Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik I für Innere Medizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

Der Einfluss von Lipidsenkern und Antimalariamitteln auf die Thrombozytenfunktion

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Folkert Becken
aus Köln

Promoviert am: 19. Januar 2011

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln 2011

Dekanin/Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter

1.Berichtserstatterin/Berichterstatter: Privatdozentin Dr. med. A. Rubbert-Roth
2.Berichterstatterin/Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. T. Benzing

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Köln, den 02.08.2010

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Erhebungen sind von mir nach entsprechender Anleitung durch Frau Privatdozentin Dr. med. A. Rubbert-Roth von mir selbst ausgeführt worden.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Besonderer Dank gebührt Herrn Dr. med. habil. Andreas Perniok für die Überlassung des Themas und der engagierten Betreuung. Mit Geduld, fachlicher Kompetenz und Hilfsbereitschaft hat er mich jederzeit unterstützt und sich der Probleme bei der Durchführung angenommen.

Insbesondere möchte ich auch Frau Privatdozentin Dr. med. A. Rubbert-Roth danken, welche sich mir angenommen hat und die Betreuung der Doktorarbeit weiter fortgeführt hat. Ihr habe ich es zu verdanken, dass die Doktorarbeit letztlich fertig gestellt werden konnte. Ohne sie wäre ein Gelingen der Arbeit nicht möglich gewesen.

Auch bin ich allen Studienteilnehmern zu erheblichen Dank verpflichtet, welche durch die Bereitstellung ihrer Blutproben und ihr Einverständnis diese Studie überhaupt erst ermöglichten. Ich möchte auch dem Ambulanzteam für die Zusammenarbeit danken.
Dem Laborteam der Medizinischen Klinik II gilt ebenfalls ein großer Dank für die Arbeitsplatzbereitstellung und vielen fachlichen Hilfen während der praktischen Durchführung.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern danken, denen diese Doktorarbeit gewidmet ist. Sie ermöglichten mir die Ausbildung, ohne die diese Doktorarbeit nie entstanden wäre und standen mir in jeder Hinsicht zur Seite.
Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Freundin und meinen Freunden bedanken.

Für meine Eltern
in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1) Einleitung **1**
1.1) Thrombozyten 2
1.1.1) Struktur und Funktion von Thrombozyten 2
1.1.2) Die Rolle von Thrombozyten in der Koagulation und Thrombose 4
1.2) Funktionelle Epitope auf Thrombozyten 5
1.2.1) Der Glycoprotein IIb-IIIa-Komplex (CD41) 5
1.2.2) P-Selectin (CD62p; GMP140; PADGEM) 6
1.2.3) Der CD40-Ligand (CD154) 7
1.3) Das Antiphospholipidsyndrom (APS) 10
1.4) Antimalariamittel mit antithrombotischem Effekt 13
1.4.1) Chloroquin und Hydroxychloroquin 13
1.5) Statine (HMG-CoA-Reduktase-Hemmer) 16
2) Fragestellung **19**
3) Material und Methoden **22**
3.1) Patientenkollektiv 22
3.1.1) Blutentnahme 22
3.1.2) Probenaufbereitung und Inkubation 22
3.1.3) Thrombozytenstimulation 23
3.2) Schemata der Probenaufbereitung 25
3.3) Verwendetes Material 27
3.4) Statistik 29
3.4.1) Statistische Analyse der Versuchsdaten 29
4) Ergebnisse 32
4.1) Messung funktioneller Thrombozytenoberflächenepitope unter Chloroquinzusatz 32
4.1.1) Messung der CD62P Expression bei verschiedenen Chloroquin-konzentrationen ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und unter TRAP-Stimulation 32
4.1.2) Vergleich der Daten der APS-Patientin mit den Mittelwerten der übrigen gesunden Probanden 41

4.2) Messung funktioneller Thrombozytenoberflächenepitope unter Hydroxychloroquinzusatz 43
4.2.1) Messung der CD62P-Expression bei verschiedenen Hydroxy-chloroquinkonzentrationen ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und unter TRAP-Stimulation 43
4.2.2) Vergleich der Daten der APS-Patientin mit den Mittelwerten der übrigen gesunden Probanden 51
4.3) Vergleich zwischen Chloroquin und Hydroxychloroquin bezüglich ihres Einflusses auf CD62p-Expression 53
4.4) Messung der CD62P Expression bei verschiedenen Simvastatin-konzentrationen ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und unter TRAP-Stimulation 60
4.5) Messung der CD40L- Expression 62
4.5.1) Messung der CD40L-Expression bei verschiedenen Chloroquin-konzentrationen ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und unter TRAP-Stimulation 62
4.5.2) Vergleich der Daten der APS-Patientin mit den Mittelwerten der übrigen gesunden Probanden 70
4.6) Messung der CD40L-Expression bei verschiedenen Hydroxy-chloroquinkonzentrationen ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und unter TRAP-Stimulation 73
4.6.1) Vergleich der Daten der APS-Patientin mit den Mittelwerten der übrigen, gesunden Probanden 81
4.7) Vergleich zwischen Chloroquin und Hydroxychloroquin bezüglich ihres Einflusses auf CD40L-Expression 83
4.8) Messung der CD40L-Expression bei verschiedenen Simvastatin-konzentrationen ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und unter TRAP-Stimulation 89
4.9) Messung der CD41- Expression 91
4.9.1) Messung der CD41-Expression bei verschiedenen Chloroquin-konzentrationen ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und unter TRAP-Stimulation 91
4.9.2) Vergleich der Daten der APS-Patientin mit den Mittelwerten der übrigen gesunden Probanden 99

4.10) Messung der CD41-Expression bei verschiedenen Hydroxy-chloroquinkonzentrationen ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und unter TRAP-Stimulation 101
4.10.1) Vergleich der Daten der APS-Patientin mit den Mittelwerten der übrigen gesunden Probanden 109
4.11) Vergleich zwischen Chloroquin und Hydroxychloroquin bezüglich ihres Einflusses auf CD41-Expression..... 111
4.12) Messung der CD41-Expression bei verschiedenen Simvastatin-konzentrationen ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und unter TRAP-Stimulation 117
5) Diskussion 120
5.1) Wirkung von Chloroquin und Hydroxychloroquin auf die CD62P, CD41 und CD40L - Expression..... 120
5.2) Vergleich APS-Patientin mit Normalkollektiv 127
5.3) Bestimmung der Epitopenexpression unter Zusatz verschiedener Simvastatinkonzentrationen..... 131
5.4) Resümee 132
6) Zusammenfassung..... 136
7) Literaturverzeichnis..... 139
8) Lebenslauf..... 152

1) Einleitung

Abkürzungsverzeichnis

ADP	**=**	Adenosindiphosphat
ACS	**=**	Akutes Koronarsyndrom
APS	**=**	Antiphospholipidsyndrom
ASS	**=**	Acetylsalicylsäure
ATP	**=**	Adenosintriphosphat
COX	**=**	Cyclooxygenase
EGF	**=**	Epidermal Growth Factor
ICAM	**=**	Intercellular Adhesion Molecule
NO	**=**	Nitric Oxyde
PAF	**=**	Platelet Activating Factor
PBS	**=**	Phosphate Buffered Saline
PDGF	**=**	Platelet Derived Growth Factor
SLE	**=**	sytemischer Lupus erythemathodes
TF	**=**	Tissue Factor
TRAP-6	**=**	Thrombin-Receptor-Activating-Peptide-6
VCAM	**=**	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	**=**	Vascular Endothelial Growth Factor
VWF	**=**	von Willebrand Faktor

1.1) Thrombozyten

1.1.1) Struktur und Funktion von Thrombozyten

Thrombozyten sind kernlose bi-konvexe Zellen mit einem Durchmesser von 1-4µm. Normalerweise zirkulieren ca. 150-400x10^9/l im Blut.

Ihren Ursprung haben sie in hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, wo sie durch Zytoplasmafragmentation ihrer Mutterzellen, den Megakaryozyten, gebildet werden.

Die Verweildauer der Thrombozyten im Blut beträgt im Schnitt 5-11 Tage. [11, 37]

Die Hämostase ist ein komplexer physiologischer Prozess, der zum Stillstand von Blutungen führt. Sie setzt sich aus folgenden drei Komponenten zusammen: Thrombozyten, Plasmaproteinen sowie Blutgefäßen und Endothelien.

Bei Gefäßverletzungen ist das Zusammenwirken aller drei genannten Komponenten gefragt, Blutgefäße konstringieren, Thrombozyten aggregieren und Fibrinogen festigt den Zusammenhalt der aggregierten Thrombozyten. Somit wird ein primärer Wundverschluss herbeigeführt. [37] Dies ist zum einen wichtig um einen weiteren Blutverlust zu verhindern, kann jedoch in pathologischen Zuständen, bei vermehrter Aggregationsbereitschaft von Thrombozyten auch zu Gefäßverschlüssen führen und das Risiko für Myokardinfarkte und zerebralen Ischämien erheblich erhöhen. [19]

Dies funktioniert folgendermaßen: Durch die Verletzung werden subendotheliale Strukturen freigelegt, welche mit den Thrombozyten interagieren.

Diese Interaktion zwischen Thrombozyten auf der einen und subendothelialer Matrix auf der anderen Seite, wird vor allem durch den von Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt, welcher eine Brückenfunktion übernimmt. Dies findet bereits innerhalb von 2-3 Sekunden nach einer Verletzung statt. Dadurch wird der Kontakt zwischen Subendothelium und dem Thrombozytenrezeptorkomplex GPIb/IX/V vermittelt.

Dieser als Adhäsion bezeichnete Prozess wird von einer Aktivierung der Thrombozyten begleitet, welcher zu einer Formänderung der Thrombozyten, zur Freisetzung intrazellulärer Granula und schließlich zur Aggregation führt.

Bei der Formänderung bilden die ansonsten diskoiden Zellen pseudopodienartige Fortsätze und breiten sich fächerförmig aus, wodurch eine Verzahnung der Thrombozyten ermöglicht wird. Die Gesamtoberfläche der Thrombozyten nimmt dadurch um ca. 50% zu. Diese Ausbreitung wird durch Ca^{2+}-abhängige Strukturveränderungen von Aktin und Myosin ermöglicht. [11, 37, 73]

Begleitet wird dieser Prozess von der Sekretion der Inhalte intrazellulärer thrombozytärer Granula (α-Granula und elektronendichte Granula). [37, 66]

Die α-Granula enthalten u.a. Fibrinogen, die Faktoren V und VIII, von Willebrand-Faktor sowie verschiedene Wachstumsfaktoren.

Der Inhalt der elektronendichten Granula setzt sich u.a. aus ATP, ADP, Serotonin und Ca^{2+} zusammen.

Andere Stoffwechselvorgänge in aktivierten Thrombozyten führen u.a. zur Freisetzung von Thromboxan A_2, Platelet Activating Factor (PAF) Epidermal Growth Factor (EGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).

Die genannten Prozesse dienen der Vasokonstriktion sowie der Aktivierung weiterer Thrombozyten. Außerdem werden durch Chemotaxis weitere Entzündungszellen rekrutiert, ebenso ist auch eine wichtige Rolle in der Gewebsregeneration beschrieben worden. [68, 69]

Die Thrombozytenaktivierung führt auch zu einer Konformationsänderung des Glycoprotein IIb-IIIa-Komplexes (CD41), wodurch dieser in einen aktivierten Zustand übergeht, welcher in der Lage ist, gelöstes Fibrinogen zu binden, welches in einer festen Verknüpfung der Thrombozyten untereinander resultiert. [19, 37]

1.1.2) Die Rolle von Thrombozyten in der Koagulation und Thrombose

Den Thrombozyten kommt eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Thrombosen sowie in der Pathogenese der Arteriosklerose zu. Zum einen stellen die Thrombozyten ein wesentliches Gerüst für die Thrombusformation dar und zum anderen exprimieren sie aktiv viele Rezeptoren und sezernieren Substanzen, welchen selbst eine bedeutende Rolle in der Gerinnungskaskade und in inflammatorischen Reaktionen wie z.B. der Arteriosklerose zukommt. [71]

Die Arteriosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung, welche mit der Rekrutierung und Adhäsion, von Leukozyten an das Gefäßendothel einhergeht. Es handelt sich um eine diffuse systemische Erkrankung, welche unter anderem Koronararterien sowie zerebrale Gefäße betreffen kann.

Thrombozyten sind somit sowohl in den Mechanismus der Atherogenese als auch in dem der thrombotischen Komplikationen der Arteriosklerose involviert. [2]

Die Ruptur eines arteriosklerotischen Plaque kann durch die Freilegung subendothelialer Matrixbestandteile zu einer Thrombozytenaktivierung führen und folglich zu einer lokalen Thrombusformation mit konsekutiver Gefäßokklusion, oder zur embolischen Verschleppung von Thrombusmaterial führen.

Klinisch kann dies zu zerebralen Ischämien sowie transistorisch ischämischen Attacken, pektangiöser Symptomatik, Herzinfarkten etc. führen.

Neben der arteriosklerotischen Thrombusbildung, welche hauptsächlich durch Gefäßwandveränderungen ausgelöst wird und verstärkter Thrombozyten-aktivierung, welche bei stabiler und instabiler Angina pectoris, Myokardinfarkt und anderen kardiovaskulären Erkrankungen etc. gefunden wird, spielen venöse Thrombosen noch eine wichtige Rolle in der Klinik. Besonders hervorzuheben sind hier tiefe Beinvenenthrombosen welche u. a. pulmonale Embolien nach sich ziehen können. Für die Pathogenese der venösen Thrombosen ist immer noch die von Rudolph Virchow postulierte Trias, bestehend aus Stase, Wandveränderungen und Hyperkoaguabilität von

entscheidender Bedeutung.

Im Gegensatz zu arteriellen Thrombosen ist die Entstehung der tiefen Venenthrombosen in vielen Fällen nicht so klar, da bei den meisten venösen Thrombosen keine Gefäßwandverletzungen zu finden sind.

Venenthrombosen bestehen in der Regel aus zwei Teilen, einem roten Thrombus, welcher vorwiegend aus Fibrinogen und Erythrozyten besteht und einem weißen Thrombus, welcher größtenteils aus aggregierten Thrombozyten besteht.

Interessanterweise ist hier der Fibrin/Erythrozytenanteil derjenige, welcher an der Gefäßwand haftet. Hier scheint das plasmatische Gerinnungssystem erst sekundär zur Aktivierung von Thrombozyten zu führen. [42]

Eine weitere wichtige Rolle spielen die Thrombozyten in Autoimmun-erkrankungen wie z.B. dem Antiphospholipidsyndrom, in dem neben anderen Einflüssen auf das Gerinnungssytem eine erhöhte Thrombozytenaktivierung beobachtet werden konnte. Analoge Effekte konnten auch beim SLE nachgewiesen werden. [34, 49, 71]

1.2) Funktionelle Epitope auf Thrombozyten

1.2.1) Der Glycoprotein IIb-IIIa-Komplex (CD41)

Der Glycoprotein IIb-IIIa-Komplex (CD41) gehört zur Familie der Integrine.

Integrin-Rezeptoren sind Heterodimere, welche aus einer α-Untereinheit (120-180-kDa) und einer ß-Untereinheit (90-110-kDa) mit jeweils einer Trans-membrandomäne bestehen. Diese Untereinheiten sind nicht-kovalent miteinander verbunden. [6] Um diese heterodimere Struktur beizubehalten, ist die Anwesenheit einer ausreichenden Menge Calcium nötig**.**

Glycoprotein IIb-IIIa (Integrin α2ß3) ist das mit ca. 40.000-80.000 Molekülen am häufigsten auf der Thrombozytenoberfläche vertretene Adhäsionsmolekül und fungiert hauptsächlich als Rezeptor für Fibrinogen, ist jedoch auch in der Lage Fibronectin, Vitronectin, von Willebrand-Faktor, CD40L und Thrombospondin zu binden. [6, 19, 20, 35, 37, 77]

Er stellt einen thrombozytenspezifischen Rezeptor dar, auf unstimulierten

Thrombozyten befindet sich der Rezeptor überwiegend in einer inaktiven Konformation, in welcher er eine niedrige Affinität zu gebundenem Fibrin besitzt. [69, 75]

Der ruhende Thrombozyt exprimiert ca. 70% der gesamten Glycoprotein IIb-IIIa-Komplexe auf seiner Oberfläche. [54, 77]

Die Aktivierung von Thrombozyten durch Agonisten (z.B. ADP; TRAP; Kollagen etc.) führt über eine von innen nach außen gerichteten Signaltransduktionskaskade (inside-out-signalling) zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, welche es ihm ermöglicht, gelöstes Fibrinogen von Willebrand-Faktor sowie andere Liganden zu binden, wodurch Thrombozyten-Thrombozytenaggregation bzw. Thrombozyten-Endothel Interaktionen/ Adhäsionen ermöglicht werden. [54]

Gleichzeitig führt die Bindung von Liganden an den Glycoprotein IIb-IIIa-Rezeptor über eine von außen nach innen gerichteten Signaltransduktionskaskade (outside-in-signalling) zum “Spreading“ des Thrombozyten und einer Externalisierung von weiteren Glycoprotein IIb-IIIa-Rezeptoren, welche aus dem mit der Oberfläche verbundenen Canaliculisystem bzw. den α-Granula der Thrombozyten rekrutiert werden. [54, 75]

1.2.2) P-Selectin (CD62p; GMP140; PADGEM)

Das P-Selectin(CD62p) ist ein Glycoprotein (ca.140kDa), welches der Familie der Integrine angehört. [46, 60, 69]

Dieses Zelladhäsionsmolekül wird hauptsächlich in den α-Granula von Thrombozyten sowie in den Weibl-Palade-bodies der Endothelzellen gespeichert. [7, 69]

Auf der Oberfläche von unstimulierten Thrombozyten findet sich nur eine relativ geringe Anzahl des CD62p-Rezeptors (ca. 62-139 Moleküle/Thrombozyt). Durch Stimulation mit einem Agonisten wie z.B. Thrombin oder TRAP findet eine Translokation des gespeicherten P-Selectins an die Oberfläche statt, wodurch die Anzahl der CD62p-Rezeptoren stark ansteigt (ca. 1508-13000 Moleküle/Thrombozyt), und stellt somit einen bedeutenden Marker für die Thrombozytenaktivierung dar. [7, 34, 46, 53]

Außer von Thrombozyten und Endothelien wird das P-Selectin auch von Leukozyten exprimiert. [66]
Das P-Selectin steuert u.a. die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten bzw. Endothelzellen und Leukozyten, d.h. es vermittelt zum einen die Bindung von Thrombozyten an Endothelien und zum anderen die Bindung von Leukozyten an Endothelien. [4, 7, 63]
Eine besondere Bedeutung kommt dem P-Selectin hier beim initialen „Rollen“ der Leukozyten auf den Endothelien zu. [69]
Tiermodelle konnten bereits zeigen, dass in aktiven atheromatösen Plaques eine erhöhte P-Selectinexpression vorfindbar ist, während diese in älteren inaktiven Plaques fehlt. [4]
Kurz nach der Aktivierung löst sich der Großteil des P-Selectins von der Thrombozytenoberfläche und lässt sich als lösliche Form im Plasma nachweisen.
Nach etwa 30 Minuten befindet sich noch ca. 10% des membrangebundenen P-Selectins auf der Thrombozytenoberfläche.
Kürzlich wurde ebenfalls eine möglich Rolle des P-Selectins in der Entwicklung von Tumormetastasen beschrieben. [43]

1.2.3) Der CD40-Ligand (CD154)

Der CD40-Ligand ist ein trimeres Typ II Transmembranprotein (ca.39kDa) und gehört zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren. [12, 13]
Er ist ubiquitär vorhanden und findet sich auch auf Endothelien, Thrombozyten sowie Zellen des Immunsystemes. [72]
Erstmals wurde der CD40-Ligand Anfang der 1990er auf der Oberfläche von CD4+T-Zellen entdeckt, wo es u.a. mittels Zell-Zell-Kontakt die Differenzierung von B-Zellen beeinflussen kann. [12]
Lange wurde der Interaktion von CD40 und dem CD40-Liganden eine rein immunbiologische Rolle für eine funktionierende humorale Immunreaktion, als sogenanntes kostimulatorisches Molekül, zugesprochen.
Mittlerweile hat sich jedoch gezeigt, das der CD40-Ligand und auch das CD40-Molekül auf einer ganzen Reihe anderer Zellen exprimiert werden, wozu unter

anderem CD4+/CD8+ T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, epitheliale Zellen und Thrombozyten gehören, wobei auch Funktionen jenseits von Immunreaktionen wahrgenommen werden. [12, 64]

1998 zeigten Henn und Kollegen, dass es unter stimulatorischen Bedingungen innerhalb von Sekunden zu einem rapiden Anstieg der CD40L-Epitopendichte auf der Thrombozytenoberfläche kommt, wobei sich auf unstimulierten Thrombozyten nur eine geringe Epitopendichte findet, da es normalerweise hauptsächlich intrathrombozytär gespeichert wird. [13, 26, 29]

Der CD40L Ligand kann somit als Aktivitätsmarker für Thrombozyten verwendet werden. [9]

Nach einer Weile wird das CD40L-Molekül von der Oberfläche abgespalten und geht in eine lösliche Form (sCD40L) über. [13] Als eine mögliche Ursache für diese Abschilferung wird die Bindung von membranständigen CD40L und ko-exprimierten CD40 in Thrombozytenaggregaten genannt, woraufhin es nach Minuten bis Stunden zur Abschilferung des membranständigen CD40L kommt. [38]

Eine direkte Bindung von sCD40L an membranständiges CD40 auf der Thrombozytenoberfläche kann zu einer Autostimulation führen, welche mit erhöhter CD62p-Expression, α- und dense-Granula Freisetzung und den klassischen morphologischen Formänderungen einhergeht. [29]

Andere Studien beschrieben eine Stimulation von Thrombozyten durch Bindung des sCD40L an den Glykoprotein αII-ßIII-Komplex. [38]

Dies führt zu einer vermehrten Expression von P-Selectin auf der Thrombozytenoberfläche, Freisetzung von α-Granula und dense-Granula, sowie zu morphologischen Änderungen „spreading“ der Thrombozyten. Gleichzeitig ist nur eine minimale Aktivierung des GPIIb-IIIa-Komplexes zu verzeichnen. [29]

Der Zell-Zell-Interaktion von CD40 und CD40L wird außerdem eine wichtige Rolle in entzündlichen Prozessen und in der Pathogenese der Arteriosklerose zugesprochen. [29]

Knockoutmäuse, denen der CD40L fehlte, zeigten z.B. eine Störung der Thrombus-Bildung und zeigten einen Schutz vor Arteriosklerose, in welcher ja die Gerinnung und Inflammation einen besonderen Synergismus an den Tag

legen. [37]

Der Nachweis erhöhter Expression des CD40L ist unter anderem bei Patienten mit prokoagulatorischen Zuständen, bei instabiler Angina pectoris und nach cerebrovaskulären Insulten gelungen. [38, 40]

Es gelang sogar schon eine Risikoabschätzung für myokardiale Infarzierungen bei asymptomatischen Patienten anhand der Höhe des löslichen CD40L. [25]

Bei Patienten mit primären Antiphospholipidsyndrom ist ebenfalls eine erhöhte Konzentration von löslichem CD40L im Vergleich mit gesunden Patienten beschrieben worden. Hier erwies es sich auch als fördernder Faktor für die Pathogenese der Arteriosklerose, ein Zusammenhang zu Thrombosen ist jedoch nicht nachgewiesen worden. [1] Eine Bindung von CD40 an den CD40-Liganden auf Endothelien und Fibroblasten führt u.a. zu einer Freisetzung verschiedener Chemokine und Zytokine, sowie zur Hochregulation von Zell-Adhäsionsmolekülen (intercellular adhesion molecule-1/ICAM1, vascular cell adhesionmolecule-1/VCAM1) und Tissue-Factor (TF). [12]

Dem Immunmodulatorpaar CD40 und CD40L kann also eine entscheidende Rolle in der Entwicklung thrombembolischer Komplikationen zugesprochen werden.

Es wird angenommen das eine direkte Verbindung zwischen dem CD40-CD40L System und der Freisetzung von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) sowie Angiopoetin, aus Thrombozyten besteht.

VEGF ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches Adhäsionsmoleküle für Leukozyten auf den Endothelien hochreguliert. Zusätzlich führt VEGF zu einer erhöhten Expression des Tissue-Factor (TF) auf der Endotheloberfläche, welcher eine sehr starke prokoagulatorische Entität darstellt. [9]

Abbildung 1.1)

	GPIIb-IIIa	P-Selectin	CD40L
CD-Klassifikation	CD41a	CD62p	CD154
Familie	Integrine	Selectine	TNF-Rezeptorfamilie
Struktur	Heterodimer	Monomer	Homotrimer
Molekulargewicht (kDa)	α-Untereinheit 120-180 ß-Untereinheit 90-110	140	39
Funktion	Adhäsion Aggregation	Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion	Kostimulatorisches Molekül
Defekt	Thrombasthenie Glanzmann		Hyper IgM-Syndrom

1.3) Das Antiphospholipidsyndrom (APS)

Da es sich beim Antiphospholipidsyndrom um eine eher komplexe Entität handelt, soll es hier, der Übersicht halber, nur kurz mit seinen wichtigsten Aspekten umrissen werden.

