiel die tägliche Proteinaufnahme überprüfen zu können, sollte jeder Proband ein Ernährungsprotokoll mitführen.

Wie schon bei der Beschreibung der Kurzzeiteffekte würden auch hier die Thrombozytenfunktion aggregometrisch, durchflusszytometrisch und anhand thrombozytärer Sekretionsmarker charakterisiert. Ferner sollte auch in der Überprüfung der Langzeiteffekte die Genistein- und Peptidkonzentrationen im Plasma chromatographisch oder massenspektrometrisch bestimmt werden.

Tabelle 32. Theoretischer Aufbau einer nachfolgenden *in vivo* Studie zur Überprüfung der *in vitro* erhaltenen Befunde bioaktiver Substanzen

	Einteilung der Kollektive Gesunde, VHF, KHK in Untergruppen			
	Untergruppe 1	Untergruppe 2	Untergruppe 3	Untergruppe 4
	Einnahme von Placebo	Einnahme des Peptids	Einnahme von Genistein	Einnahme von Genistein und Peptid
Kurz- und Langzeiteffekte				
Substanz	Träger- substanz	z.B. Glu-Glu	Genistein	z.B. Glu-Glu + Genistein
Menge [g]	1,05	1	0,05	1,05
Anzahl der Probanden	15	15	15	15

In der Tabelle sind zur Überprüfung der Kurzzeit- und der Langzeiteffekte bioaktiver Substanzen die Personengruppen „Gesunde“, „KHK“ und „VHF“ in jeweils 4 Untergruppen unterteilt worden. Die Untergruppe 1 nimmt als Kontrolle ein Placebo (z.B. die Trägersubstanz) ein. Untergruppe 2 nimmt das Peptid alleine ein und die Untergruppe 3 Genistein alleine. Nur die Untergruppe 4 erhält das Gemisch aus Genistein und Peptid. Jeder Gruppe werden 15 Personen zugeordnet. In welcher Menge den Probanden die Substanzen verabreicht werden, ist in der Tabelle beispielhaft angegeben. Demnach sollen die Personen 1g des Peptids bzw. 50 mg des Genisteins erhalten.

Besonders bei der Überprüfung der Langzeiteffekte an Herzgesunden und Herzkranken ist die Überprüfung des thrombozytären Funktionszustandes essenziell. Mit der optimierten Markierungsmethode (CD 62/Pac-1/CD 41) der vorliegenden Studie wurde eine verbesserte methodische Grundlage geschaffen, chronisch aktivierte Thrombozyten präzise zu erfassen. Gerade die Langzeiteffekte bioaktiver Substanzen sollten Auswirkungen auf die Aktivierung der Thrombozyten besitzen. Die etablierte durchflusszytometrische Methode sollte daher als Prognosemarker zur Kontrolle der Effizienz der langfristigen sekundären Prävention vor allem bei Patienten mit Vorhofflimmern dienen zu können. Weitere thrombozytenspezifische Marker (P-Selektin, Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate, PAC-1, LIBS) oder die Analyse thrombozytärer Sekretionsmarker können zu einer weiteren Beurteilung der Blutplättchen gesunder und herzkranker Menschen herangezogen werden.

Besonders wichtig wären diese Erkenntnisse für die Primär- und Sekundärprävention herzkranker Patienten. Die zentrale Rolle der Thrombozyten bei der KHK ist bewiesen und im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingehend beschrieben worden. Azetylsalizylsäure (ASS) käme als einzige Substanz zur primären Prävention in Betracht. Gegen die langfristige Nutzung von ASS im Rahmen einer KHK-Primärprävention spricht jedoch die Vielzahl an Nebenwirkungen dieses Medikamentes (JENKINS et al., 2004). So hat zum Beispiel eine Metaanalyse ergeben, dass die Prävalenz von Asthma, welches durch ASS induziert werden kann, bei Erwachsenen 21 % beträgt (JENKINS et al., 2004). Außerdem ist der Einsatz von ASS zur Primärprophylaxe kardiovaskulärer Ereignisse wissenschaftlich nicht eindeutig belegt (WALTERING et al., 2005). WALTERING et al. (2005) kommen zu dem Schluss, dass derzeit keine Indikation für eine generelle Primärprophylaxe mit ASS bei Menschen ohne bekannte kardiovaskuläre Vorerkrankungen besteht. Zum Nachweis eines besonderen Nutzens für definierte Risikogruppen forderten die Autoren weitere prospektive, randomisierte und kontrollierte Endpunktstudien (WALTERING et al., 2005). Besonders herzkranken Patienten leben mit einem permanenten Risiko arterielle oder venöse Thrombosen zu erleiden, da ihre Blutplättchen chronisch aktiviert sind. KHK und Vorhofflimmern können zu schwerwiegenden klinischen Komplikationen mit letalem Ausgang (z.B. Herzinfarkt, Apoplex) führen. Aus diesem Grund ist es besonders für diese Patientengruppe wichtig, dass chronisch aktivierte Thrombozyten in ihrer Aktivität auf einen normalen Funktionszustand gedrosselt werden. Deshalb stellt die Erforschung antithrombozytärer Substanzen, wie sie mit der hier vorgestellten und geplanten Untersuchungen durchführbar wäre, einen wichtigen Schritt zur primären und zur sekundären Prävention der KHK dar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Thrombozyten spielen bei der Entstehung und Progression der koronaren Herzerkrankung (KHK) und dem Vorhofflimmern eine entscheidende Rolle. Untersuchungen zur Modulation der thrombozytären Funktion durch bioaktive Komponenten aus Soja fehlten bisher allerdings sowohl bei Gesunden als auch bei KHK-Patienten. Es sollte daher mithilfe einer umfangreichen Thrombozytenfunktionsdiagnostik aufgeklärt werden, ob Komponenten aus Soja über eine Hemmung der aktivierten Thrombozyten kardioprotektiv wirken können.

Für die aggregometrischen und durchflusszytometrischen Messungen wurden Probanden Vollblut entnommen und mit Citrat antikoaguliert. Bei den aggregometrischen Untersuchungen wurden Kollagen, ADP, Adrenalin und Arachidonsäure als physiologische Agonisten eingesetzt. Für die Charakterisierung der thrombozytären Aktivierung mittels Durchflusszytometrie wurden P-Selektin und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate und PAC-1 als Marker eingesetzt.

Im Zentrum der Untersuchungen standen zunächst Di- und Tripeptide, deren intestinale Resorption wissenschaftlich gesichert war und die besonders häufig in den Sojaproteinen β -Conglycinin und Glycinin vorkommen. Vor allem die aggregometrischen Analysen wurden nachfolgend auf eine Vielzahl von anderen Aminosäuren und Peptiden erweitert.

Die Untersuchungen belegen, dass einige Aminosäuren (Asn, Leu), Dipeptide (Glu-Glu, Val-Asp) und Tripeptide (Lys-Lys-Lys, Leu-Leu-Leu) allein die Plättchenaggregation hemmen oder stimulieren konnten (Tabelle 33, S. 137).

Ferner hemmte das Isoflavon Genistein – als ein weiterer Inhaltsstoff der Sojabohne – dosisabhängig die durch Kollagen-, ADP-, Adrenalin- und Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregationen.

Untersuchungen zu potenziellen Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Peptiden bzw. Aminosäuren und dem Isoflavon Genistein belegten eine synergistische Wechselwirkung zwischen Glu-Glu und Genistein auf die Inhibition der durch ADP- und Kollagen-induzierten Plättchenaggregationen. Bei strukturverwandten Peptiden bzw. Aminosäuren wurde ein Synergismus nur bei Induktion durch ADP (Asp-Glu, Glu-Asp) bzw. durch Kollagen (Glu-Asp, Glu-Glu-Glu, Asp-Asp-Asp) beobachtet. Hinsichtlich der Adrenalin-induzierten Thrombozytenaggregation zeigte sich einzig das Dipeptid Glu-Asp zusammen mit Genistein als synergistisch wirksam. Asn steigerte die Genistein-abhängige Hemmung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation.

Ein ausgeprägter synergistischer Effekt auf die Hemmung der Arachidonsäure-abhängigen Aggregation wurde zwischen Glu, Glu-Glu, Asp-Glu, Asp-Asp oder Glu-Glu-Glu bzw. Asp-

Asp-Asp einerseits und Genistein andererseits beobachtet (Tabelle 33). Dabei waren die Peptide schon in Konzentrationen von 1 μ M oder wie bei Glu-Glu-Glu in einer Konzentration von 1nM wirksam. Die Genisteinkonzentrationen, bei denen synergistische Effekte auftraten, unterlagen deutlichen inter-individuellen Schwankungen.

Die Untersuchungen an herzkranken Patienten weisen darauf hin, dass die (synergistischen) Hemmungen der Thrombozytenaktivierung wesentlich stärker als bei gesunden Probanden ausgeprägt sind. Außerdem konnte durchflusszytometrisch mithilfe spezifischer Aktivierungsmarker die Thrombozytenfunktion herzkranker Patienten charakterisiert werden, wobei Patienten mit einem Vorhofflimmern deutlich stärker aktivierte Thrombozyten aufwiesen als gesunde Probanden und Patienten mit einer KHK.

Tabelle 33. Zusammenfassende Darstellung der *in vitro* thrombozytenhemmenden bioaktiven Substanzen (eingeteilt nach Agonisten)

	ADP	Adrenalin	Kollagen	Arachidonsäure*
Bioaktive Substanzen				
Aminosäuren				Asn, Leu
Dipeptide	Glu-Glu Val-Asp	Val-Asp		
Tripeptide	Lys-Lys-Lys		Leu-Leu-Leu	
Synergistische Wechselwirkungen zwischen Genistein und bioaktiven Substanzen				
Aminosäuren			Asn	Glu
Dipeptide	Glu-Glu Asp-Glu Glu-Asp	Glu-Asp	Glu-Glu Glu-Asp	Glu-Glu Asp-Glu Asp-Asp Ser-Glu Val-Asp
Tripeptide	Val-Pro-Leu Asp-Asp-Asp Lys-Lys-Lys		Glu-Glu-Glu Asp-Asp-Asp	Glu-Glu-Glu Asp-Asp-Asp

In der Tabelle wurden die Substanzen aufgelistet, die die ADP-, Adrenalin-, Kollagen und/oder Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation alleine oder als Gemisch mit dem Isoflavon Genistein hemmten. Alle Aminosäuren, Di- und Tripeptide wurden in 1 mM und Genistein in 250 μ M Konzentrationen eingesetzt. * Nur bei Arachidonsäure als Agonist kamen inter-individuelle Genisteinkonzentrationen und Peptidkonzentrationen von 1 mM, 1 μ M oder 1nM zum Einsatz.

Die *in vitro* Untersuchungen an Thrombozyten gesunder Probanden zeigen, dass durch synergistische Wechselwirkungen vor allem zwischen sauren Dipeptiden und dem Isoflavon Genistein eine deutliche Hemmung der durch verschiedene physiologische Agonisten induzierten Thrombozytenaggregationen hervorgerufen wurde.

Die erzielten Ergebnisse erlauben die Vermutung, dass vor allem Patienten mit chronisch aktivierten Thrombozyten, wie es bei Patienten mit Vorhofflimmern der Fall ist, von diesen synergistischen Hemmungen der Plättchenaktivierung therapeutisch profitieren könnten.

6 SUMMARY

Scientific background. The leading cause of death in the United States and European countries is ischemic heart disease. Because high plasma concentrations of cholesterol are of the principal risk factors for atherosclerosis, the process of atherogenesis has been considered by many to consist largely of the accumulation of lipids within the arterial wall. However, research efforts of the last decade have presented clear evidence that it is much more than that. Despite changes in lifestyle and the use of new pharmacological approaches to lower plasma cholesterol concentrations, cardiovascular disease continues to be the principal cause of death in the United States and Europe. Moreover, it is possible to develop atherosclerosis even when the serum lipids and lipoproteins are within the normal range. Therefore, research efforts have been increasingly focused on the involvement of coagulation and fibrinolysis, inflammation and the pathobiology of the arterial wall also leading to the conclusion that platelets are not innocent bystanders in the development of atherosclerosis and coronary heart disease (CHD), but play a pivotal role in the pathogenesis and complications of these diseases. Highly potential anti-platelet drugs have been developed predominantly for preventing complications of CHD.

Dietary modification is the first step in preventing coronary heart disease. Dietary changes have been shown to modify risk factors of CHD such as elevated cholesterol and triglycerides. A meta-analysis of 38 clinical trials found that the consumption of soy protein reduced LDL cholesterol, triglycerides and slightly increased HDL cholesterol. It has not yet been fully established which components of soy are responsible for these beneficial effects on lipid metabolism. The effects of dietary patterns, specific foods, or nutrients on haemostatic and thrombotic variables are only poorly understood. With respect to soy, it has been observed (1) that the isoflavone genistein reduced *in vitro* platelet aggregation induced by collagen and inhibited thrombotic vessel occlusion in the mouse femoral artery (2) that components of the soy protein, enriched by alcohol extraction, promoted endothelium-modulated dilation and inhibited platelet aggregation or platelet release of vasoconstrictors in female rhesus monkeys, and (3) that a cooperative interaction between soy protein and its isoflavone-enriched fraction reduced blood platelet sensitivity in male Sprague-Dawley rats.

Regarding these anti-platelet activities of soy components, it is, of course, of considerable importance to identify these compounds in order to develop food supplements with profound anti-platelet activity. Therefore, it was the aim of the present study to identify such molecules predominantly by analysing *in vitro* aggregation of platelets from healthy volunteers and patients with coronary artery disease (CAD) and/or atrial fibrillation (AF). These analyses were focused on peptides in the absence and presence of isoflavones. Peptides had to fulfil two prerequisites: (i) Molecules had to be frequently found in two proteins of soy bean, i.e. gly-

cinin and β -conglycinin. (ii) They had to consist of no more than three amino acids, since studies on absorption of di- and tripeptides clearly indicate that these molecules are absorbed by intestinal peptide transporters such as PEPT 1. Although systematic studies on portovenous and systemic plasma levels of defined di- and tripeptides after intestinal absorption are missing so far, it can be speculated that absorption at least of high levels of these molecules might lead to their accumulation being sufficient to modulate platelet function.