Das Antiphospholipidsyndrom ist eine Autoimmunkrankheit, die zum einen durch das Vorhandensein von „positiven“ Laborparametern Antiphospholipid-Antikörpern (Lupus Antikoagulanz und/oder Anticardiolipin Antikörper und oder Anti-β2-Glykoprotein Antikörpern im Serum) charakterisiert ist. Details zu den Diagnosekriterien sowie der Labordiagnostik können der Abbildung 1.2 entnommen werden. Zu den klinischen Kriterien zählen zum einen gesicherte arterielle/venöse Thrombosen (oberflächliche venöse Thrombosen sind hier ausgenommen) und zum anderen eine erhöhte Schwangerschaftsmorbidität.

Hierzu gehören ungeklärte Todesfälle von morphologisch normalen Feten nach

der 10. SSW, eine oder mehrere vorzeitige Entbindungen, Prä-/Eklampsie, Zeichen einer Plazentainsuffizienz sowie 3 oder mehr ungeklärte Aborte vor der 10. SSW. [65]

Ein Antiphospholipidsyndrom liegt vor, wenn mindestens ein klinisches Kriterium und ein Laborkriterium erfüllt sind. [65]

Hier muss erwähnt werden, dass beim Antiphospholipidsyndrom neben prokoagulatorischen auch antikoagulatorische Mechanismen (Hemmung der Aktivierung von Faktor X und Prothrombin u.a.) beobachtet werden können. In der Klinik dominieren jedoch eindeutig thrombembolische Komplikationen. [18, 23]

Der Nachweis des Lupus Anticoagulanz (LA) erfolgt mit der Hilfe einer Reihe von phospholipidabhängigen koagulatorischen Testverfahren (z.B. partielle Thromboplastin Zeit, Russel´s Viper-Venom Test), welche verlängert sind und sich unter der Zugabe von Phospholipiden normalisieren bzw. überkorrigiert werden.

Zum Nachweis des Anticardiolipin Antikörpers (aCL) werden immunologische Testverfahren wie ein ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) herangezogen. [65]

Desweiteren kann zwischen einem primären (idiopathischen) Antiphospholipidsyndrom und einem sekundären Antiphospholipidsyndrom, welches hauptsächlich mit „anderen“ Autoimmunerkrankungen assoziiert ist, unterschieden werden, besonders mit Kollagenosen wie dem systemischen Lupus erythematodes. [34]

Es zeigte sich, dass bezüglich der Klinik, phospholipidbindende Serumproteine das wichtigste Ziel der Antiphospholipid-Antikörper (aPL) darstellten und nicht Phospholipide per se. Hier ist besonders das β2-Glycoprotein I zu nennen, dem eine Funktion als natürliches in vivo Antikoagulanz zugesprochen wird. [65]

Die Inhibition von Antithrombin III (ATIII) und aktiviertem Protein C u.a. ist ebenfalls beschrieben worden. [18]

Neben zahlreichen Einflüssen auf die plasmatische Gerinnung, wird den Antiphospholipid-Antikörpern auch ein direkter Einfluss auf die Thrombozyten zugesprochen.

Mittels Durchflusszytometrie ließen sich zum Beispiel im thrombozytenreichen Plasma von Patienten mit Antiphospholipidsyndrom im Vergleich zum Normalkollektiv, erhöhte Werte der als Aktivierungsmarker fungierenden Membranproteine CD62p und CD63 messen. [34]

Bei Patienten mit Antiphospholipid-Antikörpern finden je nach klinischer Symptomatik ASS, Heparin und Warfarin therapeutische Anwendung. Es ist ebenfalls anzunehmen, dass auch Hydroxychloroquin thrombembolische Komplikationen herabsetzen kann. [24, 65]

Abbildung 1.2)

Kriterien für ein manifestes Antiphospholipidsyndrom
Klinische Kriterien 1. Eine oder mehrere klinisch manifeste Venen/Arterien/kleine Gefäße betreffende Thrombose in der Vorgeschichte 2. Schwangerschaftskomplikationen a) Einen oder mehrere ungeklärte Todesfälle von morphologisch unauffälligen Föten nach der 10. Schwangerschaftswoche (Dokumentation durch Ultraschall oder direkte Untersuchung des Föten) **oder** b) eine oder mehrere Frühgeburten von morphologisch unauffälligen Neugeborenen in oder vor der 34. Schwangerschaftswoche aufgrund von pre-Eklampsie, Eklampsie oder Plazentainsuffizienz **oder** c) 3 oder mehr aufeinander folgende spontane Aborte vor der 10. Schwangerschaftswoche, unter Ausschluss von maternalen und paternalen Chromosomenaberrationen, sowie maternaler anatomischer und hormoneller Auffälligkeiten

Laborkriterien

1. Präsenz von Lupusantikoagulanz im Plasma bei 2 oder mehr Gelegenheiten im Abstand von mindestens 12 Wochen gemessen nach den Richtlinien der International Society of Thrombosis and Hemostasis.

2. Anticardiolipin-Antikörper ACA vom IgM oder IgG Typ im Blut, mit mittlerem bzw. hohem Titer, über 40 G Phospholipidunits oder M Phospholipidunits, oder über der 99. Perzentile, bei 2 oder mehr Gelegenheiten im Abstand von mindestens 12 Wochen (gemessen durch standardisierte ELISA).

3. Anti-β2-Glycoprotein-1(GP1) Antikörper vom IgM oder IgG Isotyp im Plasma (mit Einem Titer über der 99. Perzentile), bei 2 oder mehr Gelegenheiten im Abstand von mindestens 12 Wochen (gemessen durch standardisierte ELISA).

Klinische Kriterien und Laborkriterien für das Antiphospholipidsyndrom [24, 56 65]

1.4) Antimalariamittel mit antithrombotischem Effekt

1.4.1) Chloroquin und Hydroxychloroquin

Die beiden Antimalariamitte Ch + HCQ finden neben der Malariatherapie auch Anwendung in der Therapie der rheumathoiden Arthritis sowie des systemischen Lupus erythemathodes, des Sjögren Syndroms, der Sklerodermie sowie der Psoriasis. [50, 59, 61, 67]

Viele der pharmakokinetischen Daten des Hydroxychloroquins sind von denen des Chloroquins extrapoliert worden. [47]

Für beide Medikamente sind u.a. immunmodulatorische sowie anti-thrombotische Effekte beschrieben worden. [32]

Hydroxychloroquin und Chloroquin besitzen beide eine kationisch-amphiphile Struktur, wodurch ihnen eine freie Membrangängigkeit ermöglicht wird. Das heißt, dass sie Zellmembranen sowie Membranen intrazellulärer Organelle wie z.B. Lysosomen oder im Falle der Thrombozyten auch dense-Bodies frei penetrieren können. [32]

Durch das saure Milieu innerhalb von Lysosomen und oder dense-Bodies, werden Hydroxychloroquin bzw. Chloroquin nach ihrem Eindringen protoniert. Infolge dessen ist es den Medikamenten anschließend nicht mehr möglich Membranen in die entgegengesetzte Richtung zu penetrieren und aus dem Zellinneren zu entweichen. [32, 50]

Diese Eigenschaft führt mitunter zu einer starken Anreicherung in den zellulären Bestandteilen des Blutes, wie z.B. Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten.

Demzufolge ist die gemessene Konzentration im Vollblut höher als im Plasma. Tatsächlich unterscheiden sich diese Konzentrationen um den Faktor 5 bis 10 zugunsten der Vollblutkonzentration. [47]

Da ohnehin viele Daten vom Chloroquin extrapoliert wurden, soll stellvertretend auf die Pharmakokinetik des Chloroquins eingegangen werden.

Die orale Bioverfügbarkeit liegt bei ca. 90%. Die Ausscheidung mit dem Urin liegt bei ca. 60%. Das Verteilungsvolumen liegt im Schnitt bei 115 l/kg.

Die Eliminationshalbwertszeit beträgt 41 Tage und die toxische Konzentration liegt bei 0,25mg/ml. [74]

Die in der Literatur angegebenen Vollblutspiegel bei der täglichen Einnahme von 500 Chloroquin bzw. Hydroxychloroquin liegen bei 32 µg/ml für das Chloroquin, sowie bei 50 µg/ml für das Hydroxychloroquin [5, 21, 23]

Für Chloroquin ist eine dosisabhängige Inhibition der Phospholipase A2 und als Konsequenz daraus eine verminderte Thromboxansynthese beschrieben worden.

Hier ist zu erwähnen, dass Thromboxan eines der stärksten Autostimulantien für Thrombozyten darstellt. [50]

Es hat sich gezeigt, dass Chloroquin die Aggregation von Thrombozyten welche via verschiedender Stimulantien aktiviert wurden (Thrombin, ADP, Kollagen, Adrenalin u.a.), dosisabhängig inhibieren kann [14, 50]

Hydroxychloroquin konnte u.a. in einer klinischen Studie eine signifikante Reduktion von postoperativen Lungenembolien und tiefen Venenthrombosen in einem Kollektiv orthopädischer Patienten zeigen. [10]

Des Weiteren sind Einflüsse auf die Thrombozytenadhäsion sowie Thrombozytenaggregation beschrieben worden, wobei ersterer im Verhältnis stärker ausgeprägt zu sein scheint.

Bei einem Kollektiv von Mäusen, denen zuvor IgG-APS verabreicht worden ist, zeigte Hydroxychloroquin mitunter in Studien ebenfalls einen dosisabhängigen Einfluss auf die Thrombusgröße. [14]

Im Jahre 2002 haben S. Pierangeli et al. in einer Studie, mittels Durchfluss-zytometrie die Oberflächenmarker CD41 und CD61 bestimmt.

In diesem in vitro Versuch wurden Thrombozyten mit TRAP(Thrombin-Receptor-Activating- Peptide-6) bzw. TRAP+IgG-APS stimuliert und die Wirkung verschiedener Hydroxychloroquinkonzentrationen auf die Expression der Oberflächenmarker bestimmt.

In dieser Studie konnte bereits bei einer Hydroxychloroquinkonzentration von 25 µg/ml eine Inhibition der Glykoproteinexpression (CD41; CD61) beobachtet werden. [15]

Ob Hydroxychloroquin jedoch auch einen Einfluss auf die rheologischen Eigenschaften der Erythrozyten hat wird weiterhin kontrovers diskutiert. [14]

Letztendlich muss darauf hingewiesen werden, dass der genaue molekulare Mechanismus der antithrombotischen Wirkung der beiden Antimalariamittel weiterhin unklar bleibt und viele der in Studien beobachten Effekte nicht im Detail erklärt werden können.

Die beschriebenen Wirkungen und Eigenschaften der beiden Medikamente sollten jedoch aufgrund ihrer großen Gemeinsamkeiten nicht komplett getrennt voneinander betrachtet werden.

Abbildung 1.3)

Postulierte antikoagulatorische Effekte von (Hydroxy)Chloroquin
- Inhibition der Phospholipase A2 mit konsekutiv verminderter Thromboxan A2 Synthese
- Beeinflussung von Thrombozyten Adhäsion sowie Aggregation
- fraglicher Einfluss auf die rheologischen Eigenschaften von Erythrozyten
- Inhibition der thrombinabhängigen Konversion von Fibrinogen zu Fibrin
- Inhibition der Thrombozytenaktivierung via ADP, Collagen, Ristocetin, Antiphospholipid Antikörper, TRAP, Adrenalin etc. (genaue Mechanismen unklar)
- Inhibition von intrazellulären Mechanismen die zur vermehrten Expression von GPIIb/IIIa führen wie z.B. Verändrungen des cytosolischen Ca^{2+} oder Aktivierung der p38 MAP Kinase
- Interaktionen mit Membranen und kosekutiver Beeinflussung von Ionenkanal und Rezeptorfunktion
- Einfluss auf die Serotoninfreisetzung und intrazellulärere Protein phosphorylierung

Tabellarische Darstellung von möglichen antikoagulatorischen Mechanismen der Antimalariamittel Chloroquin und Hydroxychloroquin. [14, 33, 50, 51]
Die Effekte, die teilweise für einzelne Medikamente beschrieben wurden, sind hier gemeinsam für beide dargestellt, da diese mit großer Wahrscheinlichkeit auf beide Medikamente zutreffen.

1.5) Statine (HMG-CoA-Reduktase-Hemmer)

Hydroxymethyl-glutaryl Coenzym A Reduktaseinhibitoren haben bereits gezeigt, dass sie einen großen Nutzen in der Primär- sowie Sekundärprävention von koronaren Herzkrankheiten besitzen. [30, 58]
Darüber hinaus konnte eine weitere Studie einen positiven Einfluss von Simvastatin auf die Gehstrecke von Patienten zeigen, welche unter peripherer arterieller Verschlusskrankheit litten, welche Signifikanz erreichte. [22]

Mit der Pharmakokinetik verhält es sich wie folgt: Simvastatin wird oral zu ca. 85% resorbiert und zu 95% an Plasmaproteine gebunden. Über toxische Konzentrationen lassen sich keine Angaben finden. Mit erhöhter Konzentration steigt jedoch das Risiko für Rhabdomyolysen.

Die Halbwertszeit liegt bei 3 Stunden. Die Biotransformation findet in der Leber über CYP3A4 statt. Die Elimination erfolgt überwiegend hepatisch.

Im Allgemeinen wird angenommen, dass der Hauptnutzen von Statinen auf einer Senkung des LDL-Cholesterins im Serum beruht, da diesem eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose zukommt. [76]

Es zeigte sich jedoch, dass das Risiko für artherosklerotische Komplikationen unter Statintherapie jedoch noch niedriger war als erwartet, wenn man den cholesterinsenkenden Effekt für sich betrachtet zugrunde legt.

Dies führte zu der Annahme, dass neben dem cholesterinsenkenden Effekt der Statine noch weitere positive Effekte bestehen, welche schließlich unter dem Terminus „pleiotrope Effekte“ zusammengefasst wurden. [76]

In der MIRACL (Myocardial Ischämia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering) Studie konnte bereits nach 16 Wochen eine Reduktion von ischämischen Ereignissen verzeichnet werden.

Dieses Zeitfenster von 16 Wochen ist zu kurz, um die Effekte auf Änderungen der vaskulären Morphologie zurückzuführen, welche durch die Senkung des Serumcholesterins entstehen. [76]

Viele Studien, die die antithrombotischen Eigenschaften von Statinen untersuchten, beschrieben einen anti-thrombozytären Effekt. [30, 58]

Einige Autoren demonstrierten die anti-thrombozytäre Wirkung mittels durch-flusszytometrischer Bestimmung der Membranglykoproteine von Thrombozyten, wie z.B. CD62p in vivo. [58, 76]

In einer anderen Studie konnte Cervastatin, ex vivo, zu einer signifikanten Minderung der Thrombozytenaggregation führen, während dies in vitro, unter Cervastatinkonzentrationen von 1,10 und 100 nM nicht beobachtet werden konnte. [76]

Fluvastatin konnte in Konzentrationen zwischen 2,5 und 10 µM, in vitro, die IgG-APS vermittelte Expression des Tissue Factors TF auf Endothelzellen

inhibieren. [16]

Eine Reduktion des löslichen CD40L, welches ja einen wichtigen Mediator in der Regulation von entzündlichen Reaktionen in der Arteriosklerose darstellt, ebenfalls Relevanz hat, ist ebenfalls beobachtet worden. [8, 58] Eine verminderte Ausscheidung von Thromboxan B2 im Urin ist ebenfalls beschrieben worden, wodurch eine Beeinflussung der COX-1-Aktivität anzunehmen ist. [58]

Insgesamt ist von einer Reihe LDL-Cholesterin-abhängiger sowie LDL-Cholesterin-unabhängiger Mechanismen der Statine auszugehen, welche die Thrombozytenfunktion beeinflussen. [58]

Die postulierten Mechanismen sind den Tabellen (Abbildung 1.4) zu entnehmen.

Abbildung 1.4)

Thrombozytenhemmende Effekte aufgrund der Cholesterinsenkung
- Modifikation der Membranzusammensetzung von Thrombozyten
- Interaktion dem Na+/K+-Austausch
- Interaktion mit COX-1 Aktivität (Thromboxane)
- Verminderung von zytosolischem Ca2+
- Reduktion der Aktivität verschiedener Signalkaskaden, z.B. mitogen activated protein kinasis (MAPK) u. nuclear factor KappaB (NF-KappaB)

Thrombozytenhemmende Effekte unabhängig von der Cholesterin-senkung
- Modulation der NOS Expression sowie Aktivität
- verminderte Bindung von Ox-LDL an den LOX-1 Rezeptor auf Thrombozyten, sowie Modulation des CD36-Rezeptors auf Mega karyozyten
- Modulation des Eicosanoidrezeptors
- Beeinflussung des Mevalonatweges

Tabellarische Darstellung der postulierten cholesterinabhängigen und cholesterinunabhängigen Mechanismen von Statinen, mit hemmenden Einfluss auf die Thrombozytenfunktion. [58]

2) Fragestellung

Bisher finden Chloroquin und Hydroxychloroquin, ursprünglich Antimalariamittel, hauptsächlich Anwendung in der Malariatherapie sowie in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis und des diskoiden/systemischen Lupus erythematodes.
Chloroquin und Hydroxychloroquin haben jedoch beide, in vitro und in vivo gezeigt, dass sie einen signifikanten, senkenden Effekt bezüglich der Thrombozytenaggregation bzw. Thrombozytenaktivierung besitzen, wobei der genaue Wirkmechanismus noch unklar ist. [14, 15, 52]
Mehrere Publikationen weisen darauf hin, dass SLE-Patienten unter der Einnahme von Hydroxychloroquin weniger zu Thrombosen neigen.
Mit der Durchflusszytometrie steht uns ein Verfahren zur Verfügung um den Phänotyp von Thrombozyten besser zu untersuchen. Dies geschieht hauptsächlich durch die quantitative Bestimmung von Thrombozytenoberflächenproteinen, welche bei Aktivierung dieser verstärkt exprimiert werden.
Ein Hauptaugenmerk soll hier auf den membranständigen CD40-Liganden gerichtet werden, für den noch keine konzentrationsabhängigen Effekte der Antimalariamittel bezüglich dessen Expression beschrieben wurden. Außerdem ist der CD40L auch von besonderem klinischem Interesse, da gezeigt werden konnte, dass ein erhöhter Spiegel von löslichem CD40L mit einem höheren Infarktrisiko einhergeht.
Momentan ist in der Therapie des APS Warfarin/Cumarin das Mittel der Wahl in der Langzeitantikoagulation. Hier könnte z.B. Hydroxychloroquin eine relativ sichere Alternative darstellen, welches nahezu keine Blutungskomplikationen aufweist. [10, 14]
Hydroxychloroquin, welches Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten hemmt, wobei es erstere stärker beeinflusst, könnte unter anderem ASS ergänzen, welches seine Hauptwirkung in der Inhibition der Thrombozyten-aggregation besitzt.
Hydroxychloroquin könnte z.B. seine Wirkung in traumatischen Situationen unter Beweis stellen, in denen viel subendotheliale Matrix freigelegt wird,

wohingegen ASS eher in Situationen in denen Stase das Hauptproblem darstellt von Nutzen sein sollte, wie z.B. Immobilisation nach Operationen.
Eine weitere Indikation für den Einsatz von Hydroxychloroquin könnte der Einsatz bei Patienten mit Aspirinallergie oder gastrointestinalen Blutungen unter ASS sein. [10]
Chloroquin ist in der Lage, die thrombinabhängige Konversion von Fibrinogen zu Fibrin zu inhibieren. [59] Des weiteren kann Chloroquin in vitro eine nahezu komplette Inhibition der Thrombozytenaggregation (turbidometrische Messung) und eine fast vollständige Inhibition der Thromboxan A2 Synthese(RIA) bewirken. [33]
Eine deutliche Inhibition der Thrombozytenaggregation von ADP, Thrombin bzw. von adrenalinaktivierten Thrombozyten konnte ebenfalls nachgewiesen werden. [32, 50]
Des Weiteren interessiert uns hier der antithrombotische Effekt von Statinen.
Einige Autoren zeigten bereits einen antithrombozytären Effekt von Statinen in vivo, welcher mittels durchflusszytometrischer Detektion von membranständigen Glykoproteinen, im speziellen CD62P und CD40L, demonstriert wurde.
Eine Reduktion von löslichem CD40L in hypercholesterinämischen Patienten in Assoziation mit erniedrigten Spiegeln von löslichem CD62P mit Thrombozyten, als primärer Ursprung, wurde ebenso beobachtet.
In klinischen Studien zeigte Simvastatin eine deutliche Senkung der CD62P-Expression. [58]
In vivo konnten bei vielen Patienten in mehreren Studien zahlreiche positive Effekte von Statinen bezüglich thrombembolischer Komplikationen nachgewiesen werden.
Das Hauptaugenmerk soll auch hier auf das Verhalten der CD40L-Expression gerichtet werden, da hier, wie bei den Antimalariamitteln, noch keine konzentrationsabhängigen Effekte nachgewiesen werden konnten. Ebenso wenig konnte eine in vitro Studie eine Beeinflussbarkeit des membranständigen CD40L durch Statine nachweisen.

Folgende Fragestellungen sollen beantwortet werden:

1) Welchen Einfluss haben Chloroquin, Hydroxychloroquin und Simvastatin auf die Expression von CD41; CD62P und insbesondere von CD40L **in vitro**?
2) Können in diesem Zusammenhang konzentrationsabhängige Effekte beobachtet werden?
3) Sind Effekte von Chloroquin und Hydroxychloroquin auch bei APS-Patienten zu beobachten?
4) Welchen Einfluss hat die Art der Stimulantion (ADP, TRAP) auf mögliche zu beobachtende Effekte?
5) Was ergibt ein direkter Vergleich von Chloroquin und Hydroxychloroquin in jeweils korrespondierender Konzentration, bezüglich der Expression von CD41, CD40L und CD62P?

3) Material und Methoden

3.1) Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv besteht innerhalb der Testreihen mit den beiden Antimalariamitteln, Chloroquin und Hydroxychloroquin aus jeweils 8 Patienten. Um eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurden dafür die gleichen Testpersonen verwendet.
Bei einer Testperson bestand ein manifestes APS, welches in den Vergleichen der Epitopenexpressionen innerhalb der Konzentrationsreihe keine Relevanz hat, da die Reaktionen auf Antimalariamittelzusatz analog zu denen des Restkollektives verlaufen.
Die Testperson mit APS stand unter ASS-Therapie, der Rest des Kollektives nahm zum Zeitpunkt der Versuche keine Medikation ein.
Im Simvastatinversuch bestand das Kollektiv aus 5 gesunden Patienten ohne Medikation.
Das Alter des Kollektives liegt zwischen 25 und 56 Jahren.

3.1.1) Blutentnahme

Die Blutentnahmen der Testpersonen fanden zwischen 8 und 12 Uhr morgens statt.
Das Blut wurde mit einer 18G Butterflykanüle entnommen und nach Transport in einem Citrat-Röhrchen umgehend im Labor weiterverarbeitet.

3.1.2) Probenaufbereitung und Inkubation

Von dem mit Citrat antikoaguliertem Vollblut wurden je 100µl in 5 Polypropylene-Falcon tubes pipettiert.
Im Falle des Kontrollansatzes ohne Medikamentenzusatz wurden 900µl Aqua dest. mit 1-prozentigem PBS verdünnt. In den Ansätzen mit Chloroquin und Hydroxychloroquinzusatz wurden die verschiedenen Konzentrationen wie folgt erzeugt: Für die Endkonzentrationen von 25, 50 und 100µg/ml wurden 876,6µl

PBS und 23,4µl Wirkstofflösung zum Vollblut hinzugegeben.
Im Falle der Endkonzentration von 2000µg/ml wurde zum Vollblut 853,2µl PBS und 46,8µl der für die zu erzielende Endkonzentration nötigen Wirkstofflösung gegeben.
Die Ansätze mit gleichem Volumen wurden allesamt bei Raumtemperatur 30 min. inkubiert.
Im Falle der Testreihe mit dem Cholesterinsenker Simvastatin wurden ebenfalls 5 Röhrchen mit 100µl citratantikoaguliertem Vollblut gefüllt und im Falle der Kontrolle ohne Simvastatinzusatz wurden 900µl PBS hinzugefügt.
Um die Endkonzentrationen von 0,1 / 1 / 10 und 1000µg/ml zu erreichen, wurden dem Vollblut 800µl PBS und 100µl der jeweils für die zu erreichende Konzentration Wirkstofflösung hinzugegeben.
Anschließend fand ebenfalls eine 30minütige Inkubation statt.

3.1.3) Thrombozytenstimulation

Die weitere Verarbeitung der Proben erfolgte für Chloroquin, Hydroxychloroquin und Simvastatin in gleicher Weise.
Aus den so gewonnenen 5 unterschiedlichen Ansätzen (0 / 25 / 50 / 100 und 2000µg/ml Chloroquin bzw. Hydroxychloroquin oder 0 / 0,1 / 1 / 10 und 1000µg/ml Simvastatin) wurden 20µl auf weitere Polypropylene-Röhrchen verteilt.
Alle Messungen wurden als Doppelansatz durchgeführt.
Für die Antikörperpaare CD62p/CD41 und CD40L/CD41 wurden die Messungen jeweils mit einer unstimulierten und mit zwei stimulierten Testreihen durchgeführt.
Als Stimulantien wurden zum einen 10µM TRAP (Thrombin-Receptor-Activating- Peptide-6) TRAP-6 und zum anderen 30µM Adenosindiphosphat (ADP) verwendet.
Zu den 20µl wurden nun 10µl der jeweiligen Stimulanz (ADP oder TRAP) hinzugegeben. Im unstimulierten Ansatz wurde zwecks Volumenausgleiches 10µl PBS anstelle des Stimulus verwendet. Anschließend folgte eine 10minütige Inkubation bei Raumtemperatur.

Nun erfolgte die Zugabe von jeweils 5µl eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers zu den Ansätzen in den Kombinationen CD62p/CD41 oder CD40L/CD41 mit anschließender 5minütiger Inkubation ebenfalls bei Raumtemperatur.
Danach wurde die Reaktion durch Zusatz von 1000µl kaltem PBS und anschließender Lagerung auf Eis gestoppt.
Bis zur Messung nach spätestens 2 Stunden mittels Durchflusszytometrie wurden die Proben lichtgeschützt auf Eis aufbewahrt.

3.2) Schemata der Probenaufbereitung

Abbildung 2.1) Schema für die Versuchsdurchführung mit Chloroquin und Hydroxychloroquin

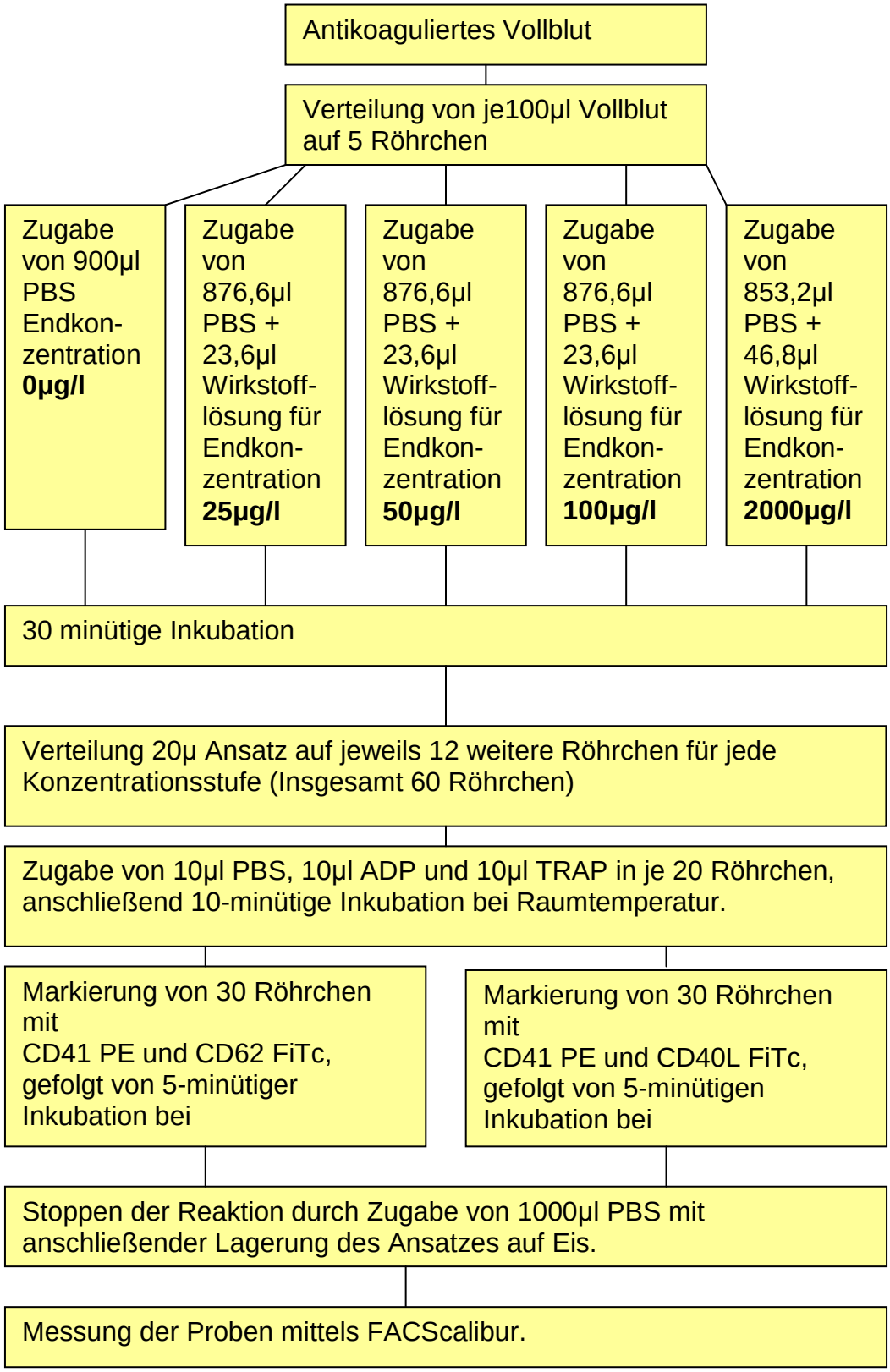
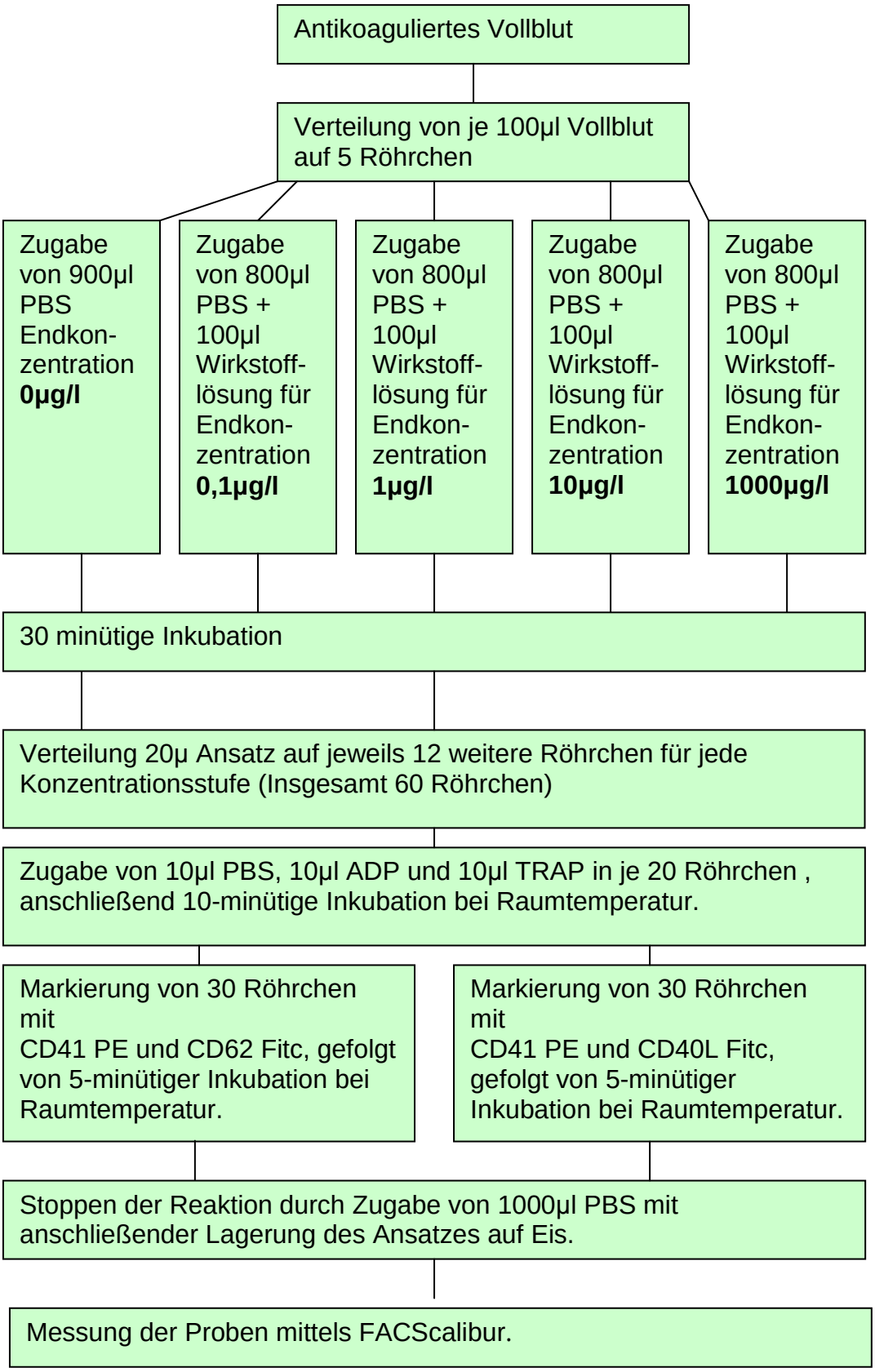


Abbildung 2.2) Schema für die Versuchsdurchführung mit Simvastatin



3.3) Verwendetes Material

Abbildung 2.3)

Antikörper	Klon	Markierung	Hersteller
CD41	P2	PE	Beckman Coulter
CD62p	CLB Thromb/6	FITC	Beckman Coulter
CD40L(CD154)	TRAP	FITC	BD Pharmingen

Liste der in der Studie verwendeten fluoreszenzmarkierten Antikörper.

(Beckman Coulter GmbH Deutschland
Europapark Fichtenhain B13, 47807 Krefeld)
(Beckton Dickinson GmbH Deutschland
Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg)

Durchflusszytometer: FACScalibur von Becton Dickinson
(Beckton Dickinson GmbH Deutschland
Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg)

Medikamente: Chloroquin von Sigma-Aldrich
(Sigma-Aldrich Chemie GmbH Deutschland
Eschenstrasse 5, 82024 Taufkirchen bei München)

Hydroxychloroquin von Sanofi
(Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
Industriepark Höchst Gebäude H831, 65926 Frankfurt)

Simvastatin von AXXORA
(Axxora Deutschland GmbH
Marie-Curie-Straße 8, 79539 Lörrach)

Probenröhrchen:	Polypropylene Falcon Tubes Polysterone Falcon Tubes von VWR International (VWR International GmbH Hilpertstraße 20a, 64295 Darmstadt)
Pipetten:	Eppendorf (Eppendorf AG Deutschland Barkhausweg1, 22339 Hamburg)
Stimulanzien:	TRAP-6 trifluoracetate salt von BACHEM (Bachem Distribution Services GmbH Germany Hegenheimer Str. 5, 79576 am Rhein) ADP Adenisin 5´-Diphosphate Sodium von Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Deutschland Eschenstraße 5, 82024 Taufkirchen bei München)
Software:	Cellquest von Becton Dickinson (Beckton Dickinson GmbH Deutschland Tullastr. 8-12, 69126 Heidelberg) SPSS 14-16 (SPSS GmbH Software Deutschland Rosenheimer Str. 30, 81669 München)

3.4) Statistik

3.4.1) Statistische Analyse der Versuchsdaten

Die Erhebung der Rohdaten erfolgte mittels des Programms CellQuest (Becton-Dickenson), welches automatisch die Mittelwerte der Fluoreszenzen von den gemessenen Ereignissen bildet.

Die Messung wurde so durchgeführt, dass mit dem eingestellten Gate ausschließlich Thrombozyten als Ereignisse erfasst wurden.

Es wurden bei jeder Messung 3000 Ereignisse gemessen und gespeichert, da sich dies bei großen Versuchsansätzen bezüglich statistischer Aussagekraft und Verfälschung der Messwerte durch zu lange Wartezeiten als optimal erwies. Die gewonnenen Rohdaten wurden in das Statistikprogramm SPSS transferiert, mit dem die gesamte folgende statistische Analyse durchgeführt wurde.

Da bei den Mittelwerten der Fluoreszenzen im P-P-Diagramm teilweise größere Abweichungen von der Normalverteilung zu beobachten sind, sowie bei der Testung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung, auf Grund der vielen unterschiedlichen Datensätze ebenfalls mit wenigstens einer Falschaussage zu rechnen ist, wurden die weiteren Analysen mit dem Wilcoxon Signed Rang Test als nichtparametrischer Test durchgeführt.

In den unten abgebildeten Schaubildern sind exemplarisch sechs verschiedene Punktwolken dargestellt, wie sie bei der durchflusszytometrischen Bestimmung der verschiedenen Oberflächenmoleküle entstehen.

FL1-H bzw. FL2-H stellen je zwei verschiedene Fluoreszenzkanäle dar, die es durch fluoreszenzmarkierte Antikörper ermöglichen, das Expressionsniveau zweier unterschiedlicher Epitope auf den Thrombozyten gleichzeitig zu bestimmen.

In dem vorliegendem Fall steht die FL1-H für die CD62p-Expression und die FL2-H für CD41-Expression.

Die Höhe der Werte in den beiden Fluoreszenzen kann als indirekter Parameter für die Thrombozytenaktivierung angesehen werden.

Mittelwert und Median können auf diese Weise unter verschiedenen stimulatorischen Bedingungen sowie Medikamentenzusätzen miteinander verglichen werden.

In den Abbildungen ist exemplarisch derselbe Patient einmal ohne Hydroxychloroquinzusatz (auf der linken Seite) und einmal unter Zusatz von 2000µg/ml Hydroxychloroquin (auf der rechten Seite) dargestellt.

Von oben nach unten führen die Darstellungen über den unstimulierten, den ADP-stimulierten bis zum TRAP-stimulierten Zustand.

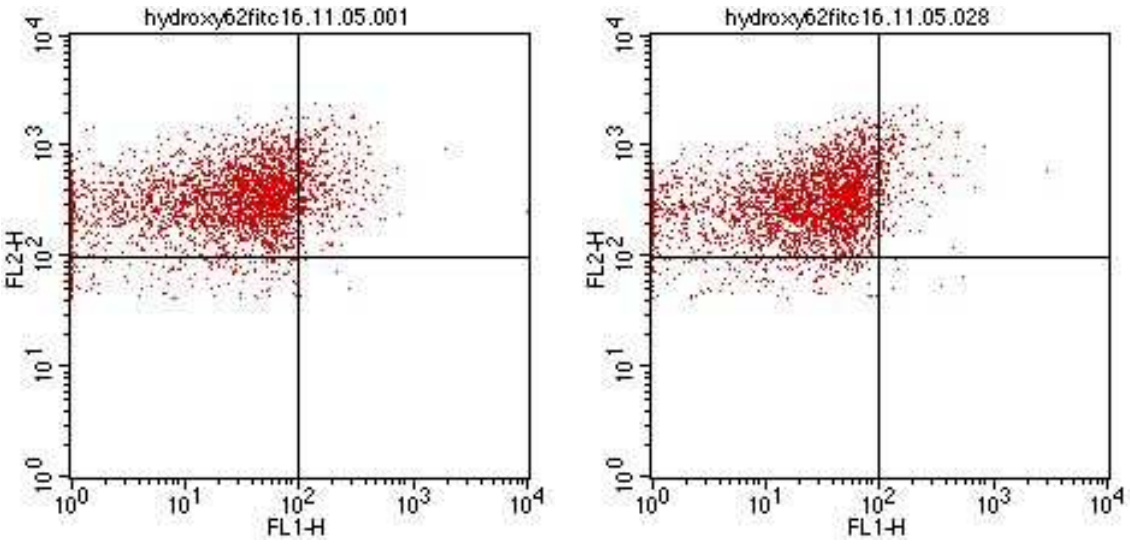
Dies ermöglicht einen anschaulichen Vergleich, da die Schaubilder mit selbiger Stimulation einmal mit und einmal ohne Hydroxychloroquinzusatz gegenübergestellt sind.

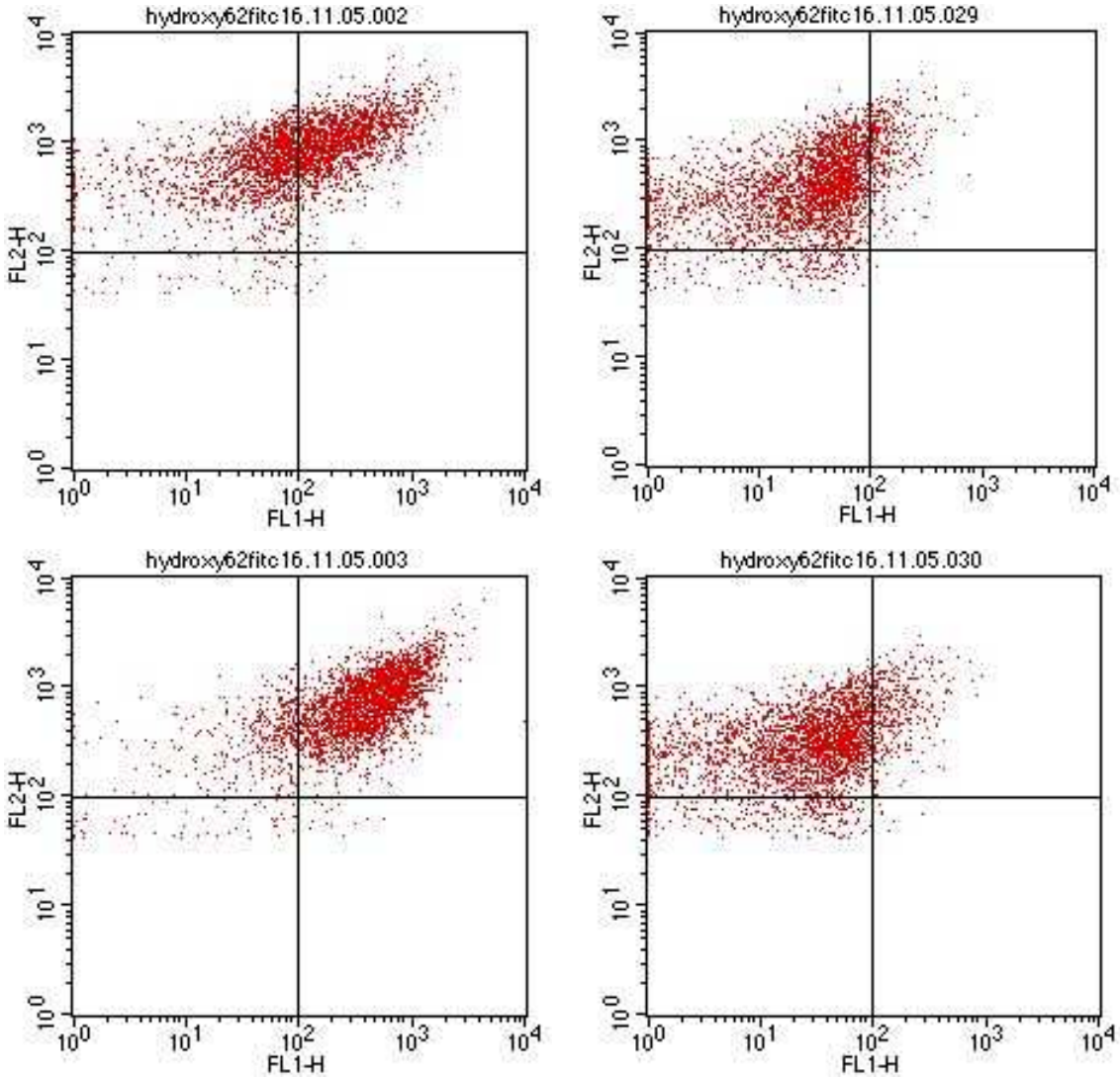
Wie man sieht verschiebt sich die Punktwolke, auf der linken Seite (ohne Hydroxychloroquinzusatz) vom unstimulierten bis hin zum TRAP-stimulierten Zustand auf beiden Achsen hin zu höheren Werten, wobei dies besonders auf der Abzisse (FL1-H) deutlich wird.

Auf der rechten Seite (mit Hydroxychloroquinzusatz) ist zu beobachten, dass sich die Punktwolke unter Stimulation weit weniger zu höheren Werten hin verschiebt, welches besonders in der direkten Gegenüberstellung deutlich wird.

Alle Messungen in den folgenden Testreihen erfolgten in analoger Weise, wobei sie sich nur durch den Zusatz vom Medikament bzw. Antikörper unterscheiden.

Abbildung 3.1)





Darstellung der CD62-Expression (FL1-H) und CD41-Expression (FL2-H) mit und ohne Hydroxychloroquinzusatz.
Stimulation von oben nach unten: unstimuliert; ADP-stimuliert; TRAP-stimuliert.
Auf der linken Seite ist kein Hydroxychloroquin zugesetzt, auf der rechten hingegen schon.
Die jeweils gleich stimulierten Paare sind direkt gegenüber gestellt.

4) Ergebnisse

4.1) Messung funktioneller Thrombozytenoberflächenepitope unter Chloroquinzusatz

4.1.1) Messung der CD62P Expression bei verschiedenen Chloroquinkonzentrationen ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und unter TRAP-Stimulation

Mittels des CD62p-Antikörpers lässt sich die CD62p-Epitopendichte auf der Thrombozytenoberfläche quantitativ erfassen. Da das CD62p-Epitop auf der Oberfläche ruhender Thrombozyten nur im geringen Maße exprimiert wird, sich bei Aktivierung die Expression aber stark erhöht, kann man auf diese Weise Rückschlüsse auf das Aktivierungsniveau der Thrombozyten ziehen.
Eine solche Zunahme zeigt sich auch nach Inkubation mit den Aktivatoren ADP oder TRAP.
Hingegen zeigt sich eine konzentrationsabhängige Verminderung des CD62-Expressionsanstieges nach Zugabe und Inkubation mit dem Antimalariamittel Chloroquin.
Die Abhängigkeit zwischen CD62p-Expression und steigender Chloroquin-konzentration wird in den folgenden Statistiken verdeutlicht.