Methods. From healthy volunteers (122 female and 56 male) and 38 patients with CAD and/or AF venous blood was taken. All individuals were evaluated with a structured questionnaire which provided information about health status. For platelet aggregation studies, venous blood was taken from healthy volunteers or patients, placed into acid-citrate anti-coagulant and centrifuged to yield platelet rich plasma (PRP). If necessary, PRP was diluted with platelet poor plasma (PPP). An aliquot of the supernatant was centrifuged again to obtain PPP. Thrombocytes were counted and platelet aggregation was measured by light transmission in a four-channel aggregometer. Platelets were stimulated with physiological agonists (ADP, epinephrine, collagen, and arachidonic acid). Platelets were also characterised by flow cytometry. The platelet specific activator TRAP-14 and a similar volume of buffered phosphate solution were added to venous whole blood, respectively. After addition of monoclonal antibodies (anti-CD41-PE, anti-CD45-FITC, anti-CD62-PE and/or anti-PAC-1 FITC) and incubation for 20 min, samples were fixed with 1% cold paraformaldehyde.

Results. (1) The majority of acidic, neutral, and basic amino acids and di- and tripeptides in concentrations of up to 2 mM did not modify platelet aggregation induced by collagen, ADP, epinephrine and arachidonic acid. Only the amino acids asparagine and leucine, the dipeptides glutamate-glutamate and valine-aspartate and the tripeptides lysine-lysine-lysine and leucine-leucine-leucine were able to slightly modify the agonist dependent platelet aggregation within a range of 10% compared to controls (Table 34, page 142). (2) Genistein inhibited platelet aggregation dose dependently, induced by collagen, ADP, epinephrine and arachidonic acid. (iii) Synergistic interactions were observed between genistein and various amino acids and peptides on the inhibition of platelet aggregation induced by ADP, epinephrine and collagen (Table 34, page 142): In the presence of the acidic peptide glutamate-aspartate (1 mM), genistein reduced collagen-, ADP-, and epinephrine-dependent thrombocyte activations stronger than 250 μ M of this isoflavone alone. Other peptides were less effective (glutamine, glutamate-glutamate, aspartate-glutamate, glutamate-glutamate-glutamate, aspartate-aspartate-aspartate, valine-proline-leucine, lysine-lysine-lysine) or ineffective (e.g. leucine-leucine-leucine; Table 34, page 142). (3) Glutamate-glutamate (1 μ M), aspartate-glutamate (1 μ M), and glutamate-glutamate-glutamate (1 nM) enhanced the inhibitory action of genistein on arachidonic acid induced platelet aggregation. Other amino acids were either ineffective (e.g. leucine-leucine-leucine, lysine-lysine-lysine) or higher concentrations of

amino acids or peptides (1 mM glutamate, 1 mM serine-glutamate, 1 mM valine-aspartate, 1 mM aspartate-aspartate, 1 mM aspartate-aspartate-aspartate) were required for synergistic interactions between these molecules and genistein on inhibition of platelet aggregation induced by arachidonic acid (Table 34, page 142). (4) A new flow cytometric procedure was established which predominantly allowed to clearly differentiate between the activation status of platelets from healthy controls and patients with atrial fibrillation.

Conclusion. The results of the present study allow the assumption that predominantly acidic peptides such as glutamate-glutamate, aspartate-glutamate, and glutamate-glutamate-glutamate might have a major impact on thrombocyte function by enhancing the inhibitory actions of genistein on platelet aggregation. Further *in vivo* studies are warranted to clarify whether bioactive peptides together with genistein are able to reduce platelet aggregability after oral ingestion of these compounds. Not only CAD patients, but especially patients with atrial fibrillation who have chronically activated platelets and suffer under the clearly increased risk of a potentially life threatening apoplexy would have a benefit of digestible molecules with profound anti-platelet activity and which are therefore able to tone down chronic platelet activation.

Table 34. Influence of bioactive amino acids or peptides \pm genistein on agonist induced platelet aggregation *in vitro*

	ADP	epinephrine	collagen	arachidonic acid*
bioactive substances				
amino acid				Asn, Leu
dipeptids	Glu-Glu Val-Asp	Val-Asp		
tripeptids	Lys-Lys-Lys		Leu-Leu-Leu	
synergistic interactions between genistein and bioactive substances				
amino acid			Asn	Glu
dipeptide	Glu-Glu Asp-Glu Glu-Asp	Glu-Asp	Glu-Glu Glu-Asp	Glu-Glu Asp-Glu Asp-Asp Ser-Glu Val-Asp
tripeptide	Val-Pro-Leu Asp-Asp-Asp Lys-Lys-Lys		Glu-Glu-Glu Asp-Asp-Asp	Glu-Glu-Glu Asp-Asp-Asp

Bioactive amino acids and peptides were listed in the table which inhibited – in the absence or presence of genistein – platelet aggregation induced by the physiological agonists ADP, epinephrine, collagen and arachidonic acid. When aggregations were induced by ADP, epinephrine or collagen, amino acids and peptides were analysed in a concentration of 1 mM and genistein in a plasma level of 250 μ M, respectively. With arachidonic acid as agonist bioactive amino acids and peptides were used with a concentration of 1mM with the exception of glutamate-glutamate (1 mM, 1 μ M), aspartate-glutamate (1 mM, 1 μ M) and aspartate-aspartate-aspartate (1 mM, 1 μ M) and glutamate-glutamate-glutamate (1 mM, 1 μ M, 1nM)

7 ANHANG

OTTO-VON-GUERICKE-UNIVERSITÄT MAGDEBURG
Medizinische Fakultät

Pathologische Biochemie
am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie

Leiter: Prof. Dr. Dr. A. Gardemann

Tel.: 0049-391-6713640

Fax: 0049-391-6713639

E-Mail: andreas.gardemann@medizin.uni-magdeburg.de



Universitätsklinikum • Leipziger Str. 44 • 39120 Magdeburg

Probandeninformation:

In den Industrienationen ist die Atherosklerose („Gefäßverkalkung“) die bedeutendste Todesursache. Klinisch tritt die Atherosklerose vor allem als koronare Herzkrankheit (KHK, „Verkalkung der Herzkranzgefäße“), als periphere arterielle Verschlusskrankheit und als Schlaganfall auf. Die KHK ist die häufigste tödliche Folgeerscheinung der atherosklerotischen Gefäßveränderungen. Verschiedene Faktoren wie z.B. das Lebensalter, das männliche Geschlecht, Fettstoffwechselstörungen, Rauchen, Diabetes mellitus, Bluthochdruck, und Fettsucht konnten als Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankung nachgewiesen werden.

Zusätzlich haben die Blutplättchen, die normalerweise zur Blutstillung benötigt werden, einen wesentlichen Anteil an der Entstehung und Fortentwicklung der Atherosklerose und damit auch der koronaren Herzkrankheit. Die Ergebnisse einiger wissenschaftlicher Untersuchungen erlauben die Vermutung, dass bestimmte Nahrungsbestandteile die Aktivität der Blutplättchen hemmen und damit schützend gegen die Verkalkung der Herzkranzgefäße wirken.

Es ist daher das Ziel unserer Studie, bestimmte Nahrungsbestandteile aus Sojaproteinen zu gewinnen, die einen derartigen aktivitätsvermindernden Einfluss auf die Blutplättchen ausüben und damit eine schützende Wirkung gegen die KHK haben. Dabei werden aus dem von Probanden einmalig entnommene Blut die Blutplättchen angereichert und die Gerinnungsaktivität dieser Plättchen jeweils in Abwesenheit und Gegenwart von definierten Inhaltsstoffen der Sojaproteine analysiert.

Die Ergebnisse dieser Studie werden wissenschaftlich ausgewertet. Die Teilnahme ist freiwillig. Sie unterliegen dem Datenschutz und der Vertraulichkeit.

Prof. Dr. Dr. A. Gardemann
(Pathologische Biochemie)

Abbildung 55. Probandeninformation.

Titel des Forschungsprojektes:

Wirken Nahrungsproteine wie Sojaprotein im Vergleich zu Casein unter besonderer Berücksichtigung bestimmter isolierter Peptidstrukturen kardioprotektiv durch Hemmung der thrombozytären Aktivierung?

Pathologische Biochemie am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie

Projektleiter: Prof. Dr. Dr. A. Gardemann

Name des Probanden:

Geburtsdatum:

Einwilligungserklärung

Mir ist bekannt, zu welchem Zweck die Untersuchungen erfolgen.

Zu dem Ablauf und den Risiken der einmaligen Blutentnahme konnte ich Fragen stellen. Die mir erteilten Informationen habe ich inhaltlich verstanden. Ich hatte angemessen Zeit, mich zu entscheiden.

Ich habe weiterhin verbindlich erfahren, dass die Ergebnisse aus meiner Untersuchung dem Datenschutz unterliegen und streng vertraulich behandelt werden.

Ich willige hiermit in die Entnahme der Blutprobe ein. Mir ist bekannt, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen kann.

.....
Ort

.....
Datum

.....
Unterschrift

Abbildung 56. Einverständniserklärung der Probanden.

Fragebogen: Probanden-Studie Thrombozytenfunktionsdiagnostik

Bitte füllen Sie den nachfolgenden Fragebogen durch Ankreuzen bzw. Ergänzen aus!

Alter:.....

Geschlecht:

männlich

weiblich

Gewicht:.....

Körpergröße:.....

Krankheiten:

Leiden Sie unter

Diabetes mellitus (Typ I u. II) ?

ja nein

Hypercholesterinämie ?

ja nein

Haben Sie in der letzten Woche Medikamente eingenommen ? ja

nein

Wenn ja, welche (z.B. Aspirin)?

.....

Mahlzeiten:

Haben Sie kurz vor der Blutabnahme (30 min) gegessen?

ja nein

Wenn ja, was?

.....

Sind Sie Vegetarier oder Veganer?

ja nein

Lebensgewohnheiten:

Sind Sie Vegetarier oder Veganer?

ja nein

Wenn ja, wie oft?

gelegentlich

häufig

sehr oft

Danke für Ihre Teilnahme!

Abbildung 57. Fragebogen.

 OTTO-VON-GUERICKE-UNIVERSITÄT MAGDEBURG

Medizinische Fakultät

Pathologische Biochemie

am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie

Leiter: Prof. Dr. Dr. A. Gardemann

Tel.: 0049-391-6713640

Fax: 0049-391-6713639

E-Mail: andreas.gardemann@medizin.uni-magdeburg.de



 Universitätsklinikum • Leipziger Str. 44 • 39120 Magdeburg

Patienteninformation zum Forschungsprojekt:

Synergistische Hemmung der thrombozytären Aktivierung durch saure Peptide und Genistein *in vitro*: Wirken diese Substanzen ebenfalls *in vivo* inhibitorisch auf die Plättchenaktivität und damit kardioprotektiv bei Gesunden und bei Kranken mit KHK bzw. Vorhofflimmern?

In den Industrienationen ist die Atherosklerose („Gefäßverkalkung“) die bedeutendste Todesursache. Klinisch tritt die Atherosklerose vor allem als koronare Herzkrankheit (KHK, „Verkalkung der Herzkranzgefäße“), als periphere arterielle Verschlusskrankheit und als Schlaganfall auf.

Neben der KHK stellen die Herzrhythmusstörungen ein erhebliches medizinisches Problem dar. Dabei leiden in der westlichen Bevölkerung mehr als 5% der Menschen, die älter als 65 Jahre alt sind, unter Vorhofflimmern. In Deutschland ist 1% der erwachsenen Bevölkerung betroffen, wobei sich die Häufigkeit des Vorhofflimmerns mit jedem Lebensjahrzehnt verdoppelt.

Sowohl bei der KHK als auch beim Vorhofflimmern haben die Blutplättchen, die normalerweise zur Blutstillung benötigt werden, einen wesentlichen Anteil daran, ob und in welchem Ausmaß Komplikationen dieser beiden Erkrankungen auftreten.

Es war und ist daher das Ziel unserer Studie, bestimmte Nahrungsbestandteile aus Sojaproteinen zu gewinnen, die einen hemmenden Einfluss auf die Blutplättchen ausüben und damit eine schützende Wirkung gegen die genannten Herzerkrankungen haben könnten. An Blutplättchen von gesunden Probanden konnten Substanzen aus Soja nachgewiesen werden, die tatsächlich die Aktivität der Blutplättchen mindern konnten. Wir möchten daher nun überprüfen, ob dieser schützende Effekt auch bei KHK-Patienten und bei Patienten mit Vorhofflimmern auftritt.

Wir benötigen für diese Untersuchungen etwa 30 ml Blut, aus dem die Blutplättchen gewonnen und analysiert werden können.

Die Ergebnisse der Studie werden wissenschaftlich ausgewertet und sind nicht für andere Zwecke bestimmt. Die Teilnahme ist freiwillig. Alle Resultate unterliegen dem Datenschutz und werden vertraulich behandelt. Die Anonymität ist gewährleistet.

Prof. Dr. Dr. A. Gardemann

PD Dr. med. A. Götte

Abbildung 58. Patienteninformation.

Titel des Forschungsprojektes:

Synergistische Hemmung der thrombozytären Aktivierung durch saure Peptide und Genistein *in vitro*: Wirken diese Substanzen ebenfalls *in vivo* inhibitorisch auf die Plättchenaktivität und damit kardioprotektiv bei Gesunden und bei Kranken mit KHK bzw. Vorhofflimmern?

Pathologische Biochemie am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie

Projektleiter: Prof. Dr. Dr. A. Gardemann, PD Dr. med. A. Götte

Name des Probanden:

Geburtsdatum:

Einwilligungserklärung

Mir ist bekannt, zu welchem Zweck die Untersuchungen erfolgen.

Zu dem Ablauf und den Risiken der einmaligen Blutentnahme konnte ich Fragen stellen. Die mir erteilten Informationen habe ich inhaltlich verstanden. Ich hatte angemessen Zeit, mich zu entscheiden.

Ich habe weiterhin verbindlich erfahren, dass die Ergebnisse aus meiner Untersuchung dem Datenschutz unterliegen und streng vertraulich behandelt werden.

Ich willige hiermit in die Entnahme der Blutprobe zur Thrombozyten- und Arzneimittelanalytik ein. Außerdem bin ich damit einverstanden, dass anamnestische Daten (Alter, Geschlecht, Vorerkrankungen, Medikation) im Rahmen der Studie und unter strikter Einhaltung des Datenschutzes erfasst werden. Mir ist bekannt, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen kann.

.....
Ort

.....
Datum

.....
Unterschrift

Abbildung 59. Einverständniserklärung der Patienten.