Erläuterungen für die Schaubilder

c = Chloroquin
h = Hydroxychloroquin
n = nicht stimuliert
a = ADP-stimuliert
t = TRAP-stimuliert

Abbildung 4.1.1)

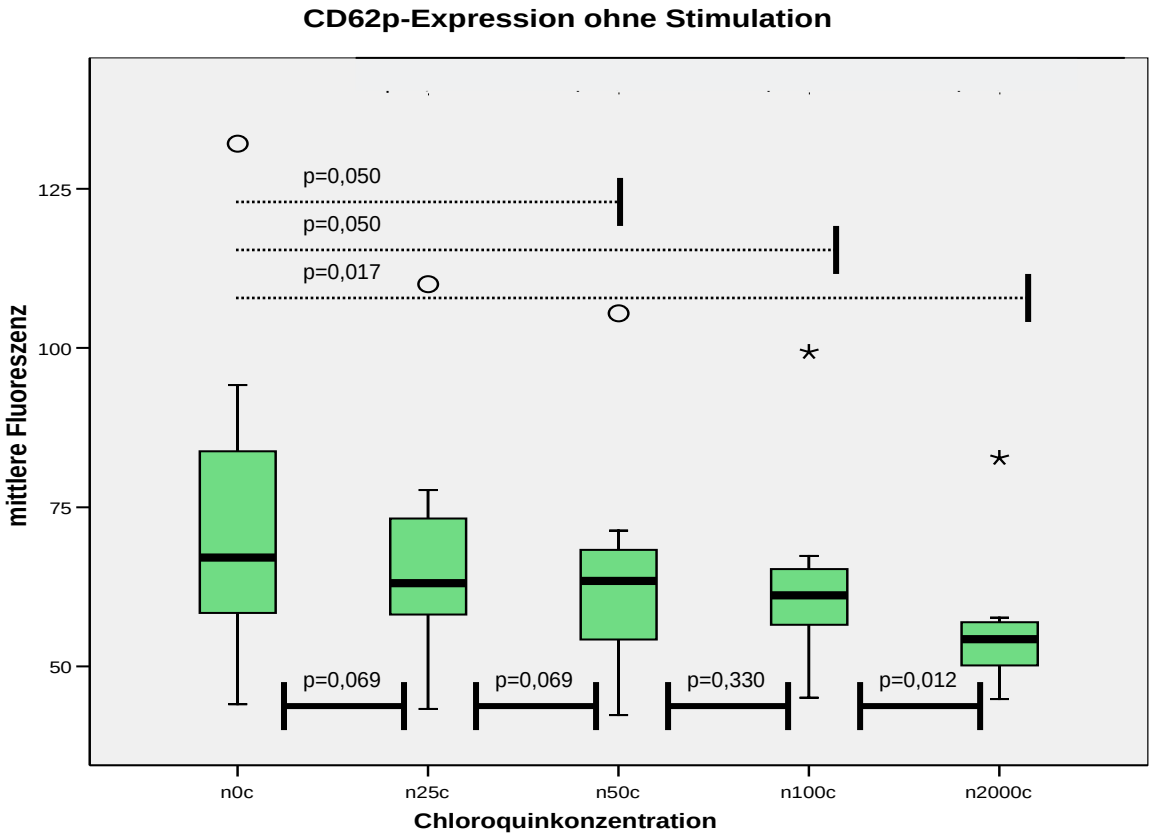


Abbildung 4.1.2)

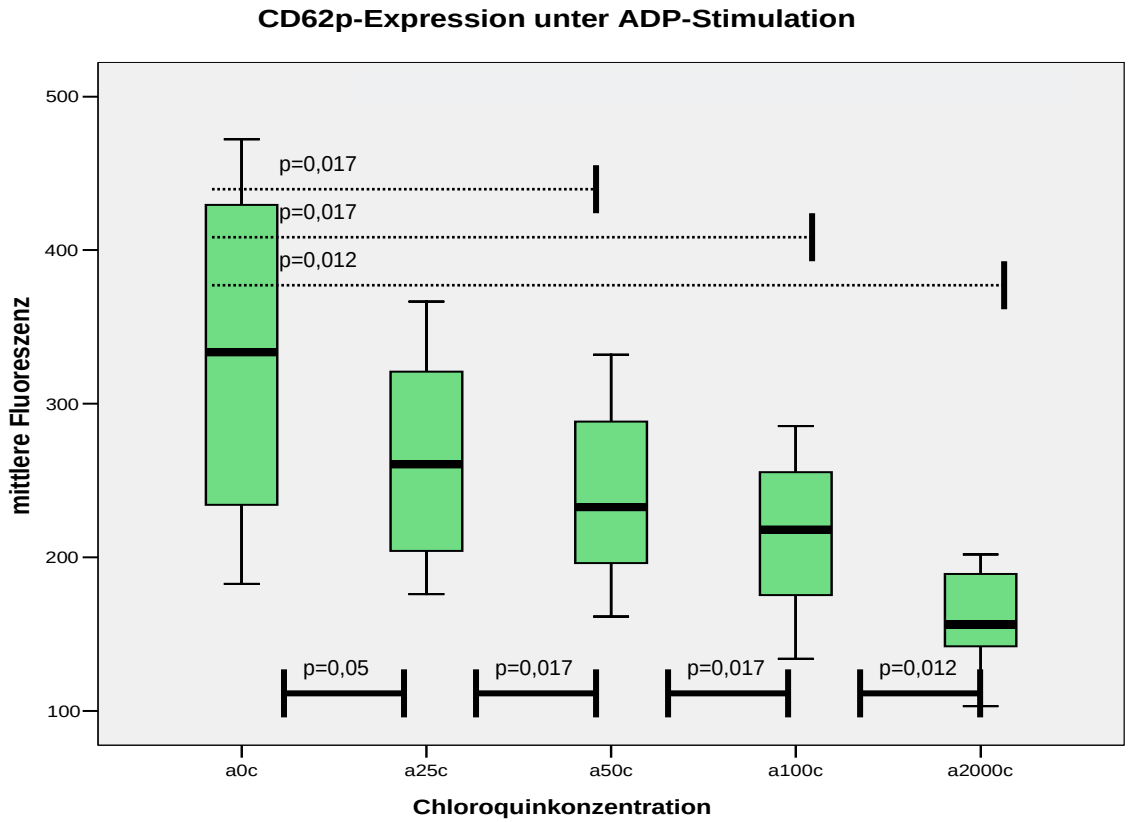
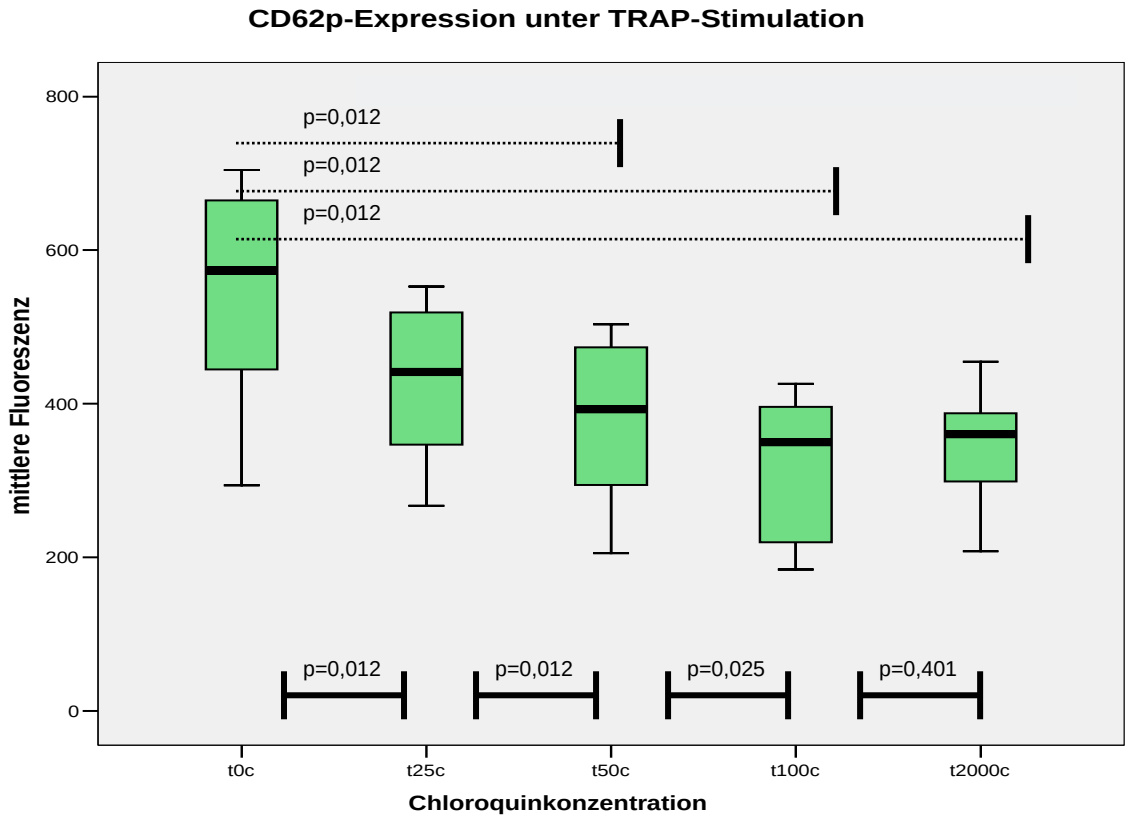


Abbildung 4.1.3)



Graphische Darstellung der Verteilung der mittleren Fluoreszenz und der Mediane in dimensionslosen Einheiten mit Angabe des Signifikanzniveaus zwischen den mittleren Fluoreszenzen bei steigender Chloroquinkonzentration (von links nach rechts 0, 25, 50,100, 2000 in µg/ml). Die gestrichelten Linien kennzeichnen das Signifikanzniveau, der jeweiligen Konzentration, im Bezug auf den Nullwert, ohne Medikamentenzusatz, die durchgehenden schwarzen Linien kennzeichnen das Signifikanzniveau zwischen den einzelnen, benachbarten Konzentrationsschritten.

*Werte, die mehr als den 1,5-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Ausreißer und sind durch ein " o " gekennzeichnet. Werte, die mehr als den 3-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen gelten als Extremwerte und werden mit einem " * " gekennzeichnet.*

Bei der Messung der CD62p Epitopendichte in der unstimulierten Testreihe zeigte sich ohne Stimulation, unter Zugabe von Chloroquin, zwischen den Konzentrationen 100 und 2000µg/ml, ein signifikanter Rückgang der Epitopendichte (p=0,012).

Zwischen den Konzentrationen 25 und 50µg/ml wird eine signifikante Verminderung der Epitopendichte knapp verfehlt, es lässt sich jedoch ein deutlicher Trend erkennen (p=0,069). Hingegen kann zwischen den Konzentrationen 50 und 100µg/ml keine Signifikanz und kein Rückgang der Epitopendichte beobachtet werden (p=0,33).

Die Spannweite verringert sich kontinuierlich mit steigender Chloroquin-konzentration. Unter ADP-Stimulation verhält es sich mit der Epitopendichte folgendermaßen, zwischen allen Konzentrationsstufen ist eine signifikante Veminderung der CD62p Expression festzustellen (0-25µg/ml p=0,05; 25-50µg/ml p=0,017; 50-100µg/ml p=0,017; 100-2000 µg/ml p=0,012). Die Spannweite nimmt stetig mit jeder Konzentrationserhöhung ab, während die Werte der Spannweite im Vergleich mit den selbigen Konzentrationen in der Versuchsreihe ohne Stimulation alle höher ausfallen.

Die Stimulation mit TRAP zeigt zwischen den Konzentrationen 0 und 25µg/ml, 25 und 50µg/ml beziehungsweise zwischen 50 und 100µg/ml einen signifikanten Abfall der Epitopendichte (p=0,012, p=0,012 und p=0,025).

Unter der höheren Chloroquinkonzentration von 2000µg/ml zeigt sich gegenüber der vorangegangenen Konzentration von 100µg/ml ein Anstieg der Epitopendichte, der jedoch nicht signifikant ist (p=0,401).

Abbildung 4.1.4)

CD62p Expression auf der Thrombozytenoberfläche ohne Stimulation				
Chloroquinkonzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	67,09	74,33	17,7	88,01
25	63,08	67,77	12,43	66,71
50	63,38	64,94	11,54	63,09
100	61,15	63,79	9,09	54,33
2000	54,27	56,28	6,62	37,85

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	25-50	50-100	100-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,069	0,69	0,33	0,012

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichung und des Quartilsabstandes der CD62p Expression auf unstimulierten Thrombozyten, sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Chloroquins.

Darstellung des Signifikanzniveaus zum Ausgangswert ohne Chloroquinzusatz				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	0-50	0-100	0-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,69	0,05	0,05	0,017

Darstellung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zum jeweiligen Ausgangswert von 0µg/ml Medikamentenzusatz.

Abbildung 4.1.5)

CD62p Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter ADP-Stimulation				
Chloroquinkonzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	333,7	331,23	99,76	289,42
25	260,71	264,31	56,45	190,49
50	232,64	241,03	46,92	170,58
100	217,89	214,65	39,33	151,52
2000	156,26	160,04	25,99	98,72

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	25-50	50-100	100-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,05	0,017	0,017	0,012

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichung und des Quartils-abstandes der CD62p Expression auf ADP-stimulierten Thrombozyten sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Chloroquins.

Darstellung des Signifikanzniveaus zum Ausgangswert ohne Chloroquinzusatz				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	0-50	0-100	0-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,05	0,017	0,017	0,012

Darstellung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zum jeweiligen Ausgangswert von 0µg/ml Medikamentenzusatz.

Abbildung 4.1.6)

CD62p Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter TRAP-Stimulation				
Chloroquinkonzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	573,33	545,42	110,89	410,54
25	441,21	429,08	79,48	285,53
50	392,88	378,73	86,96	297,62
100	350,11	317,71	79,40	241,75
2000	360,69	344,68	66,02	246,49

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	25-50	50-100	100-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,012	0,012	0,025	0,401

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichung und des Quartils-abstandes, der CD62p Expression auf TRAP-stimulierten Thrombozyten sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Chloroquins.

Darstellung des Signifikanzniveaus zum Ausgangswert ohne Chloroquinzusatz				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	0-50	0-100	0-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,012	0,012	0,012	0,012

Darstellung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zum jeweiligen Ausgangswert von 0µg/ml Medikamentenzusatz.

Darstellung der Reduktion des CD62p-Epitopes auf der Thrombozyten-

oberfläche bei steigenden Hydroxy/-Chloroquinkonzentrationen in %, ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und TRAP-Stimulation, im Verhältnis zu den Ausgangswerten bei 0µg/ml Wirkstoffzusatz. Signifikante Änderungen der CD62p-Expression, bezüglich der Ausgangsexpression ohne Medikamenten-zusatz, sind mit **S** *gekennzeichnet.*

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass man bei allen drei Testreihen (unstimuliert, ADP-, bzw. TRAP-Stimulation) einen Effekt bezüglich der CD62p Expression auf der Thrombozytenoberfläche beobachten kann. Einzig bei den Übergängen zwischen den Konzentrationen 25 und 50µg/m sowie zwischen 100 und 2000µg/ml in der TRAP-stimulierten Testreihe ist ein Anstieg des Medianes zu vermerken.

In allen drei Testreihen ist ansonsten eine stetige Reduktion des Medianes sowie des Mittelwertes bei Erhöhung Chloroquinkonzentration zu sehen. Keine Signifikanz ist hierbei in der unstimulierten Testreihe zwischen den Konzentrationsunterschieden 25 und 50µg/ml beziehungsweise 100 und 2000µg/ml vorhanden. Gleiches gilt für den Konzentrationsschritt von 100 auf 2000µg/ml in der mit TRAP- stimulierten Testreihe.

Bei der unstimulierten Testreihe ist der größte Sprung in der Verminderung der CD62p Expression zwischen den Konzentrationen 100 und 2000µg/ml vorhanden. In der ADP-stimulierten Testreihe ist der Rückgang der CD62p-Expression durchweg bei jedem Übergang zur nächsthöheren Chloroquin-konzentration signifikant. Das höchste Signifikanzniveau ist hier beim größten Konzentrationssprung zwischen den Konzentrationen 100 und 2000µg/ml zu verzeichnen.

Im Gegensatz dazu zeigt sich in der TRAP-stimulierten Testreihe nur zwischen den Konzentrationsunterschieden (0-25; 25-50; 50-100µg/ml) ein signifikanter Rückgang in der CD62p Expression, welcher in den ersten beiden Schritten am größten ist.

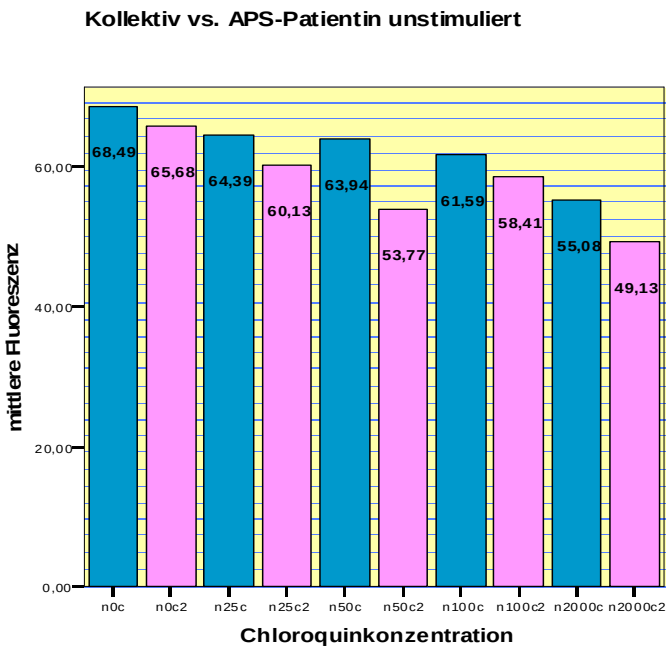
Im Vergleich zum Ausgangswert unter 0µg/ml Chloroquin kann in der unstimulierten Reihe bei den Konzentrationen 50, 100 und 2000µg/ml eine

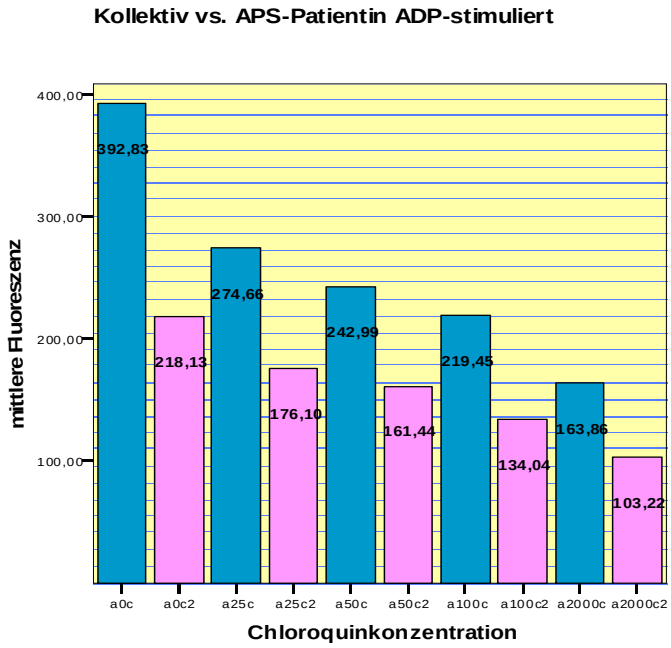
signifikante Reduktion der Epitopendichte beobachtet werden. Unter 25µg/ml Wirkstoff wird diese knapp verfehlt.
Für die beiden stimulierten Testreihen kann für jede Konzentration statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

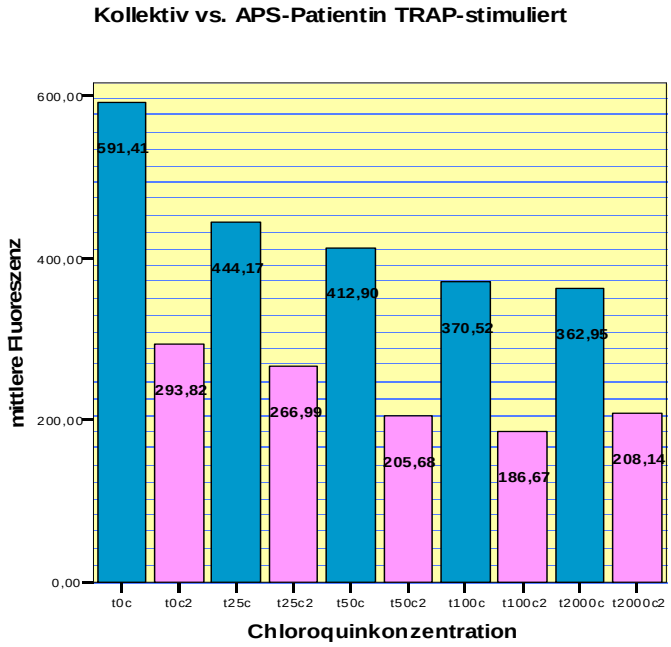
4.1.2) Vergleich der Daten der APS-Patientin mit den Mittelwerten der übrigen gesunden Probanden

Da eine Patientin des Kollektives unter dem APS-Syndrom leidet, wurden die mittleren Fluoreszenzen dieser Patientin mit denen der gesunden Probanden verglichen.

Abbildung 4.1.7)







*Graphische Darstellung der Mediane der mittleren Fluoreszenzen des gesunden Patientenkollektives (**blau**) mit den Messwerten einer APS-Patientin (**lila**) ohne Stimulation, unter ADP- und unter TRAP-Stimulation im Vergleich.*

Wie man in den obigen Diagrammen sieht, reagieren die Thrombozyten der APS-Patientin auf Stimulation und steigende Chloroquinkonzentrationen analog zu denen der gesunden Probanden, wobei lediglich das Grundaktivitätsniveau der von der APS-Patientin stammenden Thrombozyten niedriger ist. Folglich ist die CD62p-Expression hier in der gesamten Messreihe niedriger als die CD62p-Expression in den Messungen des gesunden Kollektives. Hier ist anzumerken, dass die APS-Patientin unter Antikoagulation in Form von ASS stand.
Anzumerken ist auch, dass die Differenzen, zwischen den Messwerten der APS-Patientin und den Medianen des übrigen Kollektives von der unstimulierten Testreihe über die ADP-stimulierte bis zur TRAP-stimulierten Reihe, kontinuierlich zunehmen.

4.2) Messung funktioneller Thrombozytenoberflächenepitope unter Hydroxychloroquinzusatz

4.2.1) Messung der CD62P-Expression bei verschiedenen Hydroxychloroquinkonzentrationen ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und unter TRAP-Stimulation

Analog zu der oben genannten Messung der CD62p-Expression bei verschiedenen Stimulationen und unter verschieden Chloroquinkonzentrationen ist die Testreihe noch einmal mit Hydroxychloroquin anstelle des Chloroquins durchgeführt worden. Hydroxychloroquin und Chloroquin sind zwei chemisch eng miteinander verwandte Antimalariamittel, welche auch in der antirheumatischen Therapie Verwendung finden. Es wurden daher dieselben Konzentrationen verwendet, wie bei der Testreihe mit dem Chloroquin zuvor. Dies ermöglicht später auch einen direkten Vergleich der beiden Medikamente bezüglich ihres Einflusses auf die CD62p-Expression. Es folgen Tabellen und Graphische Darstellungen in gleicher Weise, wie bei der zuvor mit Chloroquin durchgeführten Testreihe.

Abbildung 4.2.1)

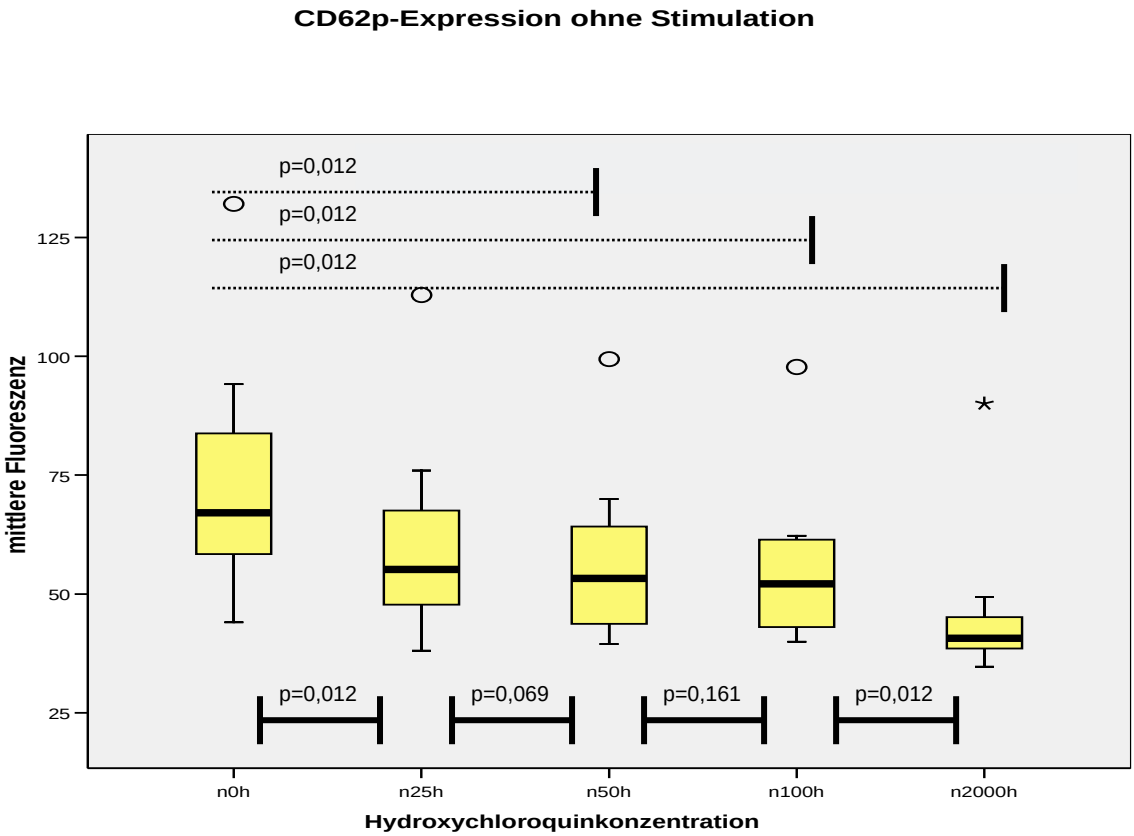


Abbildung 4.2.2)

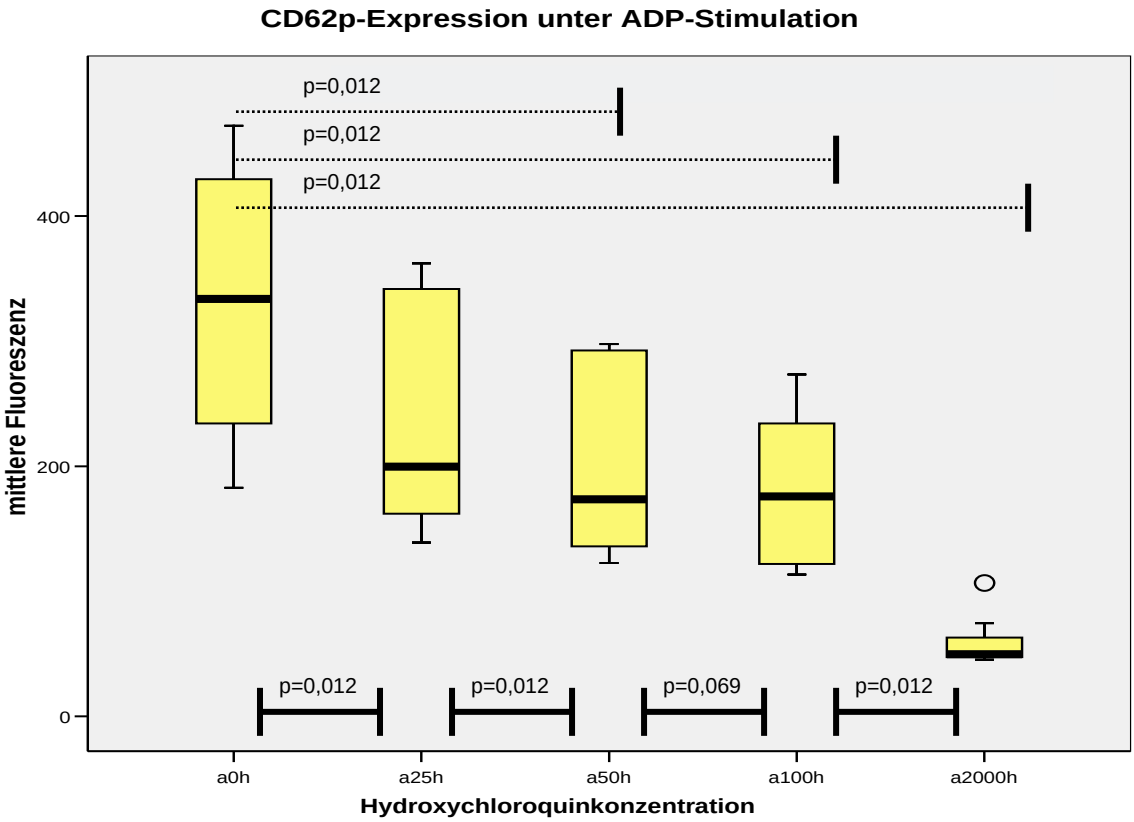
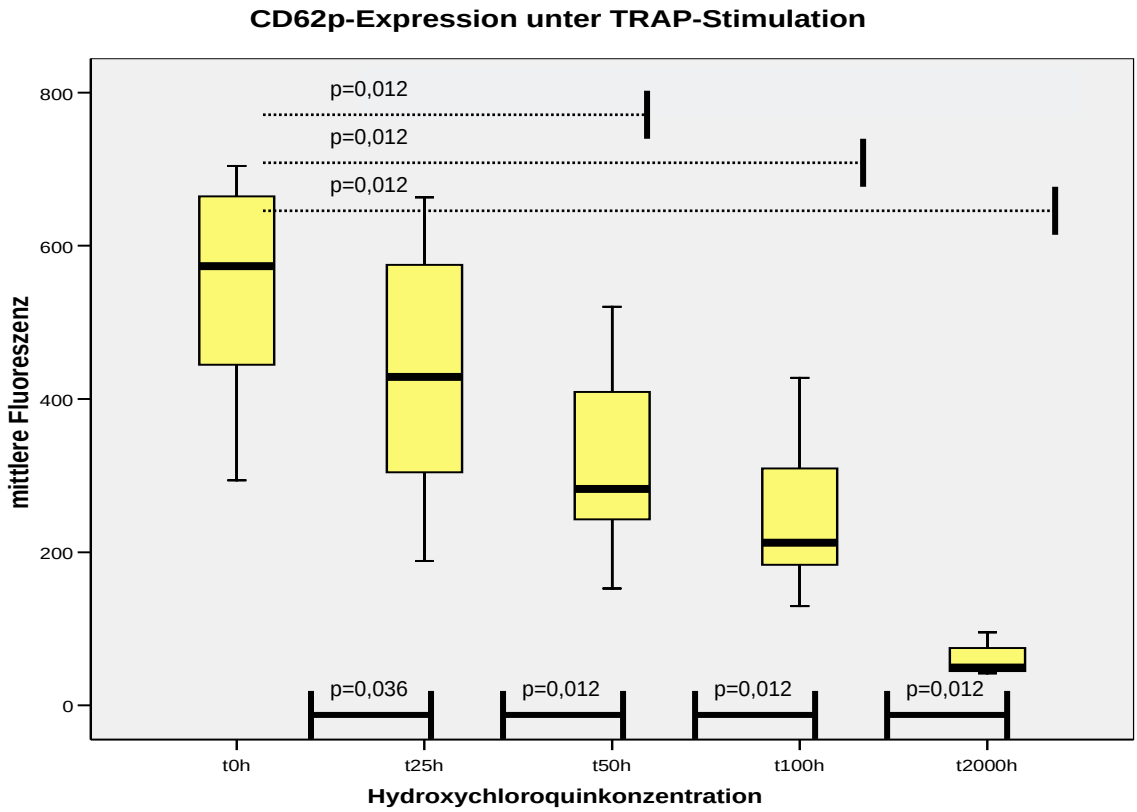


Abbildung 4.2.3)



Graphische Darstellung der Verteilung der mittleren Fluoreszenz und der Mediane in dimensionslosen Einheiten mit Angabe des Signifikanzniveaus zwischen den mittleren Fluoreszenzen bei steigender Chloroquinkonzentration (von links nach rechts 0, 25, 50, 100, 2000 in µg/ml). Die gestrichelten Linien kennzeichnen das Signifikanzniveau, der jeweiligen Konzentration, im Bezug auf den Nullwert, ohne Medikamentenzusatz, die durchgehenden schwarzen Linien kennzeichnen das Signifikanzniveau zwischen den einzelnen, benachbarten Konzentrationsschritten.

*Werte, die mehr als den 1,5-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Ausreißer und sind durch ein " o " gekennzeichnet .Werte, die mehr als den 3-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen gelten als Extremwerte und werden mit einem " * " gekennzeichnet.*

In der unstimulierten Testreihe ist die Reduktion der CD62p-Expression zwischen den Hydroxychloroquinkonzentrationen 0 und 25µg/ml, sowie 100 und 2000 µg/ml signifikant (in beiden Fällen p=0,012). Mit einem P-Wert von 0,069 ist zwischen den Konzentrationen 25 und 50µg/ml noch ein deutlicher Trend zu erkennen.

Unter ADP-Stimulation ist zwischen den Konzentrationen 0 und 25µg/ml, 25 und 50µg/ml, sowie 100 und 2000µg/ml eine deutliche Signifikanz vorhanden (in allen drei Fällen p=0,012). Hingegen ist zwischen den Konzentrationen 50 und 100µg/ml wiederum mit dem P-Wert 0,069 ein Trend zu erkennen.

Letztlich zeigt sich unter TRAP-Stimulation zwischen allen Konzentrationsstufen ein signifikanter Rückgang der CD62p-Expression.

Abbildung 4.2.4)

CD62p Expression auf der Thrombozytenoberfläche ohne Stimulation				
Hydroxychloroquin-konzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	67,09	74,33	17,70	88,01
25	55,18	61,49	14,79	74,83
50	53,31	57,66	12,62	59,91
100	52,14	56,36	11,82	57,78
2000	40,66	46,67	8,63	55,35

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Hydroxychloroquin µg/ml)	0-25	25-50	50-100	100-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,012	0,069	0,161	0,012

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichung und des Quartils-abstandes der CD62p Expression auf unstimulierten Thrombozyten sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Hydroxychloroquins.

Darstellung des Signifikanzniveaus zum Ausgangswert ohne Hydroxychloroquinzusatz				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	0-50	0-100	0-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,012	0,012	0,012	0,012

Darstellung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zum jeweiligen Ausgangswert von 0µg/ml Medikamentenzusatz.

Abbildung 4.2.5)

CD62p Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter ADP-Stimulation				
Hydroxychloroquin-konzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	333,7	331,23	99,76	289,42
25	199,66	238,44	78,20	223,20
50	173,48	203,04	62,98	175,09
100	175,97	181,31	53,82	159,98
2000	49,64	59,03	11,74	61,28

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Hydroxychloroquin µg/ml)	0-25	25-50	50-100	100-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,012	0,012	0,069	0,012

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichung und des Quartils-abstandes der CD62p Expression auf unstimulierten Thrombozyten sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Hydroxychloroquins.

Darstellung des Signifikanzniveaus zum Ausgangswert ohne Hydroxychloroquinzusatz				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	0-50	0-100	0-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,012	0,012	0,012	0,012

Darstellung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zum jeweiligen Ausgangswert von 0µg/ml Medikamentenzusatz.

Abbildung 4.2.6)

CD62p Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter TRAP-Stimulation				
Hydroxychloroquin-konzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	573,33	545,42	110,89	410,54
25	428,84	433,51	146,29	474,81
50	282,74	317,74	88,99	367,96
100	212,35	245,93	71,49	297,66
2000	49,42	59,44	14,64	53,55

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Hydroxychloroquin µg/ml)	0-25	25-50	50-100	100-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,036	0,012	0,012	0,012

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichung und des Quartils-abstandes der CD62p Expression auf unstimulierten Thrombozyten sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Hydroxychloroquins.

Darstellung des Signifikanzniveaus zum Ausgangswert ohne Hydroxychloroquinzusatz				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	0-50	0-100	0-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,036	0,012	0,012	0,012

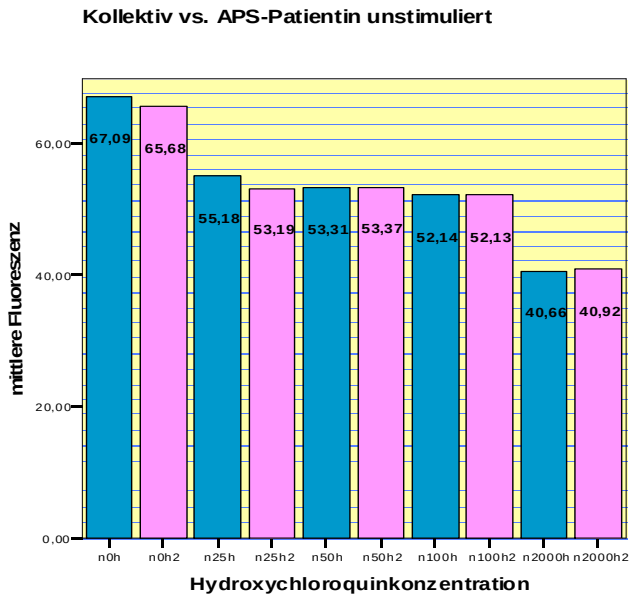
Darstellung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zum jeweiligen Ausgangswert von 0µg/ml Medikamentenzusatz.

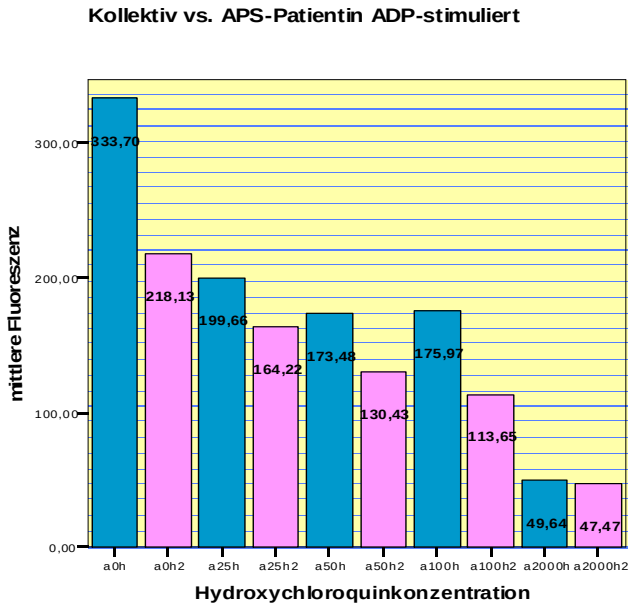
Ähnlich wie beim Chloroquin zuvor ist auch bei dem Versuch mit dem Hydroxychloroquin ein deutlicher Einfluss auf die CD62p-Expression zu beobachten.
In allen drei Testreihen sinken auch hier die Mittelwerte kontinuierlich ab. Mit den Medianen verhält es sich ähnlich. Einzig in der Versuchsreihe unter ADP-Stimulation zeigte sich zwischen den Konzentrationen 50 und 100µg/ml ein Anstieg des Medians, welcher mit einem P-Wert von 0,161 jedoch nicht signifikant ist.
Der Vergleich der CD62p-Expressionen, unter Zusatz der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen, mit der jeweiligen CD62p-Expression ohne Hydroxychloroquinzusatz, unter den Bedingungen unstimuliert, ADP-stimuliert und TRAP- stimuliert, ergab für alle Konzentrationen einen signifikanten Abfall der Epitopendichte.

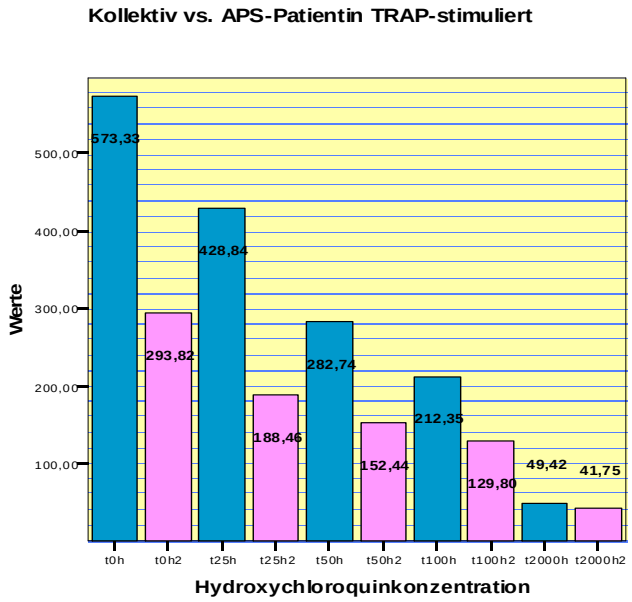
4.2.2) Vergleich der Daten der APS-Patientin mit den Mittelwerten der übrigen gesunden Probanden

Da eine Patientin des Kollektives unter dem APS-Syndrom leidet, wurden die mittleren Fluoreszenzen dieser Patientin mit denen der gesunden Probanden verglichen.

Abbildung 4.2.7)







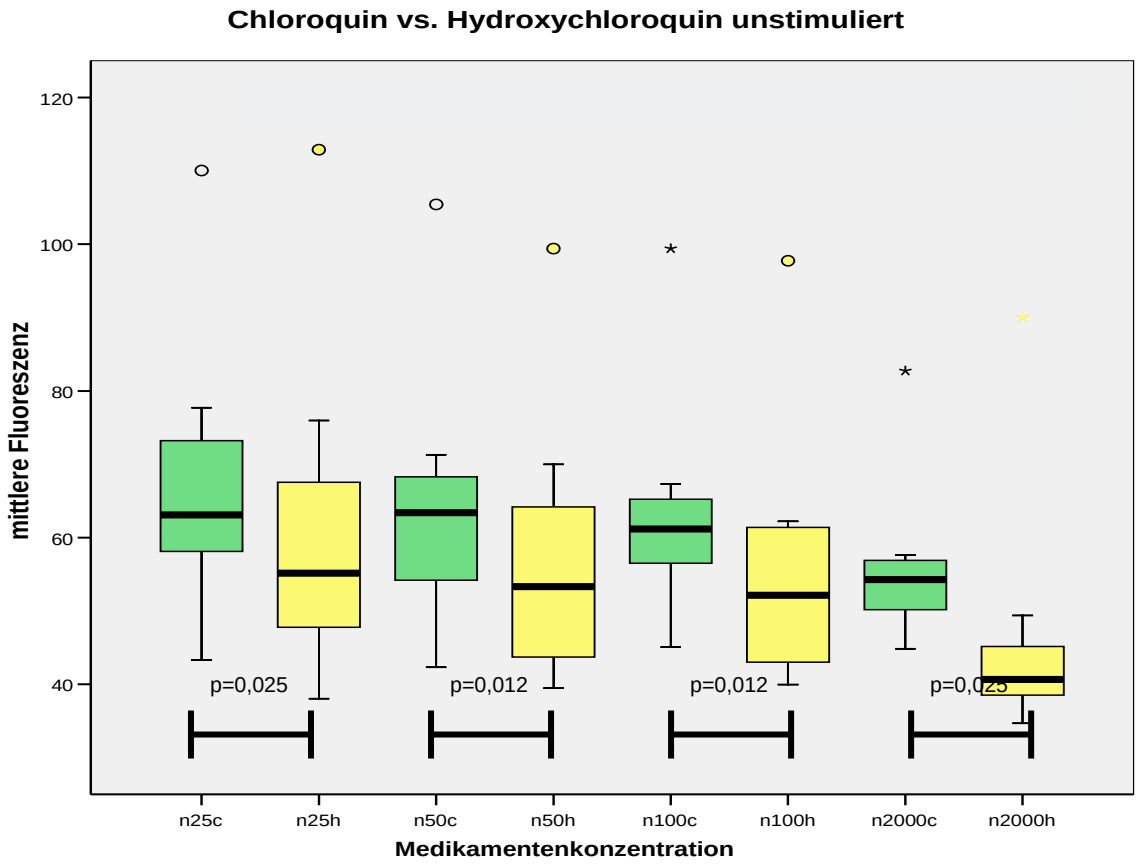
*Graphische Darstellung der Mediane der mittleren Fluoreszenzen des gesunden Patientenkollektives (**blau**) mit den Messwerten einer APS-Patientin (**lila**) ohne Stimulation, unter ADP- und unter TRAP-Stimulation, im Vergleich.*

Anzumerken ist, dass die Differenzen, zwischen den Messwerten der APS-Patientin und den Messwerten des übrigen Kollektives von der unstimulierten Testreihe über die ADP-stimulierte bis zur TRAP-stimulierten Reihe, kontinuierlich zunehmen.
Wie man in den obigen Diagrammen sieht, reagieren die Thrombozyten der APS-Patientin auf Stimulation und steigende Hydroxychloroquinkonzentrationen analog zu denen der gesunden Probanden, wobei lediglich das Grund-aktivitätsniveau, der von der APS-Patientin stammenden Thrombozyten, niedriger ist. Folglich ist die CD62p Expression hier in der gesamten Messreihe geringer als die Mediane der Messungen des gesunden Kollektives. Hier ist wieder anzumerken, dass die APS-Patientin unter Antikoagulation in Form von ASS stand.

4.3) Vergleich zwischen Chloroquin und Hydroxychloroquin bezüglich ihres Einflusses auf CD62p-Expression

Da nun jedes Medikament und sein Einfluss auf die CD62p-Expression in verschiedenen Konzentrationen und unter verschiedenen Stimulationen für sich dargestellt wurde, wurden folglich auch beide Medikamente direkt miteinander verglichen. Es sind immer dieselben Konzentrationen bei derselben Stimulation miteinander verglichen worden.

Abbildung 4.3.1)



*Graphische Darstellung der Verteilung der mittleren Fluoreszenz und der Mediane in dimensionslosen Einheiten mit Angabe des Signifikanzniveaus zwischen den mittleren Fluoreszenzen bei steigender Chloroquin- bzw. Hydroxychloroquinkonzentration (von links nach rechts 25, 50, 100, 2000 in µg/ml). Die jeweils gleichen Konzentrationen von jedem Medikament sind nebeneinander dargestellt. Die Angabe des P-Wertes bezieht sich jeweils auf die Differenz der CD62p-Expression zwischen den korrespondierenden Konzentrationen von Chloroquin (**grün**) und Hydroxychloroquin (**gelb**).*

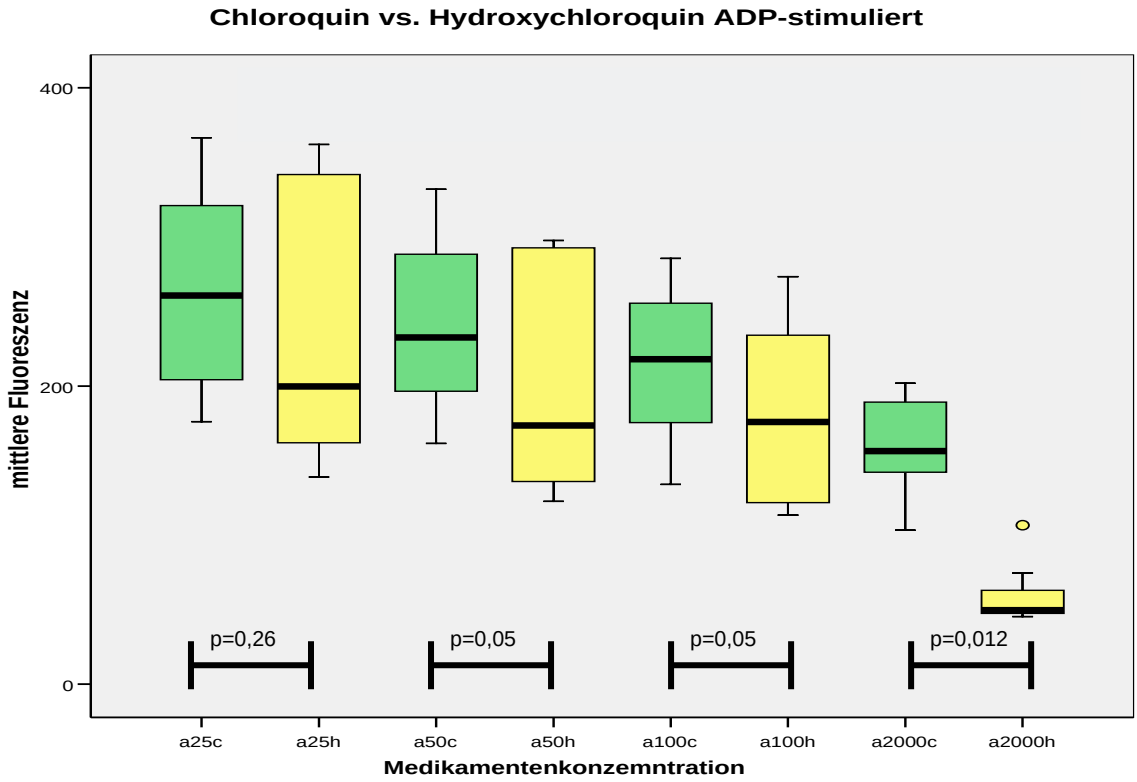
*Werte, die mehr als den 1,5-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Ausreißer und werden durch ein " o " gekennzeichnet. Werte die mehr als den 3-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen gelten als Extremwerte und werden mit einem " * " gekennzeichnet.*

Abbildung 4.3.2)

CD62p Expression auf der Thrombozytenoberfläche ohne Stimulation				
Hydroxy-/Chloroquin-konzentration µg/ml	25	50	100	2000
Mediane Chloroquin	63,08	63,38	61,15	54,27
Mediane Hydroxychloroquin	55,18	53,31	52,14	40,66
Signifikanzniveau (p-Wert)	**0,025**	**0,012**	**0,012**	**0,025**

Darstellung der Mediane, der CD62p Expression auf unstimulierten Thrombozyten, sowie des Signifikanzniveaus, der Differenzen der CD62p-Expression zwischen den jeweils korrespondierenden Konzentrationen der beiden Antimalariamittel.

Abbildung 4.3.3)



Graphische Darstellung der Verteilung der mittleren Fluoreszenz und der Mediane in dimensionslosen Einheiten mit Angabe des Signifikanzniveaus

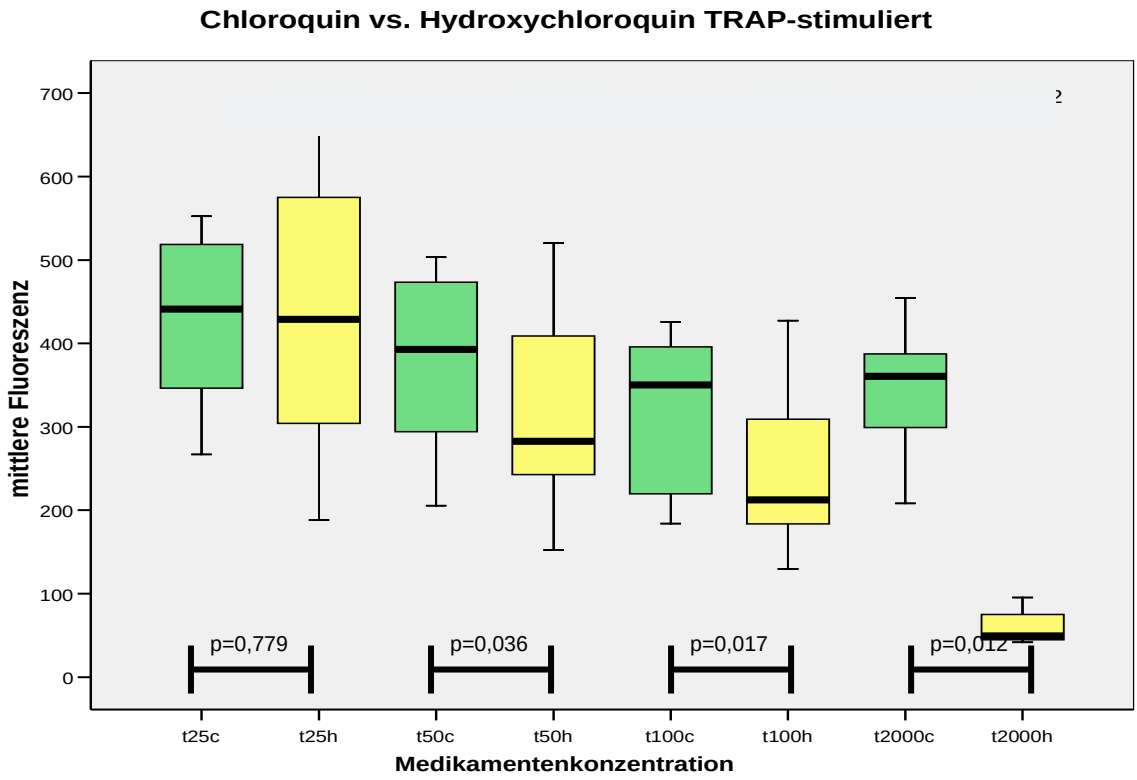
*zwischen den mittleren Fluoreszenzen bei steigender Chloroquin- bzw. Hydroxychloroquinkonzentration (von links nach rechts 25, 50, 100, 2000 in µg/ml). Die jeweils gleichen Konzentrationen von jedem Medikament sind nebeneinander dargestellt. Die Angabe des P-Wertes bezieht sich jeweils auf die Differenz der CD62p-Expression zwischen den korrespondierenden Konzentrationen von Chloroquin (**grün**) und Hydroxychloroquin (**gelb**).*
*Werte, die mehr als den 1,5-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Ausreißer und werden durch ein " o " gekennzeichnet. Werte, die mehr als 3-fache Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Extremwerte und werden mit einem " * " gekennzeichnet.*

Abbildung 4.3.4)

CD62p Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter ADP-Stimulation				
Hydroxy-/Chloroquin-konzentration µg/ml	25	50	100	2000
Mediane Chloroquin	260,71	232,64	217,89	156,26
Mediane Hydroxychloroquin	199,66	173,48	175,97	49,64
Signifikanzniveau (p-Wert)	**0,26**	**0,05**	**0,05**	**0,012**

Darstellung der Mediane, der CD62p Expression auf ADP-stimulierten Thrombozyten, sowie des Signifikanzniveaus, der Differenzen der CD62p-Expression, zwischen den jeweils korrespondierenden Konzentrationen der beiden Antimalariamittel.