Tabelle 35. Häufig vorkommende Dipeptide in den Sojaproteinen β -Conglycinin und Glycinin

Dipeptide	Häufigkeit in β -Conglycinin	Häufigkeit in Glycinin	Gesamtanzahl
Glu-Glu	30	5	35
Gln-Gln	11	5	16
Glu-Asp	10	5	15
Ile-Leu	14	0	14
Asp-Glu	4	9	13
Pro-Arg	8	4	12
Asn-Leu	10	1	11
Phe-Leu	10	1	11
Leu-Gln	10	1	11
Ser-Glu	9	1	10
Glu-Gly	7	3	10
Glu-Gln	7	3	10
Leu-Arg	9	1	10

In der Tabelle wurden die Dipeptide aufgelistet, die in den Sojaproteinen β -Conglycinin und Glycinin zehnmal oder mehr als zehnmal vorkamen. Dipeptide, die in der Arbeit getestet wurden, sind in der Tabelle hellgrau unterlegt.

Tabelle 36. Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Aminosäuren in den ADP-induzierten Thrombozytenaggregationen bei gesunden Probanden

Substanz	Aggregation [%] Mittelwert \pm SD	n	Substanz vs. Kontrolle	Substanz-gemisch vs. Genistein	Substanz-gemisch vs. Aminosäure
Aminosäuren					
Kontrolle 1% DMSO	74,4 \pm 10,4	71			
Genistein	55,9 \pm 10,6	59	p = 0,000*		
Glu	71,3 \pm 15,8	6	p = 0,242		
Glu/Genistein	54,0 \pm 12,5	6		p = 0,012*	p = 0,528
Kontrolle 1% IK	74,8 \pm 8,67	55			
Genistein	56,5 \pm 11,7	54	p = 0,000*		
Asn	76,7 \pm 2,29	5	p = 0,532		
Asn/Genistein	64,4 \pm 6,55	5		p = 0,149	p = 0,032*
Gln	70,5 \pm 10,7	5	p = 0,498		
Gln/Genistein	61,5 \pm 7,96	5		p = 0,345	p = 0,310
Ile	73,9 \pm 9,73	6	p = 0,972		
Ile/Genistein	50,5 \pm 9,61	6		p = 0,219	p = 0,009*
Leu	72,6 \pm 4,95	5	p = 0,532		
Leu/Genistein	65,2 \pm 8,37	6		p = 0,229	p = 0,126
Arg	71,0 \pm 6,63	6	p = 0,335		
Arg/Genistein	51,9 \pm 6,40	6		p = 0,249	p = 0,004*
Lys	72,7 \pm 7,27	6	p = 0,500		
Lys/Genistein	55,8 \pm 9,97	6		p = 0,838	p = 0,015*
Pro	76,3 \pm 5,78	5	p = 0,515		
Pro/Genistein	51,8 \pm 9,87	5		p = 0,499	p = 0,016*
Kontrolle 4% IK	73,9 \pm 7,11	20			
Genistein	59,2 \pm 9,65	20	p = 0,000*		
Asp	75,0 \pm 6,98	5	p = 0,668		
Asp/Genistein	60,0 \pm 7,97	5		p = 0,974	p = 0,056
Kontrolle 5% IK	74,4 \pm 9,50	19			
Genistein	46,6 \pm 11,2	19	p = 0,000*		
Val	71,7 \pm 6,66	6	p = 0,555		
Val/Genistein	39,5 \pm 14,5	6		p = 0,002*	p = 0,366

In der Tabelle sind die Einflüsse der Aminosäuren auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation mit Mittelwerten \pm Standardabweichungen, n-Zahlen und Signifikanzen dargestellt. *Signifikanz $p < 0,05$. Ein Gemisch der Einzelsubstanzen aus Genistein und einer Aminosäure war dann synergistisch wirksam, wenn $p < 0,05$ sowohl gegenüber der Genisteinkontrolle als auch gegenüber der Aminosäure war.

Tabelle 37. Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Dipeptide in den ADP-induzierten Thrombozytenaggregationen bei gesunden Probanden

Substanz	Aggregation [%] Mittelwert \pm SD	n	Substanz vs. Kontrolle	Substanz-gemisch vs. Genistein	Substanz-gemisch vs. Dipeptid
Dipeptide					
Kontrolle 1% DMSO	74,4 \pm 10,4	71			
Genistein	55,9 \pm 10,6	59	p = 0,000*		
Glu-Glu	63,2 \pm 13,2	15	p = 0,002*		
Glu-Glu + Genistein	48,8 \pm 8,90	15		p = 0,011**	p = 0,002**
Asp-Glu	71,2 \pm 14,9	10	p = 0,455		
Asp-Glu + Genistein	45,9 \pm 13,4	12		p = 0,024**	p = 0,001**
Asp-Asp	79,1 \pm 12,6	7	p = 0,558		
Asp-Asp + Ge-	51,5 \pm 15,2	7		p = 0,405	p = 0,011*
Kontrolle 1% IK	74,8 \pm 8,67	55			
Genistein	56,5 \pm 11,7	54	p = 0,000*		
Ser-Glu	76,5 \pm 10,4	5	p = 0,515		
Ser-Glu/Genistein	52,2 \pm 10,4	5		p = 0,499	p = 0,016*
Ile-Leu	80,0 \pm 11,4	6	p = 0,465		
Ile-Leu/Genistein	63,2 \pm 14,7	6		p = 0,065	p = 0,239
Kontrolle 4% IK	73,9 \pm 7,11	20			
Genistein	59,2 \pm 9,65	20	p = 0,000*		
Glu-Asp	69,9 \pm 6,89	5	p = 0,530		
Glu-Asp/Genistein	45,6 \pm 4,87	5		p = 0,007**	p = 0,008**
Asp-Leu	77,4 \pm 3,80	5	p = 0,192		
Asp-Leu/Genistein	59,2 \pm 5,30	5		p = 0,974	p = 0,008*
Gln-Gln	71,9 \pm 10,5	5	p = 0,668		
Gln-Gln/Genistein	57,2 \pm 14,3	5		p = 0,222	p = 0,717
Kontrolle 5% IK	74,4 \pm 9,50	19			
Genistein	46,6 \pm 11,2	19	p = 0,000*		
Val-Asp	65,3 \pm 5,92	8	p = 0,025*		
Val-Asp/Genistein	43,4 \pm 11,5	8		p = 0,515	p = 0,001*

In der Tabelle sind die Einflüsse der Dipeptide auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation mit Mittelwerten \pm Standardabweichungen, n-Zahlen und Signifikanz dargestellt. *Signifikanz $p < 0,05$. Ein Gemisch der Einzelsubstanzen aus Genistein und einem Dipeptid war dann synergistisch wirksam, wenn $p < 0,05$ sowohl gegenüber der Genisteinkontrolle als auch gegenüber dem Peptids war. Diese Effekte wurden mit ** nach den p-Werten gekennzeichnet.

Tabelle 38. Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Tripeptide in den ADP-induzierten Thrombozytenaggregationen bei gesunden Probanden

Substanz	Aggregation [%] Mittelwert \pm SD	n	Substanz vs. Kontrolle	Substanz-gemisch vs. Genistein	Substanz-gemisch vs. Tripeptid
Tripeptide					
Kontrolle 1% DMSO	74,4 \pm 10,4	71			
Genistein	55,9 \pm 10,6	59	p = 0,000*		
Glu-Glu-Glu	73,2 \pm 15,7	9	p = 0,755		
Glu-Glu-Glu/Genistein	52,3 \pm 9,91	9		p = 0,315	p = 0,008*
Val-Pro-Leu	69,7 \pm 13,5	5	p = 0,807		
Val-Pro-Leu/Genistein	43,5 \pm 4,44	5		p = 0,002**	p = 0,032**
Asp-Asp-Asp	65,8 \pm 7,26	5	p = 0,074		
Asp-Asp-Asp/Genistein	33,9 \pm 6,05	5		p = 0,000**	p = 0,008**
Kontrolle 1% IK	74,8 \pm 8,67	55			
Genistein	56,5 \pm 11,7	54	p = 0,000*		
Lys-Lys-Lys	63,8 \pm 9,30	6	p = 0,009*		
Lys-Lys-Lys/Genistein	41,9 \pm 7,93	6		p = 0,003**	p = 0,009**
Kontrolle 5% IK	74,4 \pm 9,50	19			
Genistein	46,6 \pm 11,2	19	p = 0,000*		
Leu-Leu-Leu	84,1 \pm 5,43	5	p = 0,053		
Leu-Leu-Leu/Genistein	51,6 \pm 10,7	5		p = 0,297	p = 0,008*

In der Tabelle sind die Einflüsse der Tripeptide auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation mit Mittelwerten \pm Standardabweichungen, n-Zahlen und Signifikanzen dargestellt. *Signifikanz $p < 0,05$. Ein Gemisch der Einzelsubstanzen aus Genistein und einem Tripeptid war dann synergistisch wirksam, wenn $p < 0,05$ sowohl gegenüber der Genisteinkontrolle als auch gegenüber dem Peptids war. Diese Effekte wurden mit ** nach den p-Werten gekennzeichnet.

Tabelle 39. Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Aminosäuren in den Adrenalin-induzierten Thrombozytenaggregationen bei gesunden Probanden

Substanz	Aggregation [%] Mittelwert \pm SD	n	Substanz vs. Kontrolle	Substanz-gemisch vs. Genistein	Substanz-gemisch vs. Aminosäure
Aminosäuren					
Kontrolle 1% DMSO	74,7 \pm 8,45	58			
Genistein	32,5 \pm 23,1	48	p = 0,000*		
Glu	72,9 \pm 13,0	5	p = 0,326		
Glu/Genistein	13,4 \pm 6,25	5		p = 0,080	p = 0,008*
Kontrolle 1% IK	77,1 \pm 7,15	53			
Genistein	49,3 \pm 24,5	52	p = 0,000*		
Asn	75,9 \pm 2,65	5	p = 0,893		
Asn/Genistein	43,5 \pm 26,3	5		p = 0,593	p = 0,016*
Gln	70,9 \pm 5,90	5	p = 0,086		
Gln/Genistein	41,4 \pm 27,3	5		p = 0,483	p = 0,056
Ile	80,7 \pm 7,80	6	p = 0,383		
Ile/Genistein	48,7 \pm 23,7	6		p = 0,990	p = 0,026*
Leu	72,2 \pm 4,19	5	p = 0,138		
Leu/Genistein	60,3 \pm 21,1	6		p = 0,334	p = 0,329
Arg	73,7 \pm 2,93	5	p = 0,417		
Arg/Genistein	44,2 \pm 23,3	5		p = 0,671	p = 0,056
Lys	80,1 \pm 6,97	5	p = 0,387		
Lys/Genistein	58,3 \pm 16,7	5		p = 0,466	p = 0,056
Pro	80,3 \pm 5,09	6	p = 0,272		
Pro/Genistein	36,8 \pm 17,0	6		p = 0,212	p = 0,002*
Kontrolle 4% IK	77,3 \pm 5,26	20			
Genistein	40,2 \pm 24,4	20	p = 0,000*		
Asp	73,8 \pm 6,98	5	p = 0,336		
Asp/Genistein	42,0 \pm 27,5	5		p = 0,921	p = 0,222
Kontrolle 5% IK	79,5 \pm 7,72	19			
Genistein	52,1 \pm 21,0	19	p = 0,000*		
Val	78,7 \pm 3,06	5	p = 0,581		
Val/Genistein	48,8 \pm 23,2	5		p = 0,581	p = 0,008*

In der Tabelle sind die Einflüsse der Aminosäuren auf die Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation mit Mittelwerten \pm Standardabweichungen, n-Zahlen und Signifikanzen dargestellt. *Signifikanz p < 0,05. Ein Gemisch der Einzelsubstanzen aus Genistein und einer Aminosäure war dann synergistisch wirksam, wenn p < 0,05 sowohl gegenüber der Genisteinkontrolle als auch gegenüber der Aminosäure war.

Tabelle 40. Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Dipeptide in den Adrenalin-induzierten Thrombozytenaggregationen bei gesunden Probanden

Substanz	Aggregation [%] Mittelwert \pm SD	n	Substanz vs. Kontrolle	Substanz-gemisch vs. Genistein	Substanz-gemisch vs. Dipeptid
Dipeptide					
Kontrolle 1% DMSO	74,7 \pm 8,45	58			
Genistein	32,5 \pm 23,1	48	p = 0,000*		
Glu-Glu	72,0 \pm 8,44	9	p = 0,587		
Glu-Glu + Genistein	17,3 \pm 7,34	10		p = 0,097	p = 0,000*
Asp-Glu	69,0 \pm 15,0	7	p = 0,285		
Asp-Glu + Genistein	21,3 \pm 22,2	10		p = 0,104	p = 0,001*
Asp-Asp	78,4 \pm 8,00	5	p = 0,351		
Asp-Asp + Ge-	42,8 \pm 25,2	5		p = 0,397	p = 0,016*
Kontrolle 1% IK	77,1 \pm 7,15	53			
Genistein	49,3 \pm 24,5	52	p = 0,000*		
Ser-Glu	78,9 \pm 4,98	5	p = 0,535		
Ser-Glu/Genistein	33,2 \pm 20,6	5		p = 0,239	p = 0,016*
Ile-Leu	76,2 \pm 8,36	5	p = 0,590		
Ile-Leu/Genistein	50,2 \pm 29,5	5		p = 0,924	p = 0,151
Kontrolle 4% IK	77,3 \pm 5,26	20			
Genistein	40,2 \pm 24,4	20	p = 0,000*		
Glu-Asp	76,2 \pm 3,97	5	p = 0,767		
Glu-Asp/Genistein	15,3 \pm 11,0	5		p = 0,035**	p = 0,008**
Asp-Leu	78,2 \pm 4,85	5	p = 1,000		
Asp-Leu/Genistein	49,6 \pm 17,8	5		p = 0,530	p = 0,008*
Gln-Gln	74,1 \pm 4,99	5	p = 0,336		
Gln-Gln/Genistein	33,2 \pm 18,1	5		p = 0,575	p = 0,008*
Kontrolle 5% IK	79,5 \pm 7,72	19			
Genistein	52,1 \pm 21,0	19	p = 0,000*		
Val-Asp	71,6 \pm 5,28	9	p = 0,014*		
Val-Asp/Genistein	40,2 \pm 16,7	9		p = 0,285	p = 0,000*

In der Tabelle sind die Einflüsse der Dipeptide auf die Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation mit Mittelwerten \pm Standardabweichungen, n-Zahlen und Signifikanzen dargestellt. *Signifikanz p < 0,05. Ein Gemisch der Einzelsubstanzen aus Genistein und einem Dipeptid war dann synergistisch wirksam, wenn p < 0,05 sowohl gegenüber der Genisteinkontrolle als auch gegenüber dem Peptids war. Diese Effekte wurden mit ** nach den p-Werten gekennzeichnet.