Abbildung 4.3.5)



*Graphische Darstellung der Verteilung der mittleren Fluoreszenz und der Mediane in dimensionslosen Einheiten mit Angabe des Signifikanzniveaus zwischen den mittleren Fluoreszenzen bei steigender Chloroquin- bzw. Hydroxychloroquinkonzentration (von links nach rechts 25, 50, 100, 2000 in µg/ml). Die jeweils gleichen Konzentrationen von jedem Medikament sind nebeneinander dargestellt. Die Angabe des P-Wertes bezieht sich jeweils auf die Differenz der CD62p-Expression zwischen den korrespondierenden Konzentrationen von Chloroquin (**grün**) und Hydroxychloroquin (**gelb**).*

*Werte, die mehr als den 1,5-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Ausreißer und werden durch ein " o " gekennzeichnet. Werte, die mehr als den 3-fachne Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Extremwerte und werden mit einem " * " gekennzeichnet.*

Abbildung 4.3.6)

CD62p Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter TRAP-Stimulation				
Hydroxy-/Chloroquin-konzentration µg/ml	25	50	100	2000
Mediane Chloroquin	441,21	392,88	350,11	360,69
Mediane Hydroxychloroquin	428,84	282,74	212,35	49,42
Signifikanzniveau (p-Wert)	**0,78**	**0,036**	**0,017**	**0,012**

Darstellung der Mediane, der CD62p Expression auf TRAP-stimulierten Thrombozyten, sowie des Signifikanzniveaus, der Differenzen der CD62p-Expression zwischen den jeweils korrespondierenden Konzentrationen der beiden Antimalariamittel.

Abbildung 4.3.7)

Unstimuliert

Konz. µg/ml	25	50	100	2000
Chloroquin	6,0	**5,5 S**	8,9 **S**	19,1 **S**
Hydroxychloroquin	17,8 **S**	20,5 **S**	22,3 **S**	39,4 **S**

ADP-stimuliert

Konz. µg/ml	25	50	100	2000
Chloroquin	21,9 **S**	30,3 **S**	34,7 **S**	53,2 **S**
Hydroxychloroquin	40,2 **S**	48,0 **S**	47,3 **S**	85,1 **S**

TRAP-stimuliert

Konz. µg/ml	25	50	100	2000
Chloroquin	23,0 **S**	31,5 **S**	38,9 **S**	37,1 **S**
Hydroxychloroquin	25,2 **S**	50,7 **S**	63 **S**	91,4 **S**

Darstellung der Reduktion/Steigerung (in rot dargestellt) des CD40L-Epitopes auf der Thrombozytenoberfläche, bei steigenden Hydroxy-/Chloroquin-konzentrationen in %, ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und TRAP-

Stimulation, im Verhältnis zu den Ausgangswerten bei 0µg/ml Wirkstoffzusatz. Signifikante Änderungen der CD40L-Expression, bezüglich der Ausgangs-expression ohne Medikamentenzusatz sind mit ***S*** *gekennzeichnet.*

Wie den Tabellen zu entnehmen ist, fällt der Median der CD62p-Expression in jeder Testreihe bei jeder Medikamentenkonzentration unter Zusatz von Hydroxychloroquin durchweg niedriger aus als beim Chloroquin. (Abbildung 4.3.2; 4.3.4; 4.3.6)

Trotz der teils großen Differenzen der Mediane ist nicht überall eine Signifikanz zu verzeichnen. Hier ist auch anzumerken, dass die Streuung der Werte unter Hydroxychloroquin größer ist, welches man auch den graphischen Darstellungen entnehmen kann. Einzig die hohen Konzentrationen von 2000µg/ml stellen hier eine Ausnahme dar.

In der unstimulierten Testreihe besteht bei allen Konzentrationen ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Antimalariamitteln (P-Werte: 0,025; 0,012; 0,012; 0,025). Unter ADP-Stimulation findet sich bei den Medikamentenkonzentrationen von 50, 100 und 2000µg/ml ein signifikanter Unterschied zwischen Chloroquin und Hydroxychloroquin (P-Werte = 0,05; 0,05; 0,012). Schließlich ist unter TRAP-Stimulation ebenfalls bei den Konzentrationen 50, 100 und 2000µg/ml eine statistische Signifikanz zu verzeichnen (P-Werte: 0,028 und 0,018).

Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich in allen Fällen auf die verminderte CD62p-Expression unter dem Hydroxychloroquin gegenüber der CD62p-Expression beim Chloroquin.

4.4) Messung der CD62P Expression bei verschiedenen Simvastatinkonzentrationen ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und unter TRAP-Stimulation

Analog zu der oben genannten Messung der CD62p-Expression bei verschiedenen Stimulationen und unter verschiedener Konzentration der beiden Antimalariamittel ist eine ähnliche Testreihe mit dem CSE-Hemmer Simvastatin durchgeführt worden. Hier sind jedoch aufgrund der abweichenden pharmakokinetischen Eigenschaften andere Konzentrationen verwendet worden. Das Prinzip bleibt jedoch dasselbe wie in den obigen Testreihen.
Statine haben bereits unter in vivo Bedingungen einen hemmenden Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung gezeigt. [16] In dieser Testreihe ist der Einfluss von Simvastatin unter in vitro Bedingungen auf die Thrombozytenaktivierung untersucht worden.
Es folgen tabellarische Darstellungen, um diesen Einfluss unter den verschiedenen Stimulationen zu verdeutlichen.

Abbildung 4.4.1)

CD62p Expression auf der Thrombozytenoberfläche ohne Stimulation				
Simvastatinkonzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	83,92	87,59	24,62	74,10
0,1	94,50	91,71	27,04	97,20
1	91,17	91,20	25,69	95,33
10	87,05	88,62	28,52	106,85
1000	83,73	88,10	23,32	93,55

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Simvastatin µg/ml)	0-0,1	0,1-1	1-10	10-1000
Signifikanzniveau (p-Wert)	**0,69**	**0,5**	**0,35**	**0,89**

Abbildung 4.4.2)

CD62p Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter ADP-Stimulation				
Simvastatinkonzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	370,36	358,54	64,42	233,65
0,1	387,39	356,25	68,48	218,05
1	382,87	352,41	58,16	222,77
10	401,52	366,30	61,43	235,29
1000	378,63	365,15	55,13	228,38

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Simvastatin µg/ml)	0-0,1	0,1-1	1-10	10-1000
Signifikanzniveau (p-Wert)	**0,5**	**0,69**	**0,043**	**0,5**

Abbildung 4.4.3)

CD62p Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter TRAP-Stimulation				
Simvastatinkonzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	598,91	580,42	30,03	120,26
0,1	608,3	606,50	58,24	250,06
1	601,81	637,34	63,11	247,75
10	624,62	649,29	54,89	219,36
1000	623,58	645,67	65,29	285,31

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Simvastatin µg/ml)	0-0,1	0,1-1	1-10	10-1000
Signifikanzniveau (p-Wert)	**0,5**	**0,08**	**0,5**	**0,893**

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichung und der Spannweite der CD62p Expression auf unstimulierten Thrombozyten sowie des

Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Simvastatins.

Wie den Tabellen zu entnehmen ist, kann nur unter ADP-Stimulation zwischen den Konzentrationen 1 und 10 µg/ml ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (p=0,043), wobei hier ein Anstieg des Medianes zu beobachten ist.
Die restlichen Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied auf. Es sind Anstiege sowie Abfälle des Medianes zu verzeichnen, wobei hier kein System zu erkennen ist.

4.5) Messung der CD40L- Expression

4.5.1) Messung der CD40L-Expression bei verschiedenen Chloroquinkonzentrationen ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und unter TRAP-Stimulation

Mittels des CD40L-Antikörpers lässt sich die CD40L-Epitopendichte auf der Thrombozytenoberfläche in analoger Weise zu der CD62p-Epitopendichte quantitativ erfassen.
Das Prinzip ist dasselbe wie das oben genannte bei der Messung der CD62p-Epitopendichte.
In den folgenden Tabellen und graphischen Darstellungen werden die Zusammenhänge zwischen Chloroquin bzw. Hydroxychloroquinkonzentration und CD40L-Expression unter verschiedenen stimulatorischen Bedingungen verdeutlicht.

Abbildung 4.5.1)

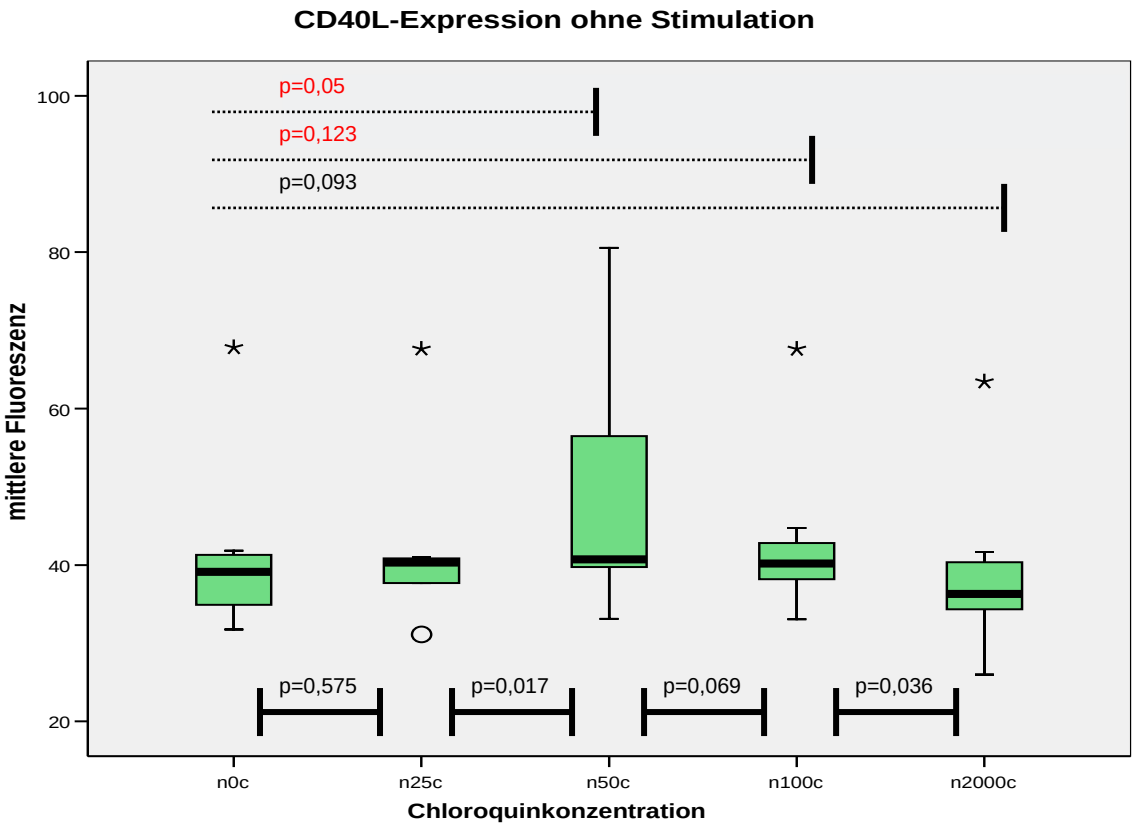


Abbildung 4.5.2)

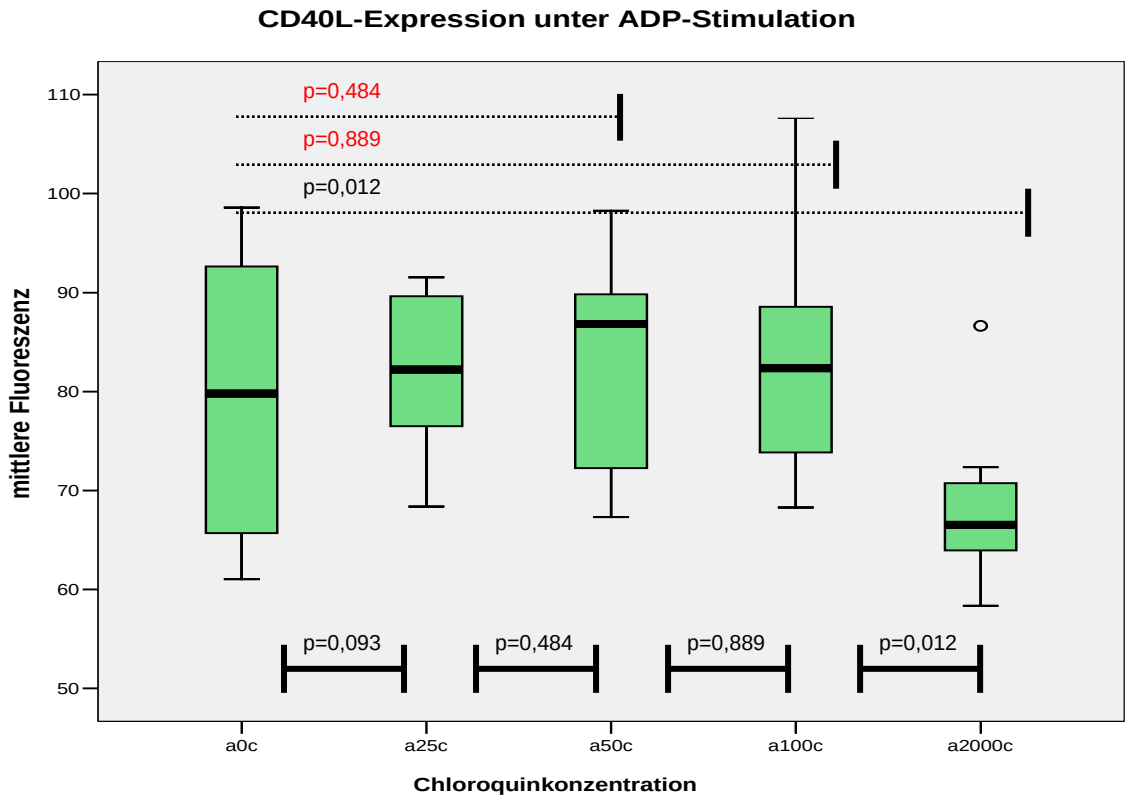
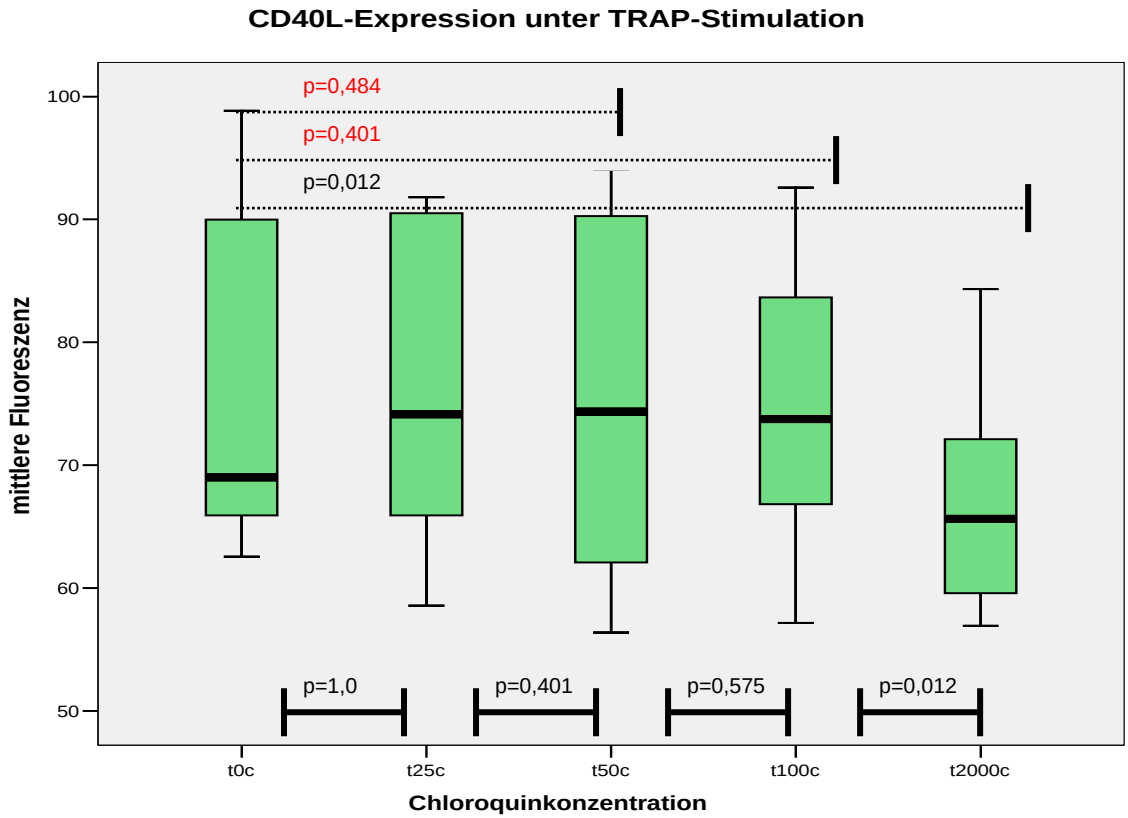


Abbildung 4.5.3)



Graphische Darstellung der Verteilung der mittleren Fluoreszenz und der Mediane in dimensionslosen Einheiten mit Angabe des Signifikanzniveaus zwischen den mittleren Fluoreszenzen bei steigender Chloroquinkonzentration (von links nach rechts 0, 25, 50, 100, 2000 in µg/ml). Die gestrichelten Linien kennzeichnen das Signifikanzniveau, der jeweiligen Konzentration, im Bezug auf den Nullwert, ohne Medikamentenzusatz, die durchgehenden schwarzen Linien kennzeichnen das Signifikanzniveau zwischen den einzelnen, benachbarten Konzentrationsschritten.

*Werte, die mehr als den 1,5-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Ausreißer und sind durch ein " o " gekennzeichnet .Werte, die mehr als den 3-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen gelten als Extremwerte und werden mit einem " * " gekennzeichnet.*

In der unstimulierten Testreihe zeigt sich kein signifikanter Unterschied der CD40L-Expression zwischen den Konzentrationen 0 und 25µg/ml. Hingegen ist im folgenden Konzentrationsschritt von 25 auf 50µg/ml ein signifikanter Unterschied vorhanden (p=0,017), hierbei handelt es sich um eine Zunahme der CD40L-Expression auf der Thrombozytenoberfläche. Beim nächsten Schritt von 50 auf 100µg/ml Chloroquin wird die Signifikanz mit einem P-Wert von 0,069 knapp verfehlt, hier ist jedoch ein Abfall der CD40L-Konzentration zu verzeichnen. Im Vergleich der Konzentrationen 0 und 100µg/ml ist eine leichte Erhöhung der CD40L-Expression zu sehen, welche mit einem P-Wert von 0,123 jedoch nicht signifikant ist. Beim letzten Konzentrationssprung zwischen 100 und 2000µg/ml ist ein signifikanter Abfall der CD40L-Expression nachweisbar (p=0,036). Hier ist der Median der CD40L-Expression von allen Konzentrationen am geringsten. Signifikanz ist zu den Konzentrationen 50 und 100µg/ml zu verzeichnen (p=0,025 bzw. p=0,036). Innerhalb der ADP-stimulierten Testreihe verhält es sich wie folgt: Innerhalb der ersten drei Konzentrationsänderungen ist kein signifikanter P-Wert vorhanden (p=0,093; p=0,484; p=0,889).

Der Median steigt bis zur Chloroquinkonzentration von 50µg/ml leicht an und fällt bei der Konzentration 100µg/ml wieder etwas ab. Auch bezüglich des Ausgangswertes (Konzentration=0µg/ml) ist innerhalb der ersten drei Konzentrationen zu keinem Zeitpunkt eine Signifikanz zu verzeichnen. Die letzte Erhöhung der Chloroquinkonzentration auf 2000µg/ml hingegen führt jedoch zu einer signifikanten Verminderung der CD40L-Expression (p =0,012 im Vergleich zur Konzentration von 100µg/ml). Auch im Vergleich zu den anderen Konzentrationen (0; 25; 50µg/ml) zeigt sich ein signifikanter Rückgang der CD40L-Expression.

Schließlich zeigt die mit TRAP stimulierte Testreihe innerhalb der ersten drei Konzentrationsstufen ebenfalls keine Signifikanz (p=1,0; p=0,401; p=0,575), auch hier steigt der Median der CD40L-Expression bis zu der Chloroquinkonzentration von 50µg/ml etwas an und beginnt dann wieder abzufallen.

Eine Signifikanz ist auch hier erst innerhalb des letzten Chloroquin-

konzentrationserhöhung von 100 auf 2000µg/ml mit einem P-Wert von 0,012 zu vermerken. Auch gegenüber den vorherigen Konzentrationen (0; 25; 50µg/ml) ist jeweils eine deutliche Signifikanz vorhanden (p=0,012; p=0,012; p=0,025).

Abbildung 4.5.4)

CD40L-Expression auf der Thrombozytenoberfläche ohne Stimulation				
Chloroquinkonzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	39,14	41,29	6,36	36,08
25	40,31	42,06	5,42	36,52
50	40,72	48,45	5,15	47,42
100	40,21	42,89	4,73	34,53
2000	36,33	38,93	9,70	37,44

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	25-50	50-100	100-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,575	0,017	0,069	0,036

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichung und der Spannweite, der CD40L- Expression auf ADP-stimulierten Thrombozyten, sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Chloroquins.

Darstellung des Signifikanzniveaus zum Ausgangswert ohne Chloroquinzusatz				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	0-50	0-100	0-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,575	0,05	0,123	0,093

Darstellung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen

zum jeweiligen Ausgangswert von 0µg/ml Medikamentenzusatz.

Wenn es sich um Anstiege der Epitopendichte handelt ist dies rot gekennzeichnet.

Abbildung 4.5.5)

CD40L-Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter ADP-Stimulation				
Chloroquinkonzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	79,80	79,49	12,1	37,56
25	82,22	84,33	8,74	41,20
50	86,84	82,93	8,66	30,95
100	82,35	83,20	8,78	39,38
2000	66,52	68,43	5,36	28,29

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	25-50	50-100	100-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,093	0,484	0,889	0,012

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichung und der Spannweite, der CD40L-Expression auf ADP-stimulierten Thrombozyten, sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Chloroquins.

Darstellung des Signifikanzniveaus zum Ausgangswert ohne Chloroquinzusatz				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	0-50	0-100	0-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,93	0,028	0,012	0,012

Darstellung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zum jeweiligen Ausgangswert von 0µg/ml Medikamentenzusatz.

Wenn es sich um Anstiege der Epitopendichte handelt ist dies rot gekennzeichnet.

Abbildung 4.5.6)

CD40L-Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter TRAP-Stimulation				
Chloroquinkonzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	69,03	76,41	10,82	36,29
25	74,14	75,44	11,11	33,23
50	74,35	75,48	12,95	37,65
100	73,75	74,78	9,66	35,42
2000	65,63	66,99	6,96	27,41

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	25-50	50-100	100-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	1,00	0,401	0,575	0,012

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichung und der Spannweite, der CD40L-Expression auf ADP-stimulierten Thrombozyten, sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Chloroquins.

Darstellung des Signifikanzniveaus zum Ausgangswert ohne Chloroquinzusatz				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	0-50	0-100	0-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	1,0	0,484	0,401	0,012

Darstellung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zum jeweiligen Ausgangswert von 0µg/ml Medikamentenzusatz.

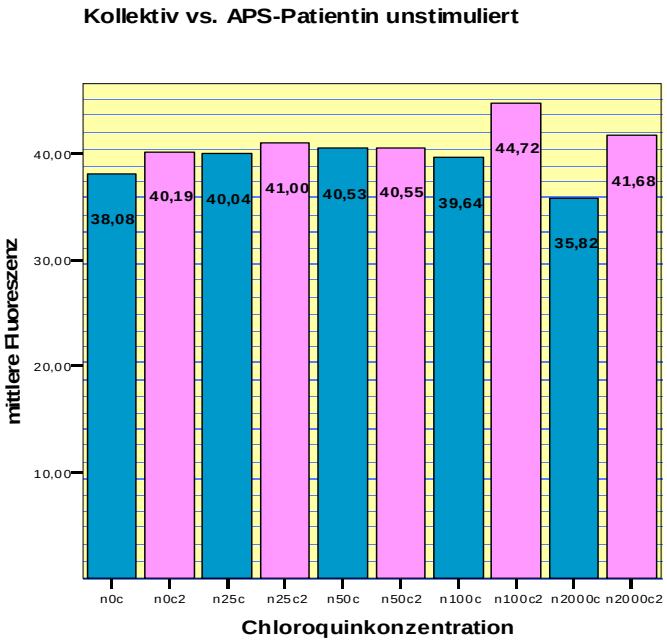
Wenn es sich um Anstiege der Epitopendichte handelt ist dies rot gekennzeichnet.

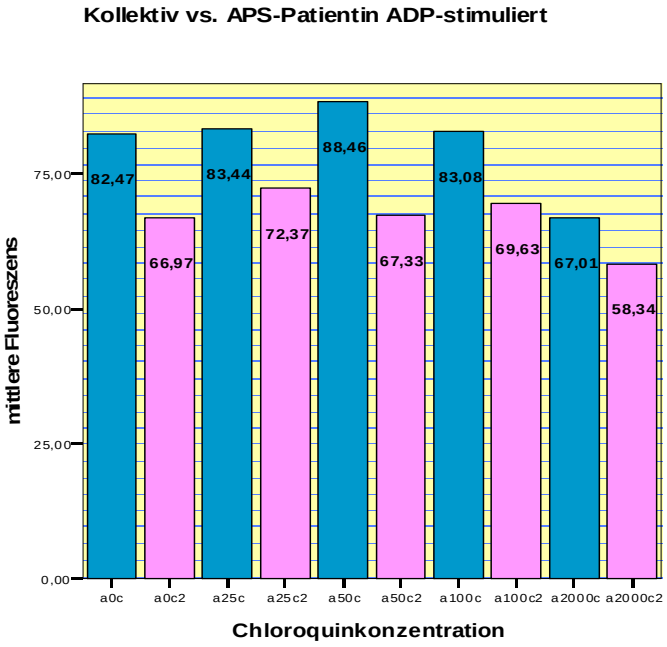
Zusammenfassend lässt sich unter Verwendung des Chloroquins als Medikament in der unstimulierten Testreihe sowie in der ADP-stimulierten als auch in der TRAP-stimulierten Testreihe folgendes sagen: In allen drei Reihen steigt der Median bis zu der Chloroquinkonzentration von 50µg/ml stetig an und fällt bei 100µg/ml wieder ab.
Erst unter der Chloroquinkonzentration von 2000µg/ml zeigt sich wiederum in allen drei Testreihen ein deutlicher Abfall des Medians der CD40L-Expression. Dieser Abfall ist auch der einzige Wert, welcher den Ausgangswert (Konzentration=0µg/ml) und alle anderen Werte der Testreihe unterschreitet und hierbei auch eine Signifikanz erreicht.
Im Vergleich mit der CD40L-Expression ohne Medikamentenzusatz ergibt sich folgendes Bild: In der unstimulierten Reihe ist bei 50µg/ml ein Anstieg der CD40L-Epitopendichte zu beobachten, welcher sogar Signifikanz erreicht.
2000µg/ml führen schließlich zu einer Reduktion der Epitopendichte, welche jedoch die Signifikanz verfehlt.
Die Stimulation mittels ADP oder TRAP weist keine Anstiege mehr auf, welche Signifikanz erreichen, dafür ist in beiden Fällen unter 2000µg/ml eine signifikante Minderung der CD40L-Epitopendichte festzustellen.

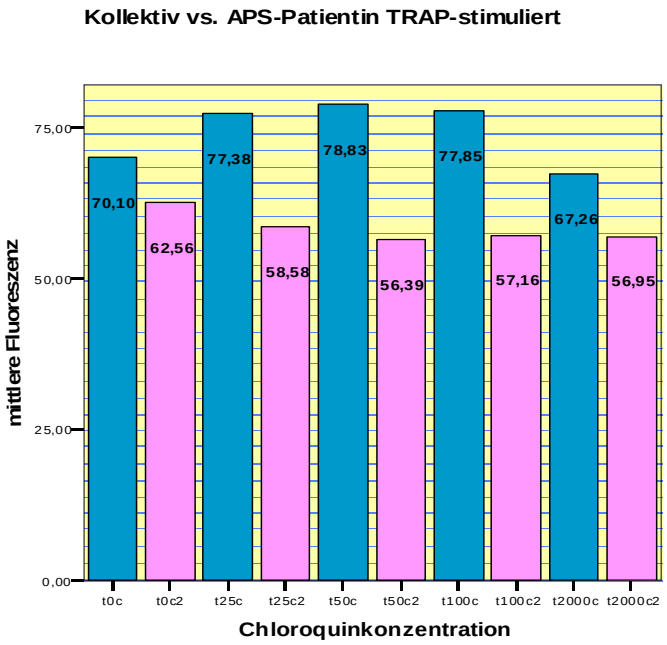
4.5.2) Vergleich der Daten der APS-Patientin mit den Mittelwerten der übrigen gesunden Probanden

Da eine Patientin des Kollektives unter dem APS-Syndrom leidet, wurden die mittleren Fluoreszenzen dieser Patientin mit denen der gesunden Probanden verglichen.

Abbildung 4.5.7)







*Graphische Darstellung der Mediane der mittleren Fluoreszenzen des gesunden Patientenkollektives (**blau**) mit den Messwerten einer APS-Patientin (**lila**) ohne Stimulation, unter ADP- und unter TRAP-Stimulation im Vergleich.*

Wie man in den obigen Diagrammen sieht (Abbildung 4.6.7), reagieren die Thrombozyten der APS-Patientin auf Stimulation und steigende Chloroquinkonzentrationen analog zu denen der gesunden Probanden, wobei lediglich das Grundaktivitätsniveau der von der APS-Patientin stammenden Thrombozyten niedriger ist. Folglich ist die CD40L- Expression hier in der gesamten Messreihe geringer als die Mediane der Messungen des gesunden Kollektives. Hier ist wieder anzumerken, dass die APS-Patientin unter Antikoagulation in Form von ASS stand.

Ohne Stimulation sind die Ergebnisse für das Kollektiv bzw. für die APS-Patientin, wie dem Diagram zu entnehmen ist, recht ähnlich. Einzig unter den Konzentrationen 100 und 2000µg/ml zeigt sich eine erhöhte CD40L-Expression bei der APS-Patientin.

Unter Stimulation ist die CD40L-Expression bei der APS-Patientin gegenüber dem Kollektiv durchgehend niedriger.

4.6) Messung der CD40L-Expression bei verschiedenen Hydroxychloroquinkonzentrationen ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und unter TRAP-Stimulation

Analog zu der Messung der CD62p-Expression unter dem Einfluss von Chloroquin und Hydroxychloroquin ist die Messung der CD40L-Expression natürlich auch nochmal unter der Verwendung von Hydroxychloroquin durchgeführt worden.
Die Auswertungen, Tabellen und graphischen Darstellungen sind an denen der vorherigen Testreihen angelehnt.

Abbildung 4.6.1)

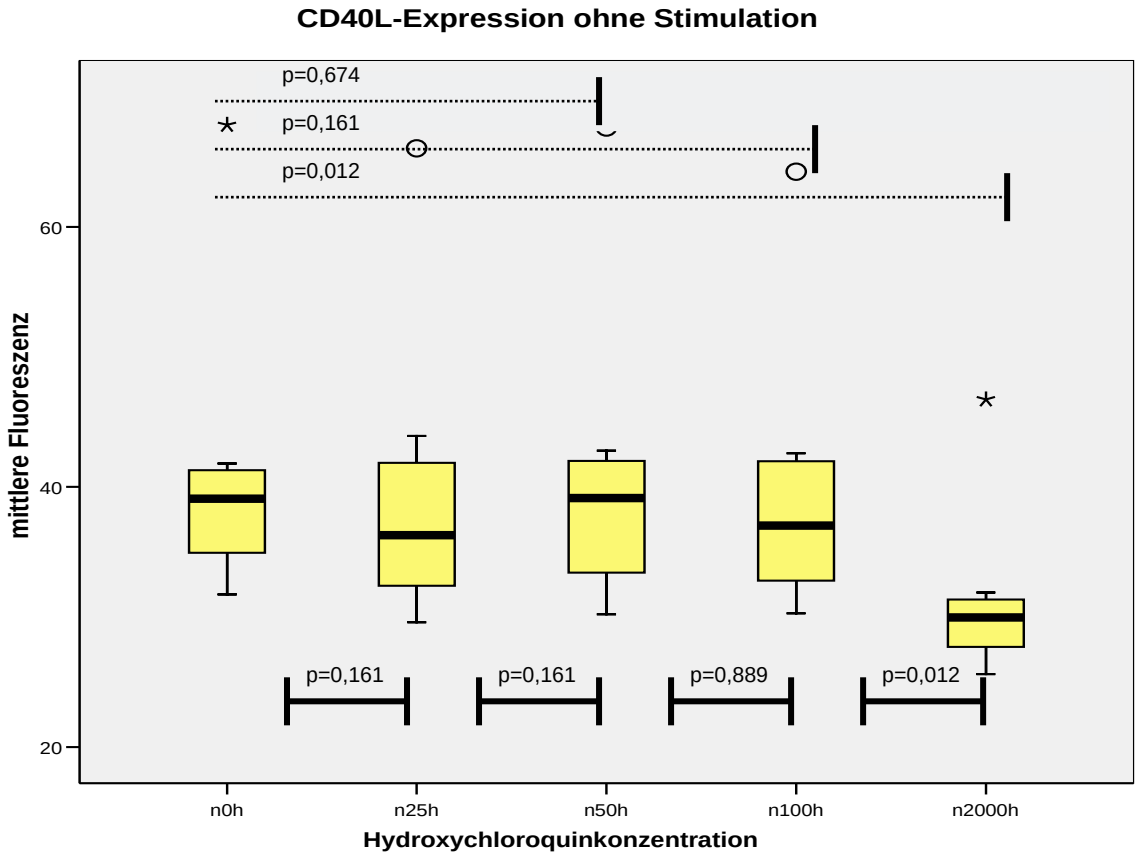


Abbildung 4.6.2)

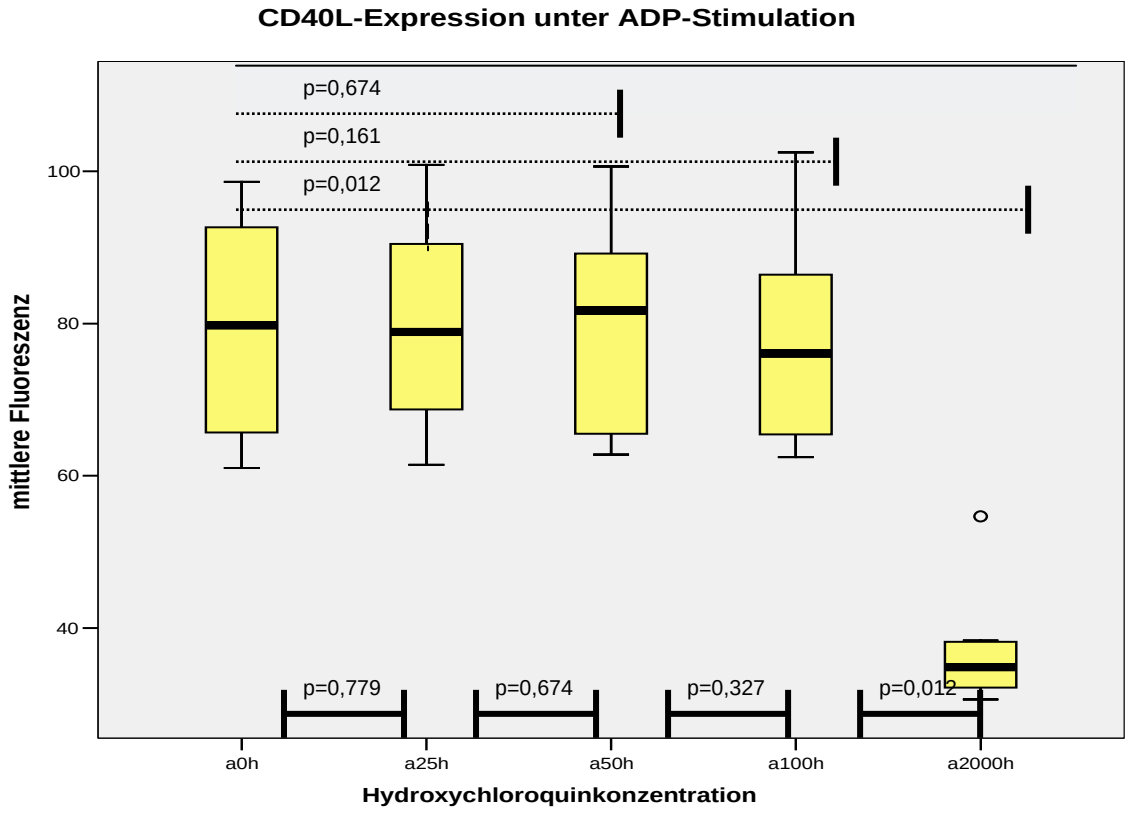
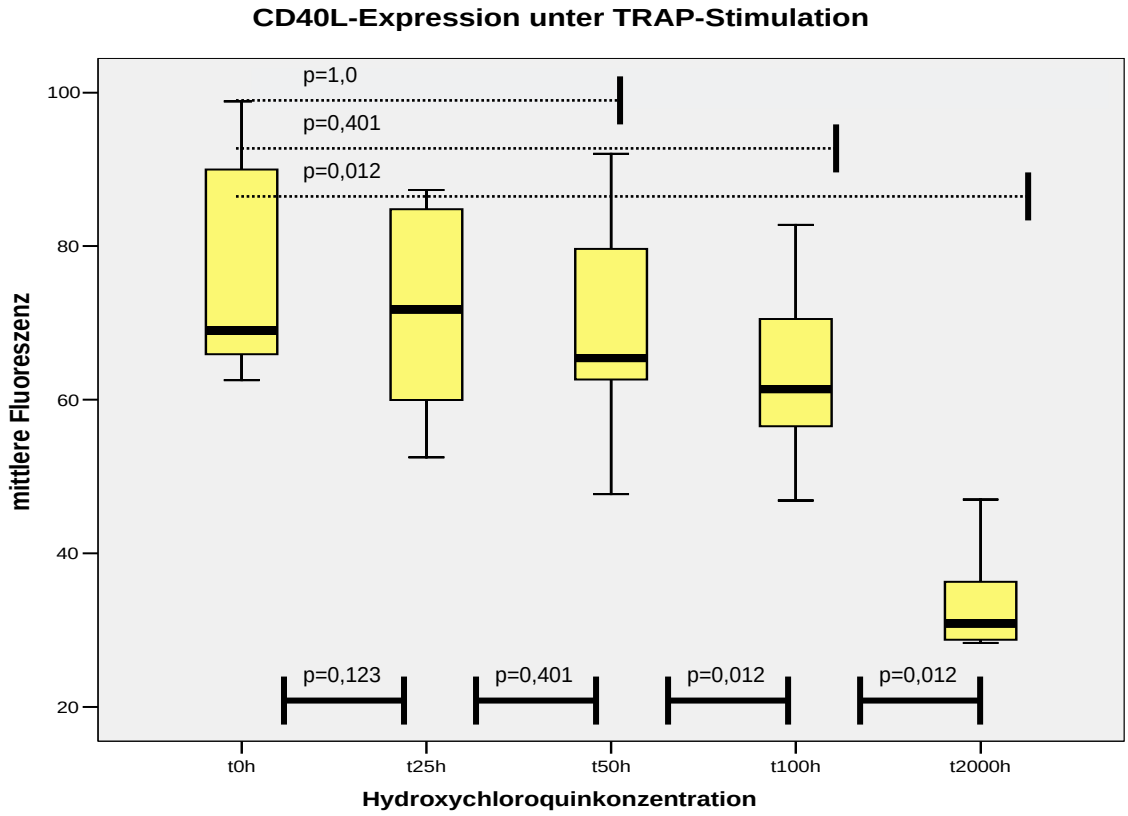


Abbildung 4.6.3)



Graphische Darstellung der Verteilung der mittleren Fluoreszenz und der Mediane in dimensionslosen Einheiten mit Angabe des Signifikanzniveaus zwischen den mittleren Fluoreszenzen bei steigender Chloroquinkonzentration (von links nach rechts 0, 25, 50, 100, 2000 in µg/ml). Die gestrichelten Linien kennzeichnen das Signifikanzniveau, der jeweiligen Konzentration, im Bezug auf den Nullwert, ohne Medikamentenzusatz, die durchgehenden schwarzen Linien kennzeichnen das Signifikanzniveau zwischen den einzelnen, benachbarten Konzentrationsschritten.

*Werte, die mehr als den 1,5-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Ausreißer und sind durch ein " o " gekennzeichnet .Werte, die mehr als den 3-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen gelten als Extremwerte und werden mit einem " * " gekennzeichnet.*

Ohne Stimulation zeigt sich zwischen den Konzentrationen 0 und 25µg/ml ein Abfall des Medians, der jedoch mit einem P-Wert von 0,161 nicht signifikant ist. Unter Erhöhung der Hydroxychloroquinkonzentration auf 50µg/ml zeigt sich wiederum ein Anstieg des Medianes gegenüber dem vorherigen bei 25µg/ml, der mit einem P-Wert von 0,161 ebenfalls keine Signifikanz erreicht. Dieser Wert ist der einzige, der sogar den Ausgangsmedian geringfügig übersteigt. Als nächstes folgt mit der Steigerung der Hydroxychloroquinkonzentration auf 100µg/ml ein erneuter Abfall der CD40L-Expression, welcher nicht signifikant ist (p=0,889).

Die CD40L-Expression ist jedoch noch etwas höher als der 25er Hydroxychloroquinkonzentration. Es besteht aber kein signifikanter Unterschied (p=0,779). Die letzte Konzentrationserhöhung auf 2000µg/ml zeigt nun einen signifikanten Abfall der CD40L-Expression (p=0,012). Gegenüber den anderen Konzentrationen (0; 25 und 50µg/ml) zeigt sich ein signifikanter Abfall (p=0,012 in allen drei Fällen).

Unter ADP-Stimulation zeigt sich während der ersten drei Konzentrationsschritte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der CD40L-Expression (p=0,779; p=0,674; p=0,327). Der Median fällt zuerst unter der Hydroxychloroquinkonzentration von 25µg/ml leicht ab, um danach im nächsten Konzentrationsschritt wieder anzusteigen, wobei auch der Ausgangswert leicht überschritten wird.

Der Zusatz von 100µg/ml Hydroxychloroquin führt zu einem erneuten Abfall der CD40L-Expression, welche nun den Ausgangswert unterschreitet.

Der letzte Schritt auf die Maximalkonzentration von Hydroxychloroquin (2000µg/ml) führt zu einer signifikanten Senkung der CD40L-Expression (p=0,012) gegenüber den vorherigen Werten für die CD40L-Expression. Unter den Hydroxychloroquinkonzentrationen 0 bzw. 25 und 50µg/ml besteht ebenfalls ein signifikanter Abfall (p=0,012; p=0,012; p=0,012).

Die Stimulation mit TRAP führt während der ersten beiden Konzentrationsschritte nicht zu einer signifikanten Änderung der CD40L-Expression.

Zwischen den Hydroxychloroquinkonzentrationen 0 und 25µg/ml zeigt sich ein leichter Anstieg des Medianes. Bei Steigerung der Konzentration auf 50µg/ml

fällt er jedoch wieder ab und unterschreitet deutlich das Ausgangsniveau. Signifikanz wird unter den letzten beiden Konzentrationen (100 und 2000µg/ml) mit einem P-Wert von jeweils 0,012 erreicht. Hier handelt es sich ebenfalls um einen Abfall der CD40L-Expression.

Abbildung 4.6.4)

CD40L-Expression auf der Thrombozytenoberfläche ohne Stimulation				
Hydroxychloroquin-konzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	39,10	41,218	6,37	36,08
25	36,30	39,60	6,93	36,45
50	39,14	40,87	7,328	37,42
100	37,03	39,77	6,617	33,94
2000	29,98	31,30	3,59	21,11

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Hydroxychloroquin µg/ml)	0-25	25-50	50-100	100-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,161	0,161	0,889	0,012

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichung und des Quartils-abstandes, der CD40L-Expression auf unstimulierten Thrombozyten sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Hydroxychloroquins.

Darstellung des Signifikanzniveaus zum Ausgangswert ohne Hydroxychloroquinzusatz				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	0-50	0-100	0-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,161	0,674	0,161	0,012

Darstellung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zum jeweiligen Ausgangswert von 0µg/ml Medikamentenzusatz.

Abbildung 4.6.5)

CD40L-Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter ADP-Stimulation				
Hydroxychloroquin-konzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	79,80	79,49	19,36	37,56
25	78,88	79,80	10,40	39,39
50	81,70	79,53	11,49	37,84
100	76,08	77,61	10,48	40,04
2000	34,89	36,98	4,12	24,05

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Hydroxychloroquin µg/ml)	0-25	25-50	50-100	100-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,779	0,674	0,327	0,012

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichung und des Quartils-abstandes, der CD40L-Expression auf unstimulierten Thrombozyten sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Hydroxychloroquins.

Darstellung des Signifikanzniveaus zum Ausgangswert ohne Hydroxychloroquinzusatz				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	0-50	0-100	0-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,779	1,0	0,401	0,012

Darstellung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zum jeweiligen Ausgangswert von 0µg/ml Medikamentenzusatz.

Abbildung 4.6.6)

CD40L-Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter TRAP-Stimulation				
Hydroxychloroquin-konzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	69,03	76,61	10,82	36,29
25	71,77	71,61	12,26	34,80
50	65,44	69,39	9,84	44,28
100	61,38	63,32	8,57	35,90
2000	30,89	33,40	4,38	18,69

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Hydroxychloroquin µg/ml)	0-25	25-50	50-100	100-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,123	0,401	0,012	0,012

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichung und des Quartilsabstandes, der CD40L-Expression auf unstimulierten Thrombozyten sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Hydroxychloroquins.

Darstellung des Signifikanzniveaus zum Ausgangswert ohne Hydroxychloroquinzusatz				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	0-50	0-100	0-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,123	0,017	0,012	0,012

Darstellung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zum jeweiligen Ausgangswert von 0µg/ml Medikamentenzusatz.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der unstimulierten sowie in der ADP-stimulierten Testreihe nur unter der in diesem Versuch verwendeten Höchstkonzentration von Hydroxychloroquin eine signifikante Verringerung der CD40L-Expression zu beobachten ist.

In der TRAP-stimulierten Testreihe zeigt sich hingegen unter den letzten beiden Hydroxychloroquinkonzentrationen (100 bzw. 2000µg/ml) ein signifikanter Abfall der CD40L-Expression im Vergleich zur vorangegangenen Konzentration.

Bezüglich der Ergebnisse ohne Hydroxychloroquinzusatz zeigt sich ohne Stimulation unter 50µg/ml ein leichter Anstieg der CD40L-Expression. Für alle anderen Konzentrationen ergeben sich hingegen rückläufige Werte für die Epitopendichte, wobei dieser für 2000µg/ml Hydroxychloroquin signifikant ist.

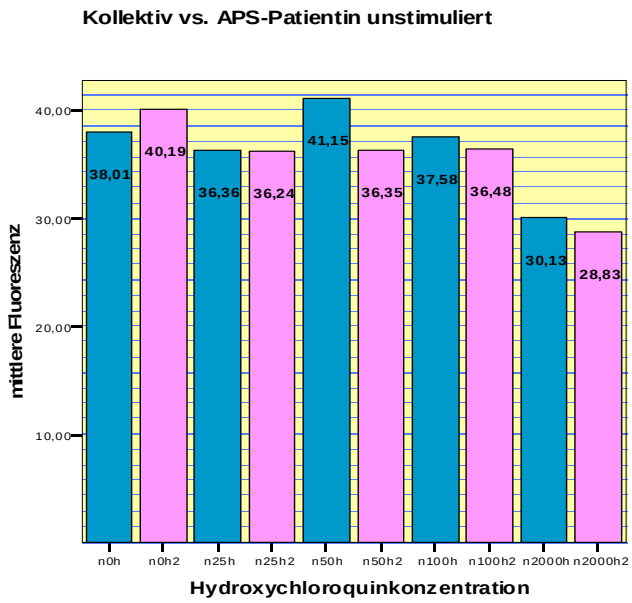
In der ADP-stimulierten Testreihe ist genau dasselbe Muster zu erkennen.