Tabelle 41. Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Tripeptide in den Adrenalin-induzierten Thrombozytenaggregationen bei gesunden Probanden

Substanz	Aggregation [%] Mittelwert \pm SD	n	Substanz vs. Kontrolle	Substanz-gemisch vs. Genistein	Substanz-gemisch vs. Tripeptid
Tripeptide					
Kontrolle 1% DMSO	74,7 \pm 8,45	58			
Genistein	32,5 \pm 23,1	48	p = 0,000*		
Glu-Glu-Glu	76,0 \pm 7,53	7	p = 0,775		
Glu-Glu-Glu/Genistein	25,9 \pm 13,4	7		p = 0,665	p = 0,001*
Val-Pro-Leu	77,4 \pm 4,77	6	p = 0,410		
Val-Pro-Leu/Genistein	46,0 \pm 23,4	6		p = 0,249	p = 0,002*
Asp-Asp-Asp	74,0 \pm 6,30	5	p = 0,739		
Asp-Asp-Asp/Genistein	20,3 \pm 12,9	5		p = 0,318	p = 0,008*
Kontrolle 1% IK	77,1 \pm 7,15	53			
Genistein	49,3 \pm 24,5	52	p = 0,000*		
Lys-Lys-Lys	73,8 \pm 6,50	5	p = 0,253		
Lys-Lys-Lys/Genistein	48,4 \pm 22,3	5		p = 0,880	p = 0,056
Kontrolle 5% IK	79,5 \pm 7,72	19			
Genistein	52,1 \pm 21,0	19	p = 0,000*		
Leu-Leu-Leu	87,0 \pm 3,24	5	p = 0,053		
Leu-Leu-Leu/Genistein	59,5 \pm 24,1	5		p = 0,297	p = 0,000*

In der Tabelle sind die Einflüsse der Tripeptide auf die Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation mit Mittelwerten \pm Standardabweichungen, n-Zahlen und Signifikanzen dargestellt. *Signifikanz $p < 0,05$. Ein Gemisch der Einzelsubstanzen aus Genistein und einem Tripeptid war dann synergistisch wirksam, wenn $p < 0,05$ sowohl gegenüber der Genisteinkontrolle als auch gegenüber dem Peptids war.

Tabelle 42. Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Aminosäuren in der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregationen bei gesunden Probanden

Substanz	Aggregation [%] Mittelwert \pm SD	n	Substanz vs. Kontrolle	Substanz-gemisch vs. Genistein	Substanz-gemisch vs. Aminosäure
Aminosäuren					
Kontrolle 1% DMSO	75,2 \pm 8,26	66			
Genistein	63,7 \pm 12,1	55	p = 0,000*		
Glu	73,2 \pm 12,2	6	p = 0,407		
Glu/Genistein	46,8 \pm 32,9	6		p = 0,146	p = 0,093
Kontrolle 1% IK	77,2 \pm 6,89	56			
Genistein	72,3 \pm 11,5	55	p = 0,020*		
Asn	75,0 \pm 2,28	5	p = 0,548		
Asn/Genistein	61,3 \pm 17,3	5		p = 0,045**	p = 0,016**
Gln	71,8 \pm 12,6	5	p = 0,062		
Gln/Genistein	65,8 \pm 3,40	5		p = 0,006	p = 0,690
Ile	77,4 \pm 6,58	5	p = 0,935		
Ile/Genistein	72,8 \pm 6,25	5		p = 0,698	p = 0,394
Leu	74,5 \pm 3,94	5	p = 0,531		
Leu/Genistein	70,8 \pm 3,99	6		p = 0,247	p = 0,429
Arg	73,2 \pm 6,24	5	p = 0,348		
Arg/Genistein	64,9 \pm 10,6	5		p = 0,098	p = 0,222
Lys	79,5 \pm 5,66	6	p = 0,407		
Lys/Genistein	63,1 \pm 14,5	6		p = 0,160	p = 0,015*
Pro	82,1 \pm 4,86	6	p = 0,099		
Pro/Genistein	77,3 \pm 7,34	6		p = 0,268	p = 0,180
Kontrolle 4% IK	78,5 \pm 5,76	21			
Genistein	70,4 \pm 16,2	21	p = 0,005*		
Asp	73,3 \pm 5,02	5	p = 0,121		
Asp/Genistein	70,1 \pm 4,88	5		p = 0,278	p = 0,310
Kontrolle 5% IK	78,7 \pm 6,28	20			
Genistein	74,0 \pm 11,8	20	p = 0,265		
Val	76,8 \pm 3,37	6	p = 0,573		
Val/Genistein	75,2 \pm 6,13	6		p = 0,882	p = 0,818

In der Tabelle sind die Einflüsse der Aminosäuren auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation mit Mittelwerten \pm Standardabweichungen, n-Zahlen und Signifikanzniveaus dargestellt. * Signifikanz p < 0,05. Ein Gemisch der Einzelsubstanzen aus Genistein und einer Aminosäure war dann synergistisch wirksam, wenn p < 0,05 sowohl gegenüber der Genisteinkontrolle als auch gegenüber der Aminosäure war. Diese Effekte wurden mit ** nach den p-Werten gekennzeichnet.

Tabelle 43. Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Dipeptide in den Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregationen bei gesunden Probanden

Substanz	Aggregation [%] Mittelwert \pm SD	n	Substanz vs. Kontrolle	Substanz-gemisch vs. Genistein	Substanz-gemisch vs. Dipeptid
Dipeptide					
Kontrolle 1% DMSO	75,2 \pm 8,26	66			
Genistein	63,7 \pm 12,1	55	p = 0,000*		
Glu-Glu	70,7 \pm 9,00	11	p = 0,171		
Glu-Glu + Genistein	51,4 \pm 19,1	16		p = 0,017**	p = 0,003**
Asp-Glu	80,1 \pm 11,2	7	p = 0,294		
Asp-Glu + Genistein	65,5 \pm 7,79	10		p = 0,507	p = 0,025*
Asp-Asp	75,7 \pm 5,85	6	p = 0,913		
Asp-Asp + Ge-	64,1 \pm 13,3	6		p = 0,679	p = 0,041*
Kontrolle 1% IK	77,2 \pm 6,89	56			
Genistein	72,3 \pm 11,5	55	p = 0,020*		
Ser-Glu	79,2 \pm 3,72	5	p = 0,434		
Ser-Glu/Genistein	74,4 \pm 3,99	5		p = 0,815	p = 0,151
Ile-Leu	80,2 \pm 7,65	5	p = 0,449		
Ile-Leu/Genistein	73,7 \pm 5,35	5		p = 0,938	p = 0,421
Kontrolle 4% IK	78,5 \pm 5,76	21			
Genistein	70,4 \pm 16,2	21	p = 0,005*		
Glu-Asp	76,1 \pm 2,91	5	p = 0,409		
Glu-Asp/Genistein	55,6 \pm 28,6	5		p = 0,041**	p = 0,016**
Asp-Leu	78,4 \pm 6,46	6	p = 0,550		
Asp-Leu/Genistein	72,0 \pm 5,07	6		p = 0,408	p = 0,065
Gln-Gln	78,0 \pm 6,98	5	p = 0,900		
Gln-Gln/Genistein	67,3 \pm 14,2	5		p = 0,850	p = 0,310
Kontrolle 5% IK	78,7 \pm 6,28	20			
Genistein	74,0 \pm 11,8	20	p = 0,265		
Val-Asp	74,2 \pm 5,49	9	p = 0,105		
Val-Asp/Genistein	66,4 \pm 13,1	9		p = 0,077	p = 0,040*

In der Tabelle sind die Einflüsse der Dipeptide auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation mit Mittelwerten \pm Standardabweichungen, n-Zahlen und Signifikanzen dargestellt. *Signifikanz $p < 0,05$. Ein Gemisch der Einzelsubstanzen aus Genistein und einem Dipeptid war dann synergistisch wirksam, wenn $p < 0,05$ sowohl gegenüber der Genisteinkontrolle als auch gegenüber dem Peptids war. Diese Effekte wurden mit ** nach den p-Werten gekennzeichnet.

Tabelle 44. Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Tripeptide in den Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregationen bei gesunden Probanden

Substanz	Aggregation [%] Mittelwert \pm SD	n	Substanz vs. Kontrolle	Substanz-gemisch vs. Genistein	Substanz-gemisch vs. Tripeptid
Tripeptide					
Kontrolle 1% DMSO	75,2 \pm 8,26	66			
Genistein	63,7 \pm 12,1	55	p = 0,000*		
Glu-Glu-Glu	71,9 \pm 13,1	8	p = 0,702		
Glu-Glu-Glu/Genistein	40,3 \pm 23,4	8		p = 0,007**	p = 0,007**
Val-Pro-Leu	77,6 \pm 5,36	5	p = 0,423		
Val-Pro-Leu/Genistein	71,6 \pm 11,0	5		p = 0,248	p = 0,310
Asp-Asp-Asp	72,7 \pm 4,23	5	p = 0,504		
Asp-Asp-Asp/Genistein	39,4 \pm 22,5	5		p = 0,010**	p = 0,008**
Kontrolle 1% IK	77,2 \pm 6,89	56			
Genistein	72,3 \pm 11,5	55	p = 0,020*		
Lys-Lys-Lys	77,4 \pm 7,56	7	p = 0,906		
Lys-Lys-Lys/Genistein	72,3 \pm 6,42	7		p = 0,527	p = 0,259
Kontrolle 5% IK	78,7 \pm 6,28	20			
Genistein	74,0 \pm 11,8	20	p = 0,265		
Leu-Leu-Leu	87,7 \pm 4,91	5	p = 0,010*		
Leu-Leu-Leu/Genistein	73,6 \pm 15,0	5		p = 0,668	p = 0,056

In der Tabelle sind die Einflüsse der Tripeptide auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation mit Mittelwerten \pm Standardabweichungen, n-Zahlen und Signifikanzen dargestellt. *Signifikanz $p < 0,05$. Ein Gemisch der Einzelsubstanzen aus Genistein und einem Tripeptid war dann synergistisch wirksam, wenn $p < 0,05$ sowohl gegenüber der Genisteinkontrolle als auch gegenüber dem Peptids war. Diese Effekte wurden mit ** nach den p-Werten gekennzeichnet.

Tabelle 45. Darstellung der Aminosäuren als Einzelsubstanzen in den Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregationen

Substanz	Aggregation [%] Mittelwert \pm SD	n	Substanz vs. Kontrolle
Aminosäuren			
Kontrolle 1% DMSO	77,5 \pm 10,1	54	
Glu	74,7 \pm 7,40	7	p = 0,470
Kontrolle 1% IK	80,0 \pm 9,20	54	
Asn	71,6 \pm 6,50	5	p = 0,046*
Gln	79,9 \pm 5,62	7	p = 0,868
Ile	77,2 \pm 6,31	5	p = 0,516
Leu	67,7 \pm 13,1	6	p = 0,033*
Arg	75,9 \pm 7,45	7	p = 0,241
Lys	85,6 \pm 10,4	5	p = 0,331
Pro	82,0 \pm 5,02	5	p = 0,516
Kontrolle 4% IK	77,2 \pm 8,10	31	
Asp	77,6 \pm 5,12	11	p = 0,652
Kontrolle 5% IK	82,8 \pm 8,70	17	
Val	82,3 \pm 12,0	7	p = 0,852

In der Tabelle wurden die Arachidonsäure-induzierten Aggregationen der mit Aminosäuren inkubierten Plasmen (Mittelwert \pm Standardabweichung) mit n-Zahlen und dazugehörigen Signifikanzen aufgelistet. *Signifikanz $p < 0,05$ (vs. Kontrolle)

Tabelle 46. Darstellung der Dipeptide als Einzelsubstanzen in den Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregationen

Substanz	Aggregation [%] Mittelwert \pm SD	n	Substanz vs. Kontrolle
Dipeptide			
Kontrolle 1% DMSO	77,5 \pm 10,1	54	
Glu-Glu	79,3 \pm 10,6	18	p = 0,672
Asp-Glu	77,0 \pm 9,40	5	p = 0,906
Asp-Asp	80,4 \pm 12,9	5	p = 0,947
Kontrolle 1% IK	80,0 \pm 9,20	54	
Ser-Glu	86,0 \pm 8,41	5	p = 0,213
Ile-Leu	77,4 \pm 6,60	6	p = 0,419
Kontrolle 4% IK	77,2 \pm 8,10	31	
Glu-Asp	75,4 \pm 7,74	5	p = 0,859
Asp-Leu	80,8 \pm 12,7	5	p = 0,929
Gln-Gln	75,7 \pm 8,63	10	p = 0,520
Kontrolle 5% IK	82,8 \pm 8,71	17	
Val-Asp	78,4 \pm 6,89	5	p = 0,359

In der Tabelle wurden die Arachidonsäure-induzierten Aggregationen der mit Dipeptiden inkubierten Plasmen (Mittelwert \pm Standardabweichung) mit n-Zahlen und dazugehörigen Signifikanzen aufgelistet.

Tabelle 47. Darstellung der Tripeptide als Einzelsubstanzen in den Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregationen

Substanz	Aggregation [%] Mittelwert \pm SD	n	Substanz vs. Kontrolle
Dipeptide			
Kontrolle 1% DMSO	77,5 \pm 10,1	54	
Glu-Glu-Glu	73,4 \pm 11,2	6	p = 0,895
Val-Pro-Leu	80,7 \pm 5,41	6	p = 0,249
Asp-Asp-Asp	74,0 \pm 4,69	4	p = 0,584
Kontrolle 1% IK	80,0 \pm 9,20	54	
Lys-Lys-Lys	78,2 \pm 10,3	5	p = 0,534
Kontrolle 5% IK	82,8 \pm 8,71	17	
Leu-Leu-Leu	86,0 \pm 9,94	5	p = 0,595

In der Tabelle wurden die Arachidonsäure-induzierten Aggregationen der mit Tripeptiden inkubierten Plasmen (Mittelwert \pm Standardabweichung) mit n-Zahlen und dazugehörigen Signifikanzen aufgelistet.

Tabelle 48. Darstellung der Messergebnisse der synergistisch wirksamen Gemische aus Aminosäuren, Di- und Tripeptiden und Genistein in den Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregationen bei gesunden Probanden mit Darstellung der jeweiligen Genisteinkonzentrationsbereiche

Substanz mit Konzentration	Keine Hemmung durch Genistein		Synergistischer Effekt		Vollhemmung durch Genistein	
	Genistein [μM]	n	Genistein [μM]	n	Genistein [μM]	n
Aminosäuren						
Glu	100 - 450	9	150 - 500	3	200 - 400	5
Dipeptide						
Glu-Glu						
1 mM	100 - 300	11	125 - 350	10	250 - 400	9
1 μM	150 - 300	5	175 - 400	6	250 - 500	4
Asp-Glu						
1 mM	50 - 150	10	100 - 225	7	100 - 250	4
1 μM	150 - 300	5	175 - 350	3	200 - 400	6
Asp-Asp						
1 mM	100 - 250	4	50 - 350	5	100 - 450	5
Ser-Glu						
1 mM	25 - 350	6	50 - 300	4	100 - 500	9
Val-Asp						
1 mM	25 - 350	9	50 - 400	6	250 - 450	4
Tripeptide						
Glu-Glu-Glu						
1 mM	100 - 270	5	50 - 300	11	250 - 400	5
1 μM	150 - 300	7	200 - 400	7	275 - 450	5
1 nM	50 - 300	6	100 - 350	5	120 - 450	18
Asp-Asp-Asp						
1 mM	150 - 250	5	330 - 450	3	330 - 500	5
1 μM	150 - 450	9	250 - 600	4	350 - 750	5

In der Tabelle wurden die Verbindungen mit den verwendeten Konzentrationen aufgelistet, die mit Genistein synergistisch auf die Arachidonsäure-induzierten Aggregationen wirkten. Angegeben sind die Genisteinkonzentrationsbereiche und die n-Zahlen, die keinen Effekt durch Genistein, einen synergistischen Effekt des Gemisches aus Genistein und Substanz oder einen Genisteinvolleffekt auslösten.

Tabelle 49. Darstellung der Signifikanzniveaus der synergistisch wirksamen Gemische aus Aminosäuren, Di- und Tripeptiden und Genistein in den Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregationen bei gesunden Probanden

Substanz	Keine Hemmung durch Genistein		Synergistischer Effekt		Vollhemmung durch Genistein	
	Gemisch vs. Genistein	Gemisch vs. Substanz	Gemisch vs. Genistein	Gemisch vs. Substanz	Gemisch vs. Genistein	Gemisch vs. Substanz
Aminosäuren						
Glu	p = 0,014	p = 0,077	p = 0,046**	p = 0,046**	p = 0,841	p = 0,008*
Dipeptide						
Glu-Glu						
1 mM	p = 0,478	p = 0,562	p = 0,000**	p = 0,000**	p = 0,541	p = 0,000*
1 µM	p = 0,310	p = 0,310	p = 0,002**	p = 0,002**	p = 0,686	p = 0,029
Asp-Glu						
1 mM	p = 0,796	p = 0,761	p = 0,001**	p = 0,001**	p = 0,343	p = 0,057
1 µM	p = 0,486	p = 0,343	p = 0,046**	p = 0,046**	p = 0,818	p = 0,002*
Asp-Asp						
1 mM	p = 0,200	p = 0,486	p = 0,008**	p = 0,008**	p = 0,548	p = 0,008*
Ser-Glu						
1 mM	p = 0,818	p = 0,589	p = 0,029**	p = 0,029**	p = 0,730	p = 0,000*
Val-Asp						
1 mM	p = 0,161	p = 0,161	p = 0,002**	p = 0,002**	p = 0,356	p = 0,029*
Tripeptide						
Glu-Glu-Glu						
1 mM	p = 0,029*	p = 0,057	p = 0,000**	p = 0,000**	p = 0,690	p = 0,068
1 µM	p = 0,383	p = 0,074	p = 0,001**	p = 0,001**	p = 0,548	p = 0,008*
1 nM	p = 0,589	p = 0,240	p = 0,008**	p = 0,008**	p = 0,791	p = 0,000
Asp-Asp-Asp						
1 mM	p = 0,548	p = 0,841	p = 0,050#	p = 0,046**	p = 0,055	p = 0,008*
1 µM	p = 0,156	p = 0,052	p = 0,020**	p = 0,019**	p = 0,239	p = 0,009*

In der Tabelle wurden die Verbindungen mit den verwendeten Konzentrationen aufgelistet, die mit Genistein synergistisch auf die Arachidonsäure-induzierten Aggregationen wirkten. Angegeben ist der Vergleich der Aggregationen nach 6 min Aggregation für „Keine Hemmung durch Genistein“, „synergistischer Effekt“ durch das Gemisch und „Vollhemmung durch Genistein“ alleine.

*Signifikanz $p < 0,05$.

**Signifikanz $p < 0,05$ (synergistische Wechselwirkung zwischen Genistein und Einzelsubstanz)

#grenzwertig signifikant ($p \leq 0,05$ wurde als positiv signifikant gewertet).

Tabelle 50. Darstellung der Messergebnisse (Mittelwert mit Standardabweichung) und Signifikanzniveaus der Substanzen in den Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen bei herzkranken Patienten

Substanz	Aggregation [%] Mittelwert \pm SD	n	Substanz vs. Kontrolle	Substanz-gemisch vs. Genistein	Substanz-gemisch vs. Tripeptid
ADP-induzierte Thrombozytenaggregation					
Kontrolle 1% DMSO	62,2 \pm 10,2	26			
Genistein	47,8 \pm 15,9	26	p = 0,000*		
Glu-Glu	56,6 \pm 10,9	15	p = 0,114		
Glu-Glu/Genistein	40,0 \pm 15,1	15		p = 0,087	p = 0,003*
Glu-Glu-Glu	55,6 \pm 11,8	11	p = 0,141		
Glu-Glu-Glu/Genistein	42,3 \pm 10,0	11		p = 0,170	p = 0,256
Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation					
Kontrolle 1% DMSO	74,4 \pm 9,79	15			
Genistein	34,9 \pm 14,4	15	p = 0,000*		
Glu-Glu	70,1 \pm 10,6	10	p = 0,261		
Glu-Glu/Genistein	17,4 \pm 12,4	10		p = 0,008**	p = 0,000**
Glu-Glu-Glu	65,2 \pm 10,9	5	p = 0,142		
Glu-Glu-Glu/Genistein	20,8 \pm 8,43	5		p = 0,006**	p = 0,008**
Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation					
Kontrolle 1% DMSO	74,9 \pm 4,72	14			
Genistein	44,9 \pm 24,0	14	p = 0,000*		
Glu-Glu	71,0 \pm 6,56	11	p = 0,134		
Glu-Glu/Genistein	37,5 \pm 21,6	11		p = 0,002*	p = 0,434
Glu-Glu-Glu	72,5 \pm 2,12	3	p = 0,244		
Glu-Glu-Glu/Genistein	14,0 \pm 6,79	3		p = 0,018**	p = 0,046**
Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation					
Kontrolle 1% DMSO	73,3 \pm 11,1	4			
Genistein	19,1 \pm 16,9	4	p = 0,029*		
Glu-Glu	77,2 \pm 5,90	3	p = 0,857		
Glu-Glu/Genistein	0,9 \pm 2,8	3		p = 0,200	p = 0,057

In der Tabelle sind die Einflüsse des Genistein und der Peptide Glu-Glu und Glu-Glu-Glu auf die Agonisten-induzierten Thrombozytenaggregationen herzkranker Patienten mit Mittelwerten \pm Standardabweichungen, n-Zahlen und Signifikanzen dargestellt. *Signifikanz $p < 0,05$. Ein Gemisch der Einzelsubstanzen aus Genistein und einem Tripeptid war dann synergistisch wirksam, wenn $p < 0,05$ sowohl gegenüber der Genisteinkontrolle als auch gegenüber dem Peptids vorlag. Diese Effekte wurden mit ** nach den p-Werten gekennzeichnet.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Abderhalden, E. (1905): Abbau und Aufbau der Eiweißkörper im tierischen Organismus. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, Vol. 44, 2-44

Ackland ML, van de Waarsenburg S, Jones R (2005): Synergistic antiproliferative action of the flavanols quercetin and kaempferol in cultured human cancer cell lines. *In Vivo*, Vol. 19, 69-76

Addison JM, Burston D, Payne JW, Wilkinson S, Matthews DM (1975): Evidence for active transport of tripeptides by hamster jejunum in vitro. *Clin Sci Mol Med*, Vol. 49, 305-312

Adibi SA (1997): The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterology*, Vol. 113, 332-340

Adibi SA (2003): Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, Vol. 285, G779-G788

Adibi SA, Morse EL (1971): Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption. *J Clin Invest*, Vol. 50, 2266-2275

Adibi SA, Solemeimanpour MR (1974): Functional characterisation of dipeptide transport systems in human jejunum. *J Clin Invest*, Vol. 53, 1368-1374

Adlercreutz H, Markkanen H, Wantanabe S (1993): Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. *Lancet*, Vol. 342, 1209-1210

Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y (1987): Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, Vol. 262, 5592-5605

Albertazzi P, Pansini F, Bonaccorsi G, Zanotti L, Forini E, De Aloysio D (1998): The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. *Obstet Gynecol*, Vol. 91, 6-11

Aliprandi A, Longoni M, Stanzani L, Tremolizzo L, Vaccaro M, Begni B, Galimberti G, Garofolo R, Ferrarese C (2005): Increased plasma glutamate in stroke patients might be linked to altered platelet release and uptake. *J Cereb Blood Flow Metab*, Vol. 25, 513-519

American Soybean Association (2001): Kompendium Sojabohne: Züchtung, Anbau, Verwertung, Markt. American Soybean Association (Hrsg.), *GENIUS Biotechnologie GmbH – Wissenschaftsberatung und Kommunikation*, Ausgabe Mai 2001, 40-41

Anand BS, Katragadda S, Mitra AK (2004): Pharmacokinetics of novel dipeptide ester prodrugs of Acyclovir after oral administration: intestinal absorption and liver metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*, Vol. 311, 659-667

Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME (1995): Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med*, Vol. 335, 276-282

Andlauer W, Kolb J, Fürst P (2000a): Isoflavones from tofu are absorbed and metabolized in the isolated rat small intestine. *J Nutr*, Vol. 130, 3021-3027

Andlauer W, Kolb J, Stehle P, Fürst P (2000b): Absorption and metabolism of genistein in isolated rat small intestine. *J Nutr*, Vol. 130, 843-846

- Anupongsanuool E**, Teekachunhatean S, Rojanasthien N, Pongsatha S, Sangdee C (2005): Pharmacokinetics of isoflavones, daidzein and genistein, after ingestion of soy beverage compared with soy extract capsules in postmenopausal Thai women. *BMC Clin Pharmacol*, 1-10
- Aseichev AV**, Azizova OA (2004): Mechanism of activation of ADP-induced platelet aggregation under the influence of oxidatively modified fibrinogen. *Bull Exp Biol Med*, Vol. 137, 238-241
- Atkinson C**, Compston JE, Day NE, Dowsett M, Bingham SA (2004): The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr*, Vol. 79, 326-333
- Baslar Z**, Aras C, Unal M, Kayiran A, Ustundag S, Ozkan S (2004): *In vitro* effect of silicone oil and liquid perfluorocarbons on platelet aggregation. *Eur J Ophthalmol*, Vol. 14, 550-554
- Bauer AW**, Mall K (1995): Hämostase, Thrombose und Embolie – Historische Konzepte zur Physiologie und Pathologie der Blutgerinnung. *Hämostaseologie*, Vol. 15, 92-99
- Beghetti M**, Sparling C, Cox PN, Stephens D, Adatia I (2003): Inhaled NO inhibits platelet aggregation and elevates plasma but not intraplatelet cGMP in healthy volunteers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, Vol. 285, H637-H642
- Begni B**, Tremolizzo L, D'Orlando C, Bono MS, Garofolo R, Longoni M, Ferrarese C (2005): Substrate-induced modulation of glutamate uptake in human platelets. *Br J Pharmacol*, Vol. 145, 792-799
- Biegel A**, Gebauer S, Hartrodt B, Brandsch M, Neubert K, Thondorf I (2005): Three-dimensional quantitative structure-activity relationship analyses of beta-lactam antibiotics and tripeptides as substrates of the mammalian H⁺/peptide cotransporter PEPT 1. *J Med Chem*, Vol. 48, 4410-4419
- Biggers JD**, Curnow DH (1954): Oestrogenic activity of subterranean clover I. The oestrogenic activity of genistein. *Biochem J*, Vol. 58, 278-282
- Boll M**, Markovich D, Weber WM, Korte H, Daniel H, Murer H (1994): Expression cloning of a cDNA from rabbit small intestine related to proton-coupled transport of peptides, beta-lactam antibiotics and ACE-inhibitors. *Pflugers Arch*, Vol. 429, 146-149
- Boos CJ**, Carlsson J, More RS (2003): Rate or rhythm control in persistent atrial fibrillation? *QJM*, Vol. 96, 881-892
- Boulos C**, Jiang H, Balazy M (2000): Diffusion of peroxynitrite into the human platelet inhibits cyclooxygenase via nitration of tyrosin residues. *J Pharmacol Exp Ther*, Vol. 293, 222-229
- Brandsch M**, Thuncke F, Küllertz G, Schutkowski M, Fischer G, Neubert K (1998): Evidence for the absolute conformational specificity of the intestinal H⁺/peptide symporter, PEPT1. *J Biol Chem*, Vol. 273, 3861-3864
- Breddin HK**, Harder S (2003): Wertigkeit von Plättchenfunktionstests. *VASA*, Vol. 32, 123-129
- Breddin HK** (2005): Can platelet aggregometry be standardized? *Platelets*, Vol. 16, 151-158

- Brown M, Wittwer C (2000):** Flow Cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem*, Vol. 46, 1221-1229
- Budde U (2002):** Diagnose von Funktionsstörungen der Thrombozyten mit Hilfe der Aggregometrie. *J Lab Med*, Vol. 26, 564-571
- Bundgaard JR, Vuust J, Rehfeld JF (1997):** New consensus features for tyrosine o-sulfation determined by mutational analysis. *J Biol Chem*, Vol 272, 21700-21705
- Busby MG, Jeffcoat AR, Bloedon LT, Koch MA, Black T, Dix KJ, Heizer WD, Thomas BF, Hill JM, Crowell JA, Zeisel SH (2002):** Clinical characteristics and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to healthy men. *Am J Clin Nutr*, Vol. 75, 126-136
- Cabin SC, Clubb KS, Hall C, Perlmutter RA, Feinstein AR (1990):** Risk for systematic embolization of atrial fibrillation without mitral stenosis. *Am J Cardiol*, Vol. 65, 1112-1116
- Cahill MR, Macey MG, Dawson JR, Newland AC (1996):** Platelet surface activation antigen expression at baseline and during elective angioplasty in patients with mild to moderate coronary artery disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*, Vol. 7, 165-168
- Cameron A, Schwartz MJ, Kronmal RA, Kosinski AS (1988):** Prevalence and significance of atrial fibrillation in coronary artery disease. *Am J Cardiol*, Vol. 61, 714-717
- Carter MW, Smart WW, Matrone G (1953):** Estimation of estrogenic activity of Genistein obtained from soybean meal. *Proc Soc Exp Biol Med*, Vol. 84, 506-508
- Cassidy A, Hanley B, Lamuela-Raventos RM (2000):** Isoflavones, lignans, and stilbenes – origins, metabolism and potential importance to human health. *J Sci Food Agric*, Vol. 80, 1044-1062
- Cattaneo M (2002):** ADP receptor defects. *J Lab Med*, Vol. 26, 579-583
- Clare DA, Swaisgood HE (2000):** Bioactive milk peptides: a prospectus. *J Dairy Sci*, Vol. 83, 1187-1195
- Chen H, Kahn ML (2003):** Reciprocal signalling by integrin and nonintegrin receptors during collagen activation of platelets. *Mol Cell Biol*, Vol.23, 4764-4777
- Corbalan R, Arriagada D, Braun S, Tapia J, Huete J, Kramer A, Chavez A (1992):** Risk factors for systemic embolism in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Am Heart J*, Vol. 124, 149-153
- Cranc MS, Rossi AG, Megson IL (2005):** A potential role for extracellular nitric oxide generation in cGMP-independent inhibition of human platelet aggregation: biochemical and pharmacological considerations. *Br J Pharmacol*, Vol. 144, 849-859
- Crouse JR, Morgan T, Terry JG, Ellis J, Vitolins M, Burke GL (1999):** A randomised trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch Intern Med*, Vol. 17, 2070-2076
- Dahlback B (2000):** Blood coagulation. *Lancet*, Vol. 355, 1627-1632
- Daniel H (2004):** Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Ann Rev Physiol*, Vol. 66, 361-384

- Daniel H, Kottra G (2004):** The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Eur J Physiol*, Vol. 447, 610-618
- Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, McLauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G (2000):** Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett*, Vol. 468, 166-170
- DeLumen BO (2005):** Lunasin: a cancer-preventive soy peptide. *Nutr Rev*, Vol. 63, 16-21
- Divi RL, Chang HC, Doerge DR (1997):** Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterisation, and mechanisms of action. *Biochem Pharmacol*, Vol. 54, 1087-1096
- Dixon RA (2004):** Phytoestrogens. *Annu Rev Plant Biol*, Vol. 55, 225-261
- Dobrev D (2004):** Molekulare Grundlagen des Remodeling bei Vorhofflimmern. *Dtsch Med Wochenschr*, Vol. 129, 827-830
- Dobrydneva Y, Williams RL, Morris GZ, Blackmore PF (2002):** Dietary phytoestrogens in their synthetic structural analogous as calcium channel blockers in human platelets. *J Cardiovasc Pharmacol*, Vol. 40, 399-410
- Emery JD, Leifer DW, Moura GL, Southern P, Morrissey JH, Lawrence JB (1995):** Whole blood platelet aggregation predicts in vitro and in vivo primary hemostatic function in the elderly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 15, 748-753
- Falk RR (2001):** Atrial fibrillation. *N Engl J Med*, Vol. 344, 1067-1078
- Fei YJ, Ganapathy V, Leibach FH (1998):** Molecular and structural features of the proton-coupled oligopeptide transporter superfamily. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, Vol. 58, 239-261
- Feinberg WM, Blackshear JL, Laupacis A, Kronmal R, Hart RG (1995):** Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications. *Arch Intern Med*, Vol. 155, 469-473
- Ferraris RP, Diamond J, Kwan WW (1988):** Dietary regulation of intestinal transport of the dipeptide carnosine. *Am J Physiol*, Vol. 255, G143-G150
- Finkel E (1998):** Phyto-oestrogens: the way to postmenopausal health? *Lancet*, Vol. 352, 1762
- Fleischhut J (2004):** Untersuchungen zum Metabolismus, Bioverfügbarkeit und zur antioxidativen Wirkung von Anthocyanen, Diss., Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, *Universität Karlsruhe*
- Fontana P, Dupont A, Gandrille S, Bachelot-Loza C, Reny JL, Aiach M, Gaussem P (2003):** Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation*, Vol. 108, 989-995
- Food and Drug Administration (1999):** Food labeling, health claims, soy protein, and coronary heart disease. *Fed Regist*, Vol. 64, 57700-57733
- Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Fleischmann G, Hase T, Montesano R, Schweigerer L (1993):** Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 90, 2690-2694

- Friedmann M, Brandon DL (2001):** Nutritional and health benefits of soy proteins. *J Agric Food Chem*, Vol. 49, 1069-1086
- Furie B, Furie BC (1992):** Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Engl J Med*, Vol. 326, 800-806
- Fuster V, Rydén LE, Asinger RW, Cannon DS, Crijns HJ, Frye RL, Halperin JL, Kay N, Klein WW, Lévy S, McNamara RL, Prystowsky EN, Wann LS, Wyse DG (2001):** ACC/AHA/ESC guidelines for the management of patient with atrial fibrillation: executive summary. *Circulation*, Vol. 104, 2118-2150
- Galvez AF, Chen N, Macasieb J, deLumen BO (2001):** Chemopreventive property of a soybean peptide (lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation. *Cancer Res*, Vol. 61, 7473-7478
- Ganapathy V, Brandsch M, Leibach FH (1994):** Intestinal transport of amino acids and peptides. In: L.R. Johnson (Hrsg.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Raven Press, 3. Auflage, 1773-1794
- Ganapathy V, Leibach FH (1985):** Is intestinal peptide transport energized by a proton gradient? *Am J Physiol*, Vol. 249, G153-G160
- Ganapathy V, Miyamoto Y, Leibach FH (1987):** Driving force for peptide transport in mammalian intestine and kidney. *Beitr Infusionsther Klin Ernahr*, Vol. 17, 54-68
- Gardner ML (1975):** Absorption of amino acids and peptides from a complex mixture in the isolated small intestine of the rat. *J Physiol*, Vol. 253, 233-256
- Gaudette DC, Holub BJ (1990):** Effect of genistein, a tyrosine kinase inhibitor, on U46619-induced phosphoinositide phosphorylation in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 170, 238-242
- Gawaz M (1999):** Thrombozyten und primäre Hämostase. In: Gawaz (Hrsg.), *Das Blutplättchen*, Georg-Thieme-Verlag, 4-25
- Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schoming A, Neumann F (2000):** Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis*, Vol. 148, 75-85
- Gee JM, DuPont MS, Rhodes MJC, Johnson IT (1998):** Quercetin glycosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radic Biol Med*, Vol. 25, 19-25
- Gende OA (2000):** Genistein inhibits osmotic activation of Na(+)/H(+)exchange in human platelets. *Arch Physiol Biochem*, Vol. 108, 429-436
- George JN (2000):** Platelets, *Lancet*, Vol. 366, 1531-1539
- Gerszten RE, Chen JI, Ishli, M, Ishil K, Wang L, Nane T, Turck WC, VU TKH, Coughlin SR (1994):** Specificity of the thrombin receptor for agonist peptides is defined by its extracellular surface. *Nature*, Vol. 368, 648-651
- Guerrero JA, Lozano ML, Castillo J, Benavente-Garcia O, Vicente V, Rivera J (2005):** Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. *J Thromb Haemost*, Vol. 3, 369-376

- Gottstein N**, Ewins BA, Eccleston C, Hubbard GP, Kavanagh IC, Minihane AM, Weinberg PD, Rimbach G (2003): Effect of genistein and daidzein on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Br J Nutr*, Vol. 89, 607-616
- Haghi D**, Schumacher B (2001): Current management of symptomatic atrial fibrillation. *Am J Cardiovasc Drugs*, Vol. 1, 127-129
- Hennersdorf MG**, Perings C, Kelm M, Strauer BE (2001): Vorhofflimmern. *Internist*, Vol. 42, 1631-1640
- Hesse J**, Doll M, Wilhelm M, Seitz R, Heiden M (2001): Beurteilung der Thrombozytenfunktion in Zulassungsunterlagen. *Infus Ther Transfus Med*, Vol. 28, 44-50
- Hildebrandt P**, Jensen G, Kober L, Torp-Pedersen C, Joen T, Ege M, Host U, Nielsen F, Melchior T, Ringsdal V (1994): Myocardial infarction 1979 – 1988 in Denmark: secular trends in age-related incidence, in hospital mortality and complications. *Eur Heart J*, Vol. 15, 877-881
- Hillman GG**, Wang Y, Kucuk O, Che M, Doerge DR, Yudelev M, Joiner MC, Marples B, Forman JD, Sarkar FH (2004): Genistein potentiates inhibition of tumor growth by radiation in a prostate cancer orthotopic model. *Mol Cancer Ther*, Vol. 3, 1271-1279
- Hodges RE**, Krehl WA, Stone DB, Lopez A (1967): Dietary carbohydrates and low cholesterol diets: effects on serum lipids on man. *Am J Clin Nutr*, Vol. 20, 198-208
- Hodgson JM**, Puddey IB, Beilin LJ, Mori TA, Croft KD (1998): Supplementation with isoflavonoid phytoestrogens does not alter serum lipid concentrations: a randomized controlled trial in humans. *J Nutr*, Vol. 128, 728-732
- Holm F** (2003): Funktionelle Bestandteile in Lebensmitteln – Kardiovaskuläre Gesundheit. *Institute National de la Recherche Agronomique* (Hrsg.), 1-2
- Hoogland G**, Bos IW, Kupper F, van Willigen G, Spierenburg HA, van Nieuwenhuizen O, de Graan PN (2005): Thrombin-stimulated glutamate uptake in human platelets is predominantly mediated by the glial glutamate transporter EAAT2. *Neurochem Int*, Vol. 47, 499-506
- Huang TF**, Liu CZ, Ouyang CH, Teng CM (1991): Halysin, an antiplatelet Arg-Lys-Asp-containing snake venom peptide, as fibrinogen receptor antagonist. *Biochem Pharmacol*, Vol. 42, 1209-1219
- Hubbard GP**, Stevens JM, Cicmil M, Jordan PA, Williams CM, Lovegrove JA, Gibbins JM (2003): Quercetin inhibits collagen-stimulated platelet activation through inhibition of multiple components of the glycoprotein VI signalling pathway. *J Thromb Haemost*, Vol. 1, 1079-1088
- Hwang JT**, Ha J, Park OJ (2005): Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signalling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 332, 433-440
- Ingram D**, Sanders K, Kolybaba M, Lopez D (1997): Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer. *Lancet*, Vol. 350, 990-994
- Irie M**, Terada T, Katsura T, Matsuoka S, Inui K (2005): Computational modelling of H⁺-coupled peptide transport via human PEPT 1. *J Physiol*, Vol. 565, 429-439

- Irie M**, Terada T, Okuda M, Inui K (2004): Efflux properties of basolateral peptide transporter in human intestinal cell line Caco-2. *Pflugers Arch*, Vol. 449, 186-194
- Jenkins C**, Costello J, Hodge L (2004): Systematic review of prevalence of aspirin induced asthma and its implications for clinical practice. *BMJ*, Vol. 328, 7434-7437
- Jessie SW**, Krishnakantha TP (2005): Inhibition of human platelet aggregation and membrane lipid peroxidation by food spice, saffron. *Mol Cell Biochem*, Vol. 278, 59-63
- Jung SM**, Moroil M (2001): Platelet collagen receptor integrin $\alpha_2\beta_1$ activation involves differential participation of ADP-receptor subtypes P2Y1 and P2Y12 but not intracellular calcium change. *Eur J Biochem*, Vol. 268, 3513-3522
- Kamath S**, Blann AD, Graham CJ, Gurney D, Chin BSP, Lip GYH (2002): Platelet P-selectin levels in relation to plasma soluble P-selectin and β -thromboglobulin levels in atrial fibrillation. *Stroke*, Vol. 33, 1237-1242
- Kannel WB**, Abbott RD, Savage DD, McNamara PM (1983): Coronary heart disease and atrial fibrillation: the Framingham study. *Am Heart J*, Vol. 106, 389-396
- Kini RM**, Chow G (2001): Exogenous inhibitors of platelet aggregation from animal sources. *Thromb Haemost*, Vol. 85, 179-181
- Kirk EA**, Sutherland P, Wang SA, Chait A, LeBoeuf RC (1998): Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr*, Vol. 128, 954-959
- Klang JE**, Burnworth LA, Pan YX, Webb KE, Wong EA (2005): Functional characterisation of a cloned pig intestinal peptide transporter (pPEPT1). *J Anim Sci*, Vol 83, 172-181
- Knütter I** (2003): Strukturelle Anforderungen an Substrate und Inhibitoren apikaler H^+ /Peptidsymporter. Diss., Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, *Universität Halle-Wittenberg*
- Kondo K**, Suzuki Y, Ikeda Y, Umemura K (2002): Genistein, an isoflavone included in soy, inhibits thrombotic vessel occlusion in the mouse femoral artery and in vitro platelet aggregation. *Eur J Pharm*, Vol. 455, 53-57
- Kostavan IA**, Merkulova MI, Navolotskaya EV, Nurlieva RI (1997): Study of interaction between L-glutamate and human blood lymphocytes. *Immunol Lett*, Vol. 58, 177-180
- Kotra G**, Stamford A, Daniel H (2002): PEPT1 as a paradigm for membrane carriers that mediate electrogenic bidirectional transport of anionic, cationic, and neutral substrates. *J Biol Chem*, Vol. 277, 32683-32691
- Krott R**, Lebek J, Grisanti S, Esser P, Heimann K (2000): Antiproliferative effect of genistein on pig retinal pigment epithelium cells in culture. *Ophthalmological*, Vol. 214, 296-300
- Kulling SE**, Watzel B (2003): Phytoöstrogene. *Ernährungs-Umschau*, Vol 50, 234-239
- Landesberg R**, Burke A, Pinsky D, Katz, R, Vo J, Eisig, SB, Lu HH (2005): Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide. *J Oral Maxillofac Surg*, Vol. 63, 529-535

- Lauritzen C** (2001): Geschichte der Phytoöstrogenforschung. *Ärzte-Woche*, Vol. 15, (Online-Journal, URL: <http://www.aerztewoche.at>, Stand der Abfrage: 21.12.2005)
- Leveugle B**, Mazurier J, Legrand D, Mazurier C, Montreuil J, Spik G (1993): Lactotransferrin binding to its platelet receptor inhibits platelet aggregation. *Eur J Biochem*, Vol. 213, 1205-1211
- Liao CH**, Ko FN, Kuo YH, Teng CM (1996): Antiplatelet effect of demethyldiisoeugenol. *Can J Physiol Pharmacol*, Vol. 74, 1111-1116
- Lindemann S**, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmermann GA, Weyrich AS (2001): Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 β -synthesis. *J Cell Biol*, Vol. 154, 485-490
- Lill G**, Voit S, Schrör K, Weber AA (2003): Complex effects of different green tea catechins on human platelets. *FEBS Lett*, Vol. 546, 265-270
- Liu W**, Song ZJ, Liang NC (1998): Effects of genistein on aggregation and cytosolic free calcium in pig platelets. *Acta Pharmacol Sin*, Vol. 19, 540-542
- Liu XJ**, Yang L, Mao YQ, Wang Q, Huang MH, Wang YP, Wu HB (2002): Effects of the tyrosine protein kinase inhibitor genistein on the proliferation, activation of cultured rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol*, Vol. 8, 739-745
- Manach C**, Donovan JL (2004): Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic Res*, Vol. 38, 771-785
- Maneva A**, Taleva B, Manev V, Sirakov L (1993): Lactoferrin binding to human platelets. *Int J Biochem*, Vol. 25, 707-712
- Mann KG**, Lorand L (1993): Introduction: blood coagulation. *Methods Enzymol*, Vol. 222, 1-10
- Marrakchi N**, Mabrouk K, Regaya I, Sarray S, Fathallah M, Rochat H, El Ayeb M (2001): Lebetin peptides: potent platelet aggregation inhibitors. *Haemostasis*, Vol. 31, 207-210
- Matsumoto S**, Saito H, Inui K (1994): Transepithelial transport of oral cephalosporins in human intestinal epithelial cells, Caco-2: interaction with dipeptide transport systems in apical and basolateral membrane. *J Pharmacol Exp Ther*, Vol. 270, 498-504
- Matthews DM** (1987): Mechanisms of the peptide transport. *Beitr Infusionsther Klin Ernahr*, Vol 17, 6-53
- Matthews DM**, Laster L (1965): Kinetics of intestinal active transport of five neutral amino acids. *Am J Physiol*, Vol. 208, 593-600
- Matzdorff AC** (2000): Evaluation of platelet activation in coronary artery disease – the role of flow cytometry. *Infus Ther Transfus Med*, Vol. 27, 237-242
- McCabe DJH**, Harisson P, Mackie IJ, Sidhu PS, Purdy G, Lawrie AS, Watt H, Brown MM, Machin SJ (2004): Platelet degranulation and monocyte-platelet complex formation are increased in the acute and convalescent phases after ischaemic stroke or transient ischaemic attack. *Br J Haematol*, Vol. 125, 777-787

- McKenzie** ME, Malinin AI, Bell CR, Dzhanashvili A, Horowitz ED, Oshrine BR, Atar D, Serebruany VL (2003): Aspirin inhibits surface glycoprotein IIb/IIIa, P-selectin, CD 63 and CD 107a receptor expression on human platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis*, Vol. 14, 249-253
- Merten** M, Beythien C, Gutensohn K, Kühnl P, Meinertz T, Thiagarajan P (2005): Sulfatides activate platelets through P-selectin and enhance platelet and platelet-leukocyte aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 25, 258-263
- Messina** MJ (1999): Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr*, Vol. 70, 439-450
- Minamino** T, Kitakaze M, Sanada S, Asanuama H, Kurotobi T, Koretsune Y, Fukunami M, Kuzuya T, Hoki N, Hori M (1998): Increased expression of P-selectin on platelets is a risk factor for silent cerebral infarction in patients with arterial fibrillation. *Circulation*, Vol. 98, 1721-1727
- Mischke** R, Schulze U (2004): Studies on platelet aggregation using the Born method in normal and uraemic dogs. *Vet J*, Vol. 168, 270-275
- MöLab** (2002): Aggregationsprofiler PAP 4ff Bedienungshandbuch. *MöLab* (Hrsg.), Ausgabe 11/02
- MöLab** (2003): Hämatologie-System Bedienungshandbuch. *MöLab* (Hrsg.), Ausgabe 01/03
- Morton** MS, Arisaka O, Miyake N, Morgan LD, Evans BA (2002): Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *J Nutr*, Vol. 132, 3168-3171
- Muntoni** S (1997): Cholesterol-lowering drugs for primary prevention? The WOSCOP study. *Pharmacol Res*, Vol. 35, 169-170
- Murphy** KJ, Chronopoulos AK, Singh I, Francis MA, Moriarty H, Pike MJ, Turner AH, Mann NJ, Sinclair AJ (2003): Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *Am J Clin Nutr*, Vol. 77, 1466-1473
- Nagata** C, Takatsuka N, Kurisu Y, Shimizu H (1998): Decreased serum total cholesterol concentration is associated with high intake of soy products in Japanese men and women. *J Nutr*, Vol. 128, 209-213
- Nakashima** S, Koike T, Nozawa Y (1990): Genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits thromboxane_{A2}-mediated human platelet response. *Mol Pharmacol*, Vol. 39, 475-480
- Nestel** PI, Yamashita T, Sasahara T, Pomeroy S, Dart A, Komesaroff P, Owen A, Abbey M (1997): Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and perimenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 17, 3392-3398
- Neuhauser** HK, Ellert U, Kurth BM (2004): Agreement of Framingham versus SCORE based cardiovascular risk estimations: results of the 1998 German national health interview and examination survey. *J Epidemiol Community Health*, Vol. 58, A42-A43
- Nieswandt** B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fassler R (2001): Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J*, Vol 20, 2120-2130

- Nijveldt** RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM (2001): Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, Vol. 74, 418-425
- Nurden** AT, Macchi L, Bihour C, Durrieu C, Besse P, Nurden P (1994): Markers of platelet activation in coronary heart disease patients. *Eur J Clin Invest*, Vol. 24, 42-45
- Offermanns** S (2000): The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation. *Biol Chem*, Vol. 38, 389-396
- Ohlmann** P, Eckly A, Freund M, Cazenava JP, Offermanns S, Gachet C (2000): ADP induces partial platelet aggregation without shape change and potentiates collagen-induced aggregation in the absence of G_{α_q} . *Blood*, Vol. 96, 2134-2139
- Osterud** B (1997): A global view on the role of monocytes and platelets in atherogenesis. *Thromb Res*, Vol. 85, 1-22
- Ott** I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schomig A (1996): Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation*, Vol. 94, 1239-1246
- Paglieroni** TG, Janatpour K, Gosselin R, Crocker V, Dwyre DM, MacKenzie MR, Holland PV, Larkin EC (2004): Platelet function abnormalities in qualified whole-blood donors: effects of medication and recent food intake. *Vox Sang*, Vol. 86, 48-53
- Pan** YX, Wong EA, Bloomquist JR, Webb KE (2001): Expression of a cloned ovine gastrointestinal peptide transporter (oPepT1) in *Xenopus* oocytes induces uptake of oligopeptide *in vitro*. *J Nutr*, Vol. 131, 1264-1270
- Papazisis** KT, Kalemi TG, Zambouli D, Geromichalos GD, Lambropoulus AF, Kotsis A, Boutis LL, Kortsaris AH (2005): Synergistic effects of protein tyrosine kinase inhibitor genistein with camptothecins against three cell lines *in vitro*. *Cancer Lett*, Vol. 160, 107-113
- Park** YL, Volpe SL, Decker EA (2005): Quantitation of carnosine in human plasma after dietary consumption of beef. *J Agric Food Chem*, Vol. 53, 4736-4739
- Pearson** DA, Paglieroni TG, Rein D, Wun T, Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Gosselin R, Schmitz HH, Keen CL (2002): The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on *ex vivo* platelet function. *Thromb Res*, Vol. 106, 191-197
- Perings** C, Hennersdorf N, Vester EG, Weirich J, Strauer BE (1998): Pathophysiologie, Epidemiologie und Komplikationen des Vorhofflimmerns. *Internist*, Vol. 39, 2-11
- Peterson** G, Barnes S (1993): Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. *Prostate*, Vol. 22, 335-345
- Pforte** H, Hempel J, Jacobasch G (1999): Distribution pattern of a flavonoid extract in the gastrointestinal lumen and wall of rats. *Nahrung*, Vol. 43, 205-208
- Pignatelli** P, Pulcinelli FM, Celestini A, Lenti L, Ghiselli A, Gazzaniga PP, Violi F (2000): The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *Am J Clin Nutr*, Vol. 72, 1150-1155
- Plow** EF, Cierniewski CS, Xiao Z, Haas TA, Byzova TV (2001): $\alpha_3\beta_3$ and its antagonism at the millennium. *Thromb Haemost*, Vol. 86, 34-40

- Poli A** (1997): Cholesterol and coronary heart disease: new data from WOSCOP-study. *Pharmacol Res*, Vol. 35, 171-172
- Pollard M, Luckert PH** (1997): Influence of isoflavones in soy protein isolates on development of induced prostate-related cancers in L-W rats. *Nutr Cancer*, Vol. 28, 41-45
- Potter SM** (1998): Soy protein and cardiovascular disease: the impact of bioactive components in soy. *Nutr Rev*, Vol. 56, 231-235
- Prasain JK, Wang CC, Barnes S** (2004): Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biol Med*, Vol. 37, 1324-1350
- Qian ZY, Jollès P, Migliore-Samour D, Fiat AM** (1995a): Isolation and characterization of sheep lactoferrin, an inhibitor of platelet aggregation and comparison with human lactoferrin. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1243, 25-32
- Qian ZY, Jollès P, Migliore-Samour D, Fiat AM** (1995b): Sheep κ -casein peptides inhibit platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1244, 411-417
- Raj Narayana K, Sripal Reddy M, Chaluvadi MR, Krishna DR** (2001): Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharmacol*, Vol. 33, 2-16
- Rao A, Woodruff RD, Wade WN, Kute TE, Cramer SD** (2002): Genistein and vitamin D synergistically inhibit human prostatic epithelial cell growth. *J Nutr*, Vol. 132, 3191-3194
- Rauch U, Osende JI, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH** (2001): Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med*, Vol. 134, 224-238
- Ravindranath MH, Muthugounder S, Presser N, Viswanathan S** (2004): Anticancer therapeutic potential of soy isoflavones, genistein. *Adv Exp Med Biol*, Vol. 546, 121-165
- Reeds PJ, Burrin DG, Stoll B, Jahoor F** (2000): Intestinal glutamate metabolism. *J Nutr*, Vol. 130, 978-982
- Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL** (2000): Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr*, Vol. 72, 30-35
- Reininger AJ, Spannagl M** (2004): Interaction of von Willebrand factor and platelets at the vessel wall. *LabMed*, Vol. 28, 514-520
- Rice-Evans C, Spencer J** (2004): Molecular mechanisms of the antioxidant properties of flavonoids. *J Inter Soci for Free Radical Res*, Vol. 36, 26-27
- Rimbach G, Weinberg PD, de Pascual-Teresa S, Garcia Alonso M, Ewins BA, Turner R, Minihane AM, Botting N, Failey B, Matsugo S, Uchida Y, Cassidy A** (2004): Sulfation of genistein alters its antioxidant properties and its effect on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1670, 229-237
- Rockson SG, Albers GW** (2004): Comparing the guidelines: anticoagulation therapy to optimise stroke prevention in patients with atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*, Vol 43, 929-935
- Rozalski M, Nocun M, Watala C** (2005): Adenosine diphosphate receptors on blood platelets – potential new targets for antiplatelet therapy. *Acta Biochim Pol*, Vol. 52, 411-415

- Ruggeri ZM** (2002): Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*, Vol. 8, 1227-1234
- Ruggeri ZM** (2003): Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost*, Vol. 1, 1335-1342
- Sack U, Rothe G, Barlage S, Gruber R, Kabelitz D, Kleine TO, Lun A, Renz H, Ruf A, Schmitz G** (2000): Durchflußzytometrie in der Klinischen Diagnostik. *J Lab Med*, Vol. 6/7, 277-297
- Saeed SA, Rascheed H** (2003): Calcium-dependent synergistic interaction of platelet activating factor and epinephrine in human platelet aggregation. *Acta Pharmacol Sin*, Vol. 24, 31-36
- Saeed SA, Rascheed H, Fecto FA, Achakzai MI, Ali R, Connor JD, Gilani AU** (2004): Signaling mechanisms mediated by G-protein coupled receptors in human platelets. *Acta Pharmacol Sin*, Vol. 25, 887-892
- Saeed SA, Rascheed H, Gilani AU** (2003): Synergism interaction between arachidonic acid by 5-hydroxytryptamine in human platelet aggregation is mediated through multiple signalling pathway. *Acta Pharmacol Sin*, Vol. 24, 958-964
- Saito H, Inui K** (1993): Dipeptide transporters in apical and basolateral membranes of the human intestinal cell lines Caco-2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, Vol. 265, G289-G294
- Santell RC, Kieu N, Helferich WG** (2000): Genistein inhibits growth of estrogen-independent human breast cancer cells in culture but not in athymic mice. *J Nutr*, Vol. 130, 1665-1669
- Santoro SA, Walsh JJ, Staazt WD, Baranski KJ** (1991): Distinct determinants on collagen support alpha 2 beta 1 integrin-mediated platelet adhesion and platelet activation. *Cell Regul*, Vol. 2, 905-913
- Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM** (1996): Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*, Vol. 84, 289-297
- Schlereth A** (2001): Speicherproteinmobilisierung und Proteinasen in Protein Bodies von Embryoachsen und Kotyledonen bei *Vicia sativa* L. während der Samenkeimung und des frühen Keimlingswachstums. Diss., Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, *Universität Halle-Wittenberg*
- Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson KJ, Goodall AH, Michelson AD, Nurden AT, Shankey V** (1998): European working group on clinical cell analysis: consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost*, Vol. 79, 885-896
- Schoene NW, Guidry CA** (1999): Dietary soy isoflavones inhibit activation of rat platelets. *J Nutr Biochem*, Vol. 10, 421-426
- Schuchert A, Gulba D, Horstkotte DH, Meinertz T, Tebbe U** (2003): Kommentar zu den ACC/AHA/ESC-Leitlinien 2001 zur Prävention arterieller Thromboembolien bei Patienten mit Vorhofflimmern. *Z Kardiol*, Vol. 92, 694-703
- Schürzinger K** (2004): Die Rolle der Thrombozyten in den frühen Phasen der Atherogenese: eine *In vivo*-Studie an der GPIIb/ApoE-Knock-Out-Maus. Diss., Tierärztliche Fakultät, *Universität München*

- Schwarz U** (2001): Biochemische und Molekularbiologische Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Humanen Thrombozyten und Endothelzellen. Diss., Fakultät für Biologie, *Universität Würzburg*
- Setchell KDR** (2000): Absorption and metabolism of soy isoflavones – from food to dietary supplements and adults to infants. *J Nutr*, Vol. 130, 654-655
- Setchell KDR**, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, Heubi JE (2002a): Soy Isoflavone glycosides do not cross the enterocyte intact: Quantitative importance of intestinal metabolism in their bioavailability. *J Nutr*, Vol. 132, 588-619
- Setchell KDR**, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, Heubi JE (2002b): Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr*, Vol. 76, 447-453
- Setchell KDR**, Cassidy A (1999): Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr*, Vol. 129, 758-767
- Setchell KDR**, Lydeking-Olson E (2003): Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from *in vitro* and *in vivo*, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr*, Vol. 78, 593-609
- Shanmuganayagam D**, Beahm MR, Osman HE, Krueger CG, Reed JD, Folts JD (2002): Grape seed and grape skin extracts elicit a greater antiplatelet effect when used in combination than when used individually in dogs and humans. *J Nutr*, Vol. 132, 3592-3598
- Shapiro AD** (2000): Platelet function disorders, *Haemophilia*, Vol. 6, 120-127
- Shepherd EJ**, Lister N, Affleck JA, Bronk JR, Kellett GL, Collier ID, Bailey PD, Boyd CAR (2002): Identification of a candidate membrane protein for the basolateral peptide transporter of rat small intestine. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 296, 918-922
- Shimomura K**, Ohe T, Uehara S, Matsuhisa M, Kamakura S, Sato I (1989): Significance of atrial fibrillation as a precursor of embolism. *Am J Cardiol*, Vol. 63, 1405-1407
- Shiraga T**, Miyamoto KI, Tanaka H, Yamamoto H, Taketani Y, Morita K, Tamai I, Tsuji A, Takeda E (1999): Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal H⁺/peptide transporter PepT1. *Gastroenterology*, Vol. 116, 354-362
- Siess W** (1989): Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev*, Vol. 69, 58-178
- Siess W**, Lorenz R, Roth P, Weber PC (1982): Plasma catecholamines, platelet aggregation and associated thromboxane formation after physical exercise, smoking or norepinephrine infusion. *Circulation*, Vol. 66, 44-48
- Silbernagel S** (1988): The renal handling of amino acids and oligopeptides. *Physiol Rev*, Vol. 68, 911-1007
- Song J**, Kwon O, Chen S, Daruwala R, Eck P, Park JB, Levine M (2002): Flavonoid inhibition of sodium-dependent vitamin c transporter 1 (SVCT1) and glucose transporter isoform 2 (GLUT2), intestinal transporters for vitamin c and glucose. *J Bio Chem*, Vol. 277, 15252-15260

- Spalding A**, Vaitkevicius H, Dill S, MacKenzie S, Schmaier A, Lockette W (1998): Mechanism of epinephrine-induced platelet aggregation. *Hypertension*, Vol. 31, 603-607
- Spannagl M**, Calatzis A (2002): Point-of-Care Analyse des Hämostasesystems. *J Lab Med*, Vol. 26, 68-76
- Statistisches Bundesamt** (2004): Kosten nach Krankheiten. In: Statistisches Bundesamt (Hrsg.), Gesundheit – Krankheitskosten 2002. Presseexemplar. 9-17
- Suneetha WJ**, Krishnakantha TP (2005): Cardamom extract as inhibitor of human platelet aggregation. *Phytother Res*, Vol. 19, 437-440
- Sztajzel J**, Stalder H (2003): Vorhofflimmern. *Primary Care*, Vol. 3, 785-789
- Terada T**, Sawada K, Saito H, Hashimoto Y, Inui KI (1999): Functional characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2. *Am J Physiol Liver Physiol*, Vol. 276, G1435-G1441
- Thefeld W** (2000): Verbreitung der Herz-Kreislauf-Risikofaktoren Hypercholesterinämie, Übergewicht, Hypertonie und Rauchen in der Bevölkerung. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz*, Vol. 43, 415-423
- Thews G**, Mutschler E, Vaupel P (1999): Thrombozyten und Hämostase. In: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. WVG, 5. Auflage, 134-142
- Thwaites DT**, Hirst BH, Simmons NL (1994): Substrate specificity of the di/tripeptide transporter in human intestinal epithelia (Caco-2): identification of substrates that undergo H⁺-coupled absorption. *Br J Pharmacol*, Vol. 113, 1050-1056
- Touillaud MS**, Pillow PC, Jakovljevic J, Bondy ML, Singletary SE, Li D, Chang S (2005): Effect of dietary intake of phytoestrogens on estrogen receptor status in premenopausal women with breast cancer. *Nutr Cancer*, Vol. 51, 162-169
- Troschke Jv**, Klaes L, Maschewsky-Schneider U, Scheuermann W (2002): Die Deutsche Herz-Kreislauf-Präventionsstudie. Design und Ergebnisse, In: Kolip P, Gesundheitswissenschaften – Eine Einführung, *Juventa-Verlag*, 42-43
- Tsuchiya H**, Sato M, Watanabe I (1999): Antiplatelet activity of soy sauce as functional seasoning. *J Agric Food Chem*, Vol. 47, 4167-4174
- Vantuyghem SA**, Wilson SM, Postenka CO, Al-Katib W, Tuck AB, Chambers AF (2005): Dietary genistein reduces metastasis in a postsurgical orthotopic breast cancer model. *Cancer Res*, Vol. 65, 3396-3403
- Vitseva O**, Varghese S, Chakrabarti S, Folts JD, Freedman, JE (2005): Grape seed and skin extracts inhibits platelet function and release of reactive oxygen intermediates. *J Cardiovasc Pharmacol*, Vol. 46, 445-451
- Vora T**, Corry B, Chung SH (2005): A model of sodium channels. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1668, 106-116
- Waktare JEP** (2002): Atrial fibrillation. *Circulation*, Vol. 106, 14-16
- Walgren RA**, Walle UK, Walle T (1998): Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol*, Vol. 55, 1721-1727

- Walker D**, Thwaites DT, Simmons NL, Gilbert HJ, Hirst BH (1998): Substrate upregulation of the human small intestinal peptide transporter, hPepT1. *J Physiol*, Vol. 507, 697-706
- Walter U**, Geiger J, Haffner C, Markert T, Nehls C, Silber RE, Schanzenbacher P (1995): Platelet-vessel wall interactions, focal adhesions, and the mechanism of action of endothelial factors. *Agents Actions Suppl*, Vol. 45, 255-268
- Waltering A**, Hemkens L, Florack C (2005): Primäre Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen mit Acetylsalicylsäure. *Dtsch Med Wochenschr*, Vol. 130, 2847-2852
- Wang GR**, Zhu Y, Halushka PV, Lincoln TM, Mendelsohn ME (1998): Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: *In vivo* phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 95, 4888-4893
- Wang X**, Yanagi S, Yang C, Inatome R, Yamamura H (1997): Tyrosine phosphorylation and Syk activation are involved in thrombin-induced aggregation of epinephrine-potentiated platelets. *J Biochem*, Vol. 121, 325-330
- Wang YY**, Tang ZY, Dong M, Liu XY, Peng SQ (2004): Inhibition of platelet aggregation by polyaspartoyl-L-arginin and its mechanism. *Acta Pharmacol Sin*, Vol. 25, 469-473
- Wang Z**, Huang Y, Zou J, Cao K, Xu Y, Wu JM (2002): Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation *in vivo* and *in vitro*. *Int J Mol Med*, Vol. 9, 77-79
- Watson SP**, Berlanga O, Best D, Frampton J (2000): Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid? *Platelets*, Vol. 11, 252-258
- Watson SP**, Gibbins J (1998): Collagen receptor signalling in platelets: extending the role of the ITAM. *Immunol Today*, Vol. 19, 260-264
- Webb KE** (1990): Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. *J Anim Sci*, Vol. 68, 3011-3022
- Weikert U**, Rauch U, Kühl U, Hohmann C, Jaster M, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP (2002): Erhöhte Thrombozytenaktivierung bei dilativer Kardiomyopathie: Ein Risikofaktor für die Entwicklung eines Ventrikelthrombus trotz antikoagulatorischer Therapie? *Z Kardiol*, Vol. 91, 423-429
- WHO** (2002): Europäischer Gesundheitsbericht 2002. WHO (Hrsg.), Schriftenreihe 97, 32-37
- WHO** (2004): FAKTENBLATT EURO/06/04. WHO (Hrsg.) 3-5
- Wiesmann F**, Szimtenings M, Frydrychowicz A, Illinger R, Hunecke A, Rommel E, Neubauer S, Haase A (2003): High-resolution MRI with cardiac and respiratory gating allows for accurate *in vivo* atherosclerotic plaque visualization in the murine aortic arch. *Magn Reson Med*, Vol. 50, 69-74
- Wiesner G**, Grimm J, Bittner E (2002): Vorausberechnungen des Herzinfarktgeschehens in Deutschland. Zur Entwicklung von Inzidenz und Prävalenz bis zum Jahr 2050. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz*, Vol. 45, 438-445
- Wijffels MC**, Crijns HJ (2004): Rate versus rhythm control in atrial fibrillation. *Cardiol Clin*, Vol. 22, 63-69

Wilde JI, Retzer M, Siess W, Watson SP (2000): ADP-induced platelet shape change: an investigation of the signalling pathways involved and their dependence on the method of platelet aggregation. *Platelets*, Vol. 11, 286-295

Williamson G, Day AJ, Plumb GW, Couteau D (2000): Human metabolic pathway of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochem Soc Trans*, Vol. 28, 16-22

Wong WW, Smith EO, Stuff JE, Hachey DL, Heird WC, Pownell HJ (1998): Cholesterol-lowering effect of soy protein in normocholesterolemic and hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr*, Vol. 68, 1385-1389

Wu AH, Ziegler RG, Horn-Ross PL, Nomura AM, West DW, Kolonel LN, Rosenthal JF, Pike MC (1996): Tofu and risk breast cancer in Asian-Americans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, Vol. 5, 901-906

Wyse DG (2003): Rhythm versus rate control trials in atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*, Vol. 14, S35-S39

Yamaguchi KT, Gao YH, Ma ZJ (2000): Synergistic effect of genistein and zinc on bone components in the femoral-metaphyseal tissues of female rats. *J Bone Miner Metab*, Vol. 18, 77-83

Zänker KS, Daftary GV, Gottschalk G, Adlercreutz H (2001): Genistein and daidzein: mode of action and bioavailability as chemopreventive agents in a soy-enriched diet. *Z Onkol*, Vol. 2, 37-44

Zeiger F, Stephans S, Hoheisel G, Pfeiffer D, Ruehlmann C, Kokschi M (2000): P-selectin expression, platelet aggregates, and platelet-derived microparticle formation are increased in peripheral arterial disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*, Vol. 11, 723-728

Zeller FJ (1999): Nutzung, Genetik, Biotechnologie. Die Bodenkultur. *Aust J Agric Res*, Vol. 50, 191-202

Zhou X, Thamotharan M, Gangopadhyay A, Serdikoff C, Adibi SA (2000): Characterization of an oligopeptide transporter in renal lysosomes. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1466, 372-378

Zielonka J, Gebicki J, Gryniewicz G (2003): Radical scavenging properties of genistein. *Free Radical Biol & Med*, Vol. 35, 958-965

Zubik L, Meydani M (2003): Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American woman. *Am J Clin Nutr*, Vol. 77, 1459-1465

Referenzen aus dem Internet

1 URL: http://www.transgen.de/einkauf/soja_mais/181.doku.html (Stand der Abfrage: 08.11.2005)

2a URL: <http://www.soystats.com/2004/Default-frames.htm> (Stand der Abfrage: 08.11.2005) Links: world statistics, soybean production, world soybean production 2004

2b URL: <http://www.soystats.com/2004/Default-frames.htm> (Stand der Abfrage: 08. 11. 2005) Links: World Statistics, Protein Meal Consumption, World Protein Meal Consumption 2004

- 3 URL: <http://www.klzh.ch/aktuelles/detail.cfm?id=18&archiv=set> (Stand der Abfrage: 16.11.2005)
- 4 URL: <http://www.foodsubs.com/Soyprod.html> (Stand der Abfrage: 16.11.2005)
- 5 URL: <http://www.ebi.ac.uk> (Stand der Abfrage: 01.12.2005)

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kerstin Borgwardt
Geburtsdatum: 22.05.1976
Geburtsort: Güstrow
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung:

1982 – 1991: Arthur-Becker-Oberschule Güstrow
1991 – 1995: Ernst-Barlach-Gymnasium Güstrow
Abschluss: Abitur

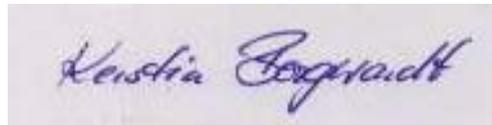
Universitätsausbildung:

1995 – 1997: Studium der Agrarbiologie an der Universität Hohenheim
1997 – 2002: Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Hohenheim
Diplomarbeit: „Ausgewählte natürliche Mineralwässer zur Bedarfsdeckung von *Calcium*, *Kalium* und *Zink* sowie zur Belastung mit dem toxischen Schwermetall *Blei*“
Abschluss: Diplom-Ernährungswissenschaftlerin
2002 – 2005: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Klinische Chemie und Pathologische Biochemie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel "*Modulation der Thrombozytenaggregation durch bioaktive Substanzen der Sojabohne (Glycine max(L)Merr.)*" selbständig angefertigt und diese nicht bereits für eine Promotion oder ähnliche Zwecke an einer anderen Universität eingereicht habe. Alle hierfür benutzten wissenschaftlichen Quellen und Hilfsmittel sind genau und vollständig angegeben worden.

Halle/Saale, den 03.01.2006

A rectangular box containing a handwritten signature in blue ink that reads "Kerstin Borgwardt".

Kerstin Borgwardt