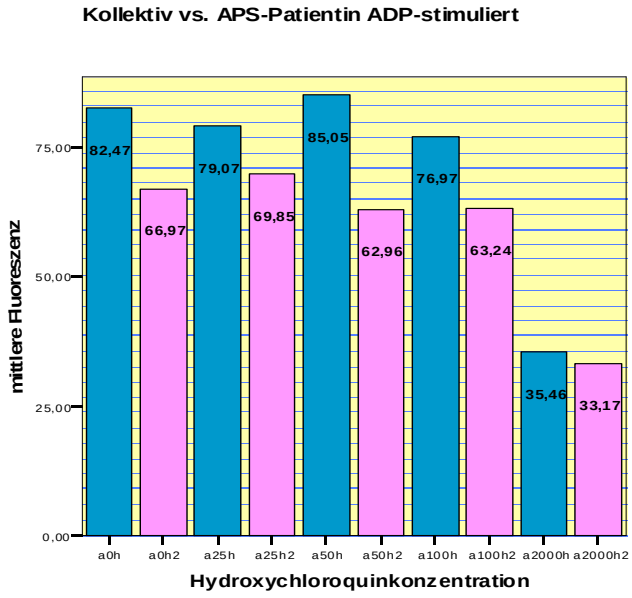
Die Stimulation der Thrombozyten mit TRAP zeigt einzig bei 25µg/ml einen geringen Anstieg der CD40L-Expression. Alle anderen Hydroxychloroquin-konzentrationen führen zu einem signifikanten Rückgang eben dieser.

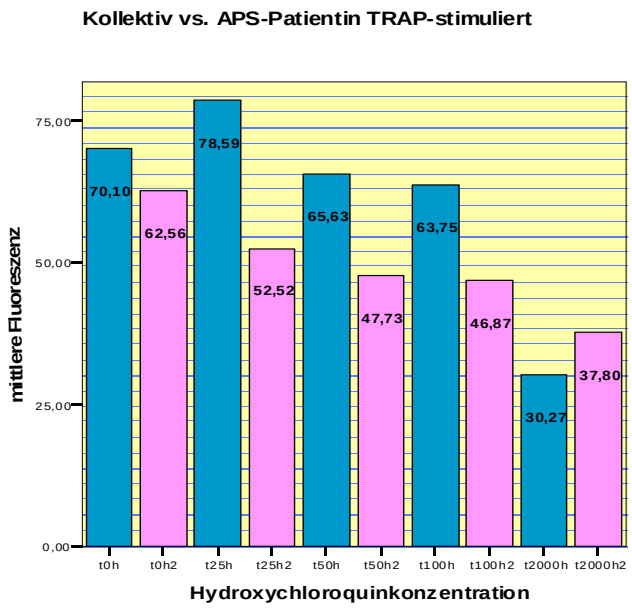
4.6.1) Vergleich der Daten der APS-Patientin mit den Mittelwerten der übrigen, gesunden Probanden

Da eine Patientin des Kollektives unter dem APS-Syndrom leidet, wurden die mittleren Fluoreszenzen dieser Patientin mit denen der gesunden Probanden verglichen.

Abbildung 4.6.7)







*Graphische Darstellung der Mediane der mittleren Fluoreszenzen des gesunden Patientenkollektives (**blau**) mit den Messwerten einer APS-Patientin (**lila**) ohne Stimulation, unter ADP- und unter TRAP-Stimulation im Vergleich.*

Wie den obigen Diagrammen (4.6.7) zu entnehmen ist, zeigt sich ohne Stimulation nur ohne Zusatz von Hydroxychloroquin eine erhöhte CD40L-Expression der APS-Patientin im Vergleich mit dem Kollektiv. In den restlichen Messungen mit den Hydroxychloroquinkonzentrationen 25; 50; 100 und 2000µg/ml zeigt sich bei der APS-Patientin eine verminderte CD40L-Expression gegenüber dem Kollektiv.

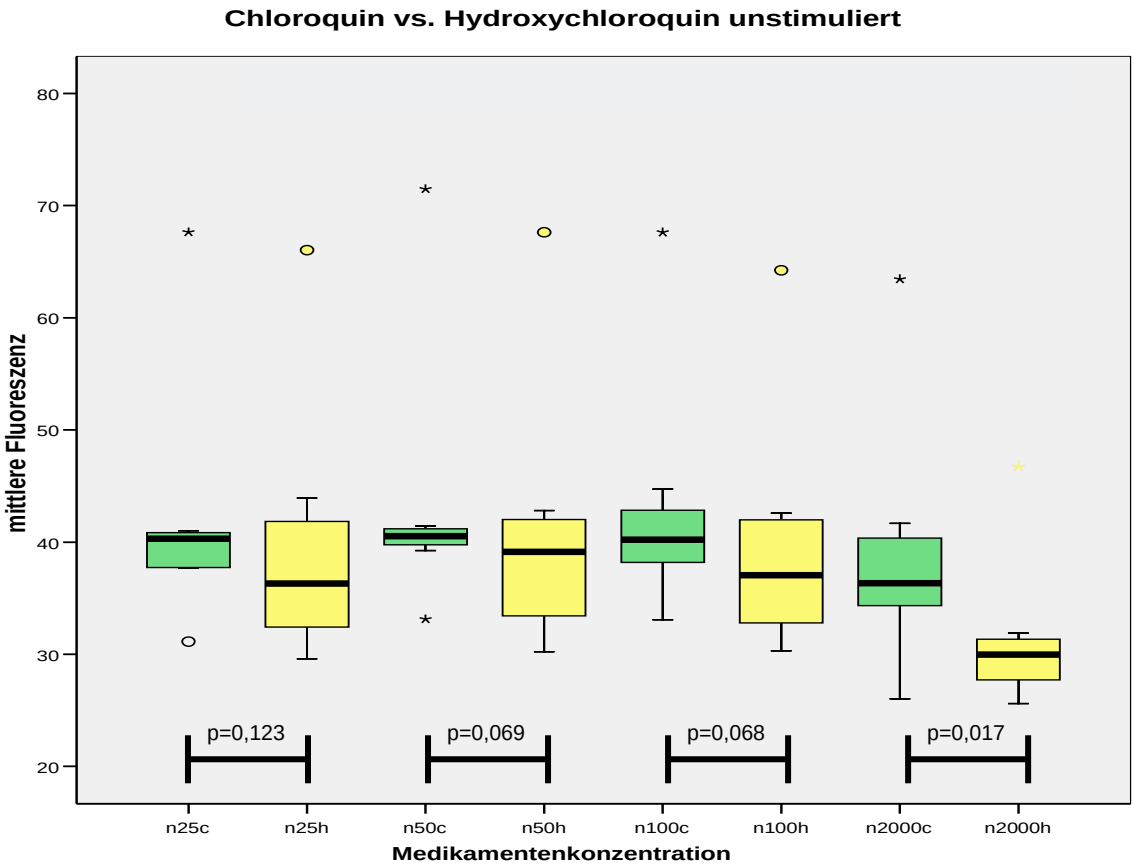
Unter ADP-Stimulation zeigt sich durchweg eine geringere CD40L-Expression bei der APS-Patientin.

In der TRAP-stimulierten Testreihe kann man bis einschließlich der Hydroxy-chloroquinkonzentration von 100µg/ml eine geringere CD40L-Expression der APS-Patientin gegenüber dem gesunden Kollektiv erkennen. Erst unter 2000µg/ml ist eine Erhöhung der CD40L-Expression gegenüber dem Kollektiv zu beobachten.

4.7) Vergleich zwischen Chloroquin und Hydroxychloroquin bezüglich ihres Einflusses auf CD40L-Expression

Da nun jedes Medikament und sein Einfluss auf die CD40L-Expression in verschiedenen Konzentrationen und unter verschiedenen Stimulationen für sich dargestellt wurde, wurden folglich auch beide Medikamente direkt miteinander verglichen. Es sind immer dieselben Konzentrationen bei derselben Stimulation miteinander verglichen worden.

Abbildung 4.7.1)



Graphische Darstellung der Verteilung der mittleren Fluoreszenz und der Mediane in dimensionslosen Einheiten mit Angabe des Signifikanzniveaus zwischen den mittleren Fluoreszenzen bei steigender Chloroquin- bzw.

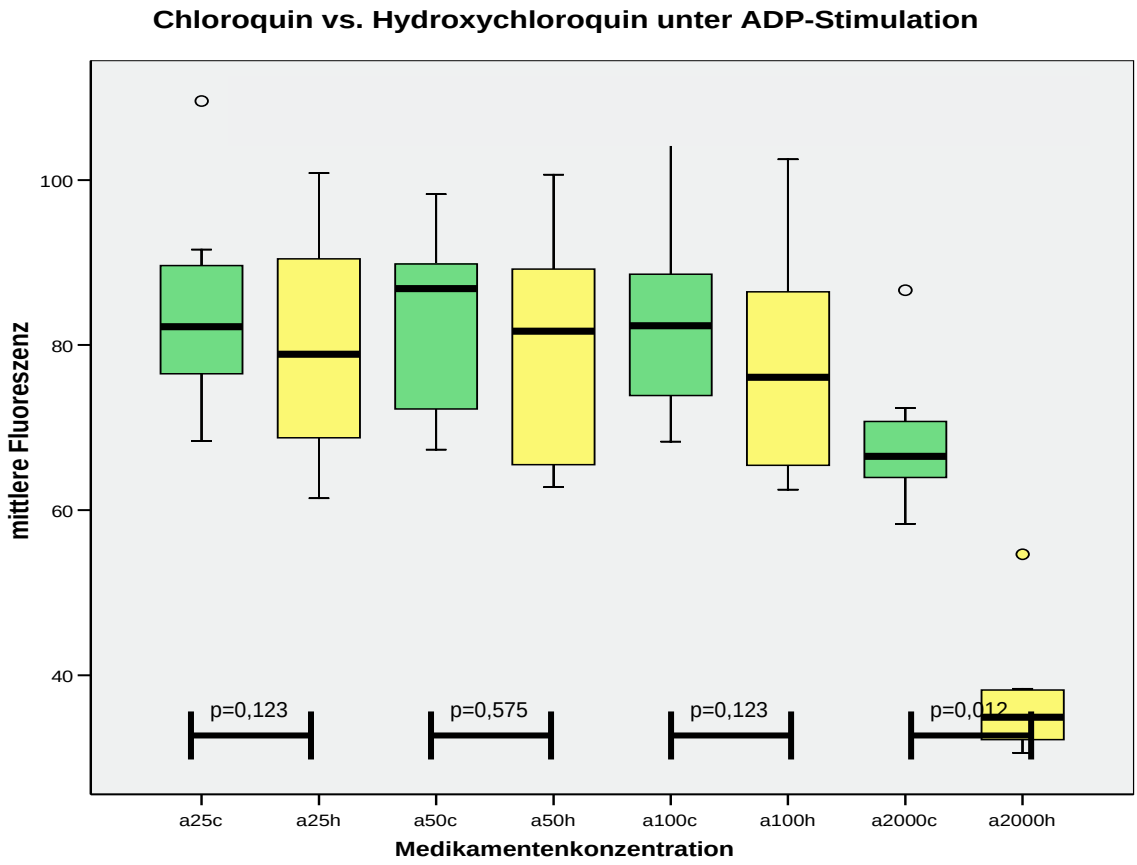
*Hydroxychloroquinkonzentration (von links nach rechts 25, 50, 100, 2000 in µg/ml). Die jeweils gleichen Konzentrationen von jedem Medikament sind nebeneinander dargestellt. Die Angabe des P-Wertes bezieht sich jeweils auf die Differenz der CD62p-Expression zwischen den korrespondierenden Konzentrationen von Chloroquin (**grün**) und Hydroxychloroquin (**gelb**).*
*Werte, die mehr als den 1,5-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Ausreißer und werden durch ein " o " gekennzeichnet. Werte, die mehr als den 3-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Extremwerte und werden mit einem " * " gekennzeichnet.*

Abbildung 4.7.2)

CD40L-Expression auf der Thrombozytenoberfläche ohne Stimulation				
Hydroxy-/Chloroquin-konzentration µg/ml	25	50	100	2000
Mediane Chloroquin	40,31	40,54	40,21	36,33
Mediane Hydroxychloroquin	36,30	39,14	37,03	29,98
Signifikanzniveau (p-Wert)	**0,123**	**0,069**	**0,068**	**0,017**

Darstellung der Mediane, der CD40L-Expression auf unstimulierten Thrombozyten, sowie des Signifikanzniveaus, der Differenzen der CD40L-Expression zwischen den jeweils korrespondierenden Konzentrationen der beiden Antimalariamittel

Abbildung 4.7.3)



*Graphische Darstellung der Verteilung der mittleren Fluoreszenz und der Mediane in dimensionslosen Einheiten mit Angabe des Signifikanzniveaus zwischen den mittleren Fluoreszenzen bei steigender Chloroquin- bzw. Hydroxychloroquinkonzentration (von links nach rechts 25, 50, 100, 2000 in µg/m). Die jeweils gleichen Konzentrationen von jedem Medikament sind nebeneinander dargestellt. Die Angabe des P-Wertes bezieht sich jeweils auf die Differenz der CD62p-Expression zwischen den korrespondierenden Konzentrationen von Chloroquin (**grün**) und Hydroxychloroquin (**gelb**).*

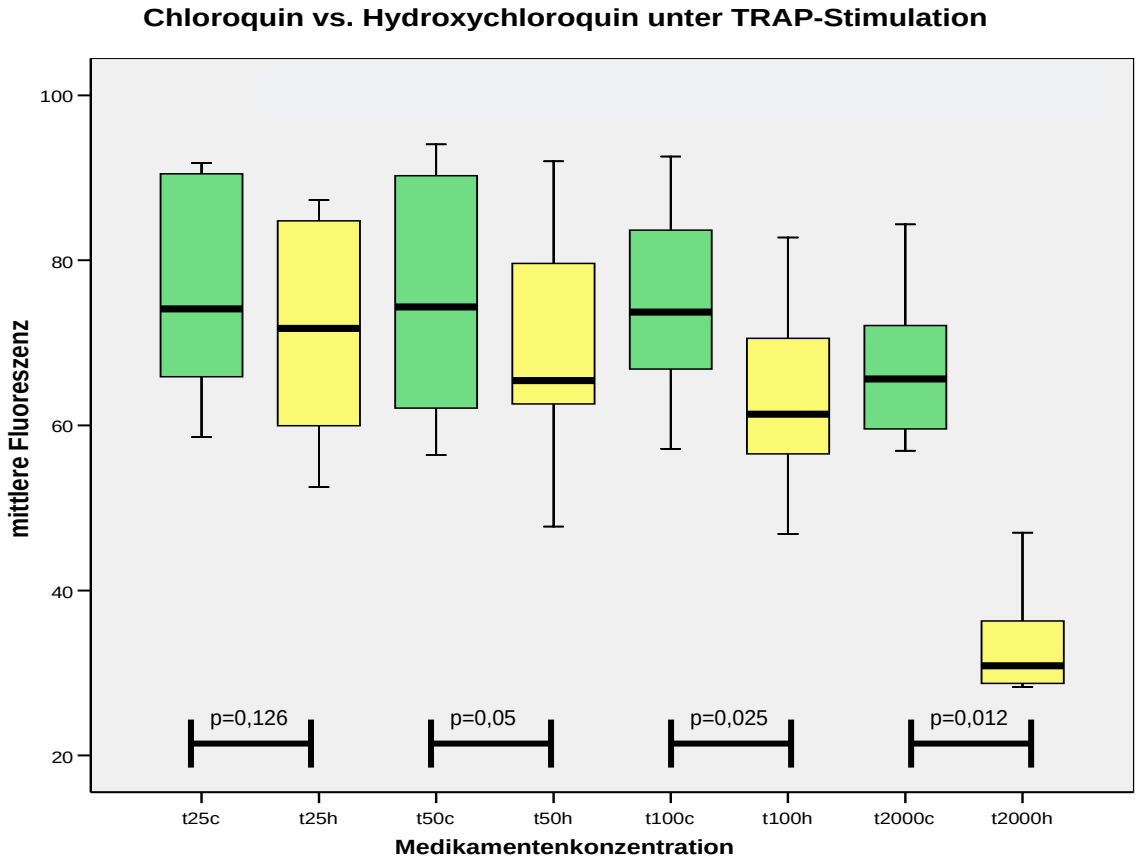
*Werte, die mehr als den 1,5-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Ausreißer und werden durch ein " o " gekennzeichnet. Werte, die mehr als den 3-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Extremwerte und werden mit einem " * " gekennzeichnet.*

Abbildung 4.7.4)

CD40L-Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter ADP-Stimulation				
Hydroxy-/Chloroquin-konzentration µg/ml	25	50	100	2000
Mediane Chloroquin	82,22	86,84	82,35	66,52
Mediane Hydroxychloroquin	78,88	81,70	76,08	34,89
Signifikanzniveau (p-Wert)	**0,123**	**0,575**	**0,123**	**0,012**

Darstellung der Mediane, der CD40LlExpression auf ADP-stimulierten Thrombozyten, sowie des Signifikanzniveaus, der Differenzen der CD40L-Expression zwischen den jeweils korrespondierenden Konzentrationen der beiden Antimalariamittel.

Abbildung 4.7.5)



*Graphische Darstellung der Verteilung der mittleren Fluoreszenz und der Mediane in dimensionslosen Einheiten mit Angabe des Signifikanznivaeus zwischen den mittleren Fluoreszenzen bei steigender Chloroquin- bzw. Hydroxychloroquinkonzentration (von links nach rechts 25, 50, 100, 2000 in µg/ml). Die jeweils gleichen Konzentrationen von jedem Medikament sind nebeneinander dargestellt. Die Angabe des P-Wertes bezieht sich jeweils auf die Differenz der CD62p-Expression zwischen den korrespondierenden Konzentrationen von Chloroquin (**grün**) und Hydroxychloroquin (**gelb**).*
*Werte, die mehr als den 1,5-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Ausreißer und werden durch ein " o " gekennzeichnet. Werte, die mehr als den 3-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Extremwerte und werden mit einem " * " gekennzeichnet.*

Abbildung 4.7.6)

CD40L-Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter TRAP-Stimulation				
Hydroxy-/Chloroquin-konzentration µg/ml	25	50	100	2000
Mediane Chloroquin	74,14	74,35	73,75	65,63
Mediane Hydroxychloroquin	71,77	65,44	61,38	30.89
Signifikanzniveau (p-Wert)	**0,123**	**0,050**	**0,025**	**0,012**

Darstellung der Mediane, der CD40L-Expression auf TRAP-stimulierten Thrombozyten, sowie des Signifikanzniveaus, der Differenzen der CD40L-Expression zwischen den jeweils korrespondierenden Konzentrationen der beiden Antimalariamittel .

Abbildung 4.7.7)

Unstimuliert

Konz. µg/ml	25	50	100	2000
Chloroquin	3,0	3,6 **S**	2,7	7,2
Hydroxychloroquin	7,2	0,1	5,3	23,3 **S**

ADP-stimuliert

Konz. µg/ml	25	50	100	2000
Chloroquin	3,0	8,8	3,2	16,6 **S**
Hydroxychloroquin	1,2	2,3	4,7	56,3 **S**

TRAP-stimuliert

Konz. µg/ml	25	50	100	2000
Chloroquin	7,4	7,7	6,8	4,9 **S**
Hydroxychloroquin	4	5,2 **S**	11,1 **S**	55,3 **S**

Darstellung der Reduktion/Steigerung (in rot dargestellt) des CD40L-Epitopes auf der Thrombozytenoberfläche, bei steigenden Hydroxy/-Chloroquin-konzentrationen in %, ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und TRAP-Stimulation, im Verhältnis zu den Ausgangswerten bei 0µg/ml Wirkstoffzusatz. Signifikante Änderungen der CD40L-Expression, bezüglich der Ausgangs-expression ohne Medikamentenzusatz sind mit **S** *gekennzeichnet.*

Der Vergleich der CD40L-Expression zwischen Chloroquin und Hydroxy-chloroquin bei selbiger Konzentration ergab im Vergleich untereinander ohne Stimulation nur bei der Konzentration 2000µg/ml einen signifikanten Unterschied in Form einer verminderten CD40L-Expression unter dem Hydroxychloroquin (p=0,017).
Eine Tendenz ist auch noch im Vergleich der beiden Medikamente bei 50 und 100µg/ml zu erkennen (p=0,69 bzw. p=0,68).
Mittelwerte und Mediane fallen in allen unstimulierten Messungen unter Hydroxychloroquin niedriger aus als unter Chloroquin.
Im Vergleich der beiden Medikamente in der ADP-stimulierten Reihe zeigt sich nur bei 2000µg/ml ein signifikanter Unterschied.
Mediane und Mittelwerte sind ebenfalls unter Hydroxychloroquin überall niedriger als unter Chloroquin.
Letztlich zeigen in der TRAP-stimulierten Testreihe die Konzentrationen 50, 100 und 2000µg/ml signifikante Unterschiede zwischen beiden Medikamenten auf (p=0,05; p=0,025; p=0,012).

Mittelwerte und Mediane sind auch hier unter Hydroxychloroquin durchgehend niedriger als unter Chloroquin.

4.8) Messung der CD40L-Expression bei verschiedenen Simvastatinkonzentrationen ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und unter TRAP-Stimulation

Analog zu der oben genannten Messung der CD40L-Expression bei verschiedenen Stimulationen und unter verschiedenen Konzentrationen der beiden Antimalariamittel, ist, wie schon beim CD62p zuvor, auch eine ähnliche Testreihe mit dem CSE-Hemmer Simvastatin durchgeführt worden. Hier sind genau wie oben, aufgrund der abweichenden pharmakokinetischen Eigenschaften, andere Konzentrationen verwendet worden als bei den Antimalariamitteln.
Das Prinzip bleibt jedoch auch hier dasselbe, wie in den obigen Testreihen.
Statine haben bereits unter in vivo Bedingungen einen hemmenden Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung gezeigt. [47] In dieser Testreihe ist der Einfluss von Simvastatin unter in vitro Bedingungen auf die Thrombozytenaktivierung untersucht worden.
Es folgen tabellarische Darstellungen, um diesen Einfluss unter den verschiedenen Stimulationen zu verdeutlichen.

Abbildung 4.8.1)

CD40L-Expression auf der Thrombozytenoberfläche ohne Stimulation				
Simvastatinkonzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	34,35	38,77	10,32	35,65
0,1	32,88	40,94	12,96	46,88
1	34,44	41,81	13,57	48,68
10	34,52	41,06	11,94	48,30
1000	35,67	41,54	11,93	49,2

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Simvastatin µg/ml)	0-0,1	0,1-1	1-10	10-1000
Signifikanzniveau (p-Wert)	**0,893**	**0,138**	**0,500**	**0,500**

Abbildung 4.8.2)

CD40L-Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter ADP-Stimulation				
Simvastatinkonzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	76,40	79,76	20,81	69,88
0,1	73,88	80,90	21,31	76,07
1	73,75	78,92	18,35	71,35
10	74,63	80,81	21,92	76,70
1000	73,13	80,02	19,44	69,72

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Simvastatin µg/ml)	0-0,1	0,1-1	1-10	10-1000
Signifikanzniveau (p-Wert)	**0,686**	**0,500**	**0,345**	**0,500**

Abbildung 4.8.3)

CD40L-Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter TRAP-Stimulation				
Simvastatinkonzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	73,64	77,67	15,96	54,77
0,1	69,37	79,94	19,35	63,68
1	73,04	81,22	18,72	63,60
10	75,01	81,77	19,72	64,83
1000	72,55	80,32	18,77	62,66

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Simvastatin µg/ml)	0-0,1	0,1-1	1-10	10-1000
Signifikanzniveau (p-Wert)	**0,465**	**0,225**	**0,345**	**0,080**

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichung und der Spannweite, der CD62p Expression auf unstimulierten Thrombozyten sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Simvastatins.

Wie in den obigen Tabellen zu entnehmen ist, lässt sich nirgendwo ein signifikanter Unterschied in der CD40L-Expression bei verschiedenen Simvastatinkonzentrationen beobachten.

4.9) Messung der CD41- Expression

4.9.1) Messung der CD41-Expression bei verschiedenen Chloroquinkonzentrationen ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und unter TRAP-Stimulation

Mittels des CD41-Antikörpers lässt sich die CD41-Epitopendichte auf der Thrombozytenoberfläche in analoger Weise zu der CD62p-Epitopendichte sowie der CD40L-Epitopendichte quantitativ erfassen.

Das Prinzip ist dasselbe wie das oben genannte bei der Messung der CD62p bzw. der CD40L-Epitopendichte.

In den folgenden Tabellen und graphischen Darstellungen werden die Zusammenhänge zwischen Chloroquin bzw. Hydroxychloroquinkonzentration und CD40L-Expression unter verschiedenen stimulatorischen Bedingungen verdeutlicht.

Abbildung 4.9.1)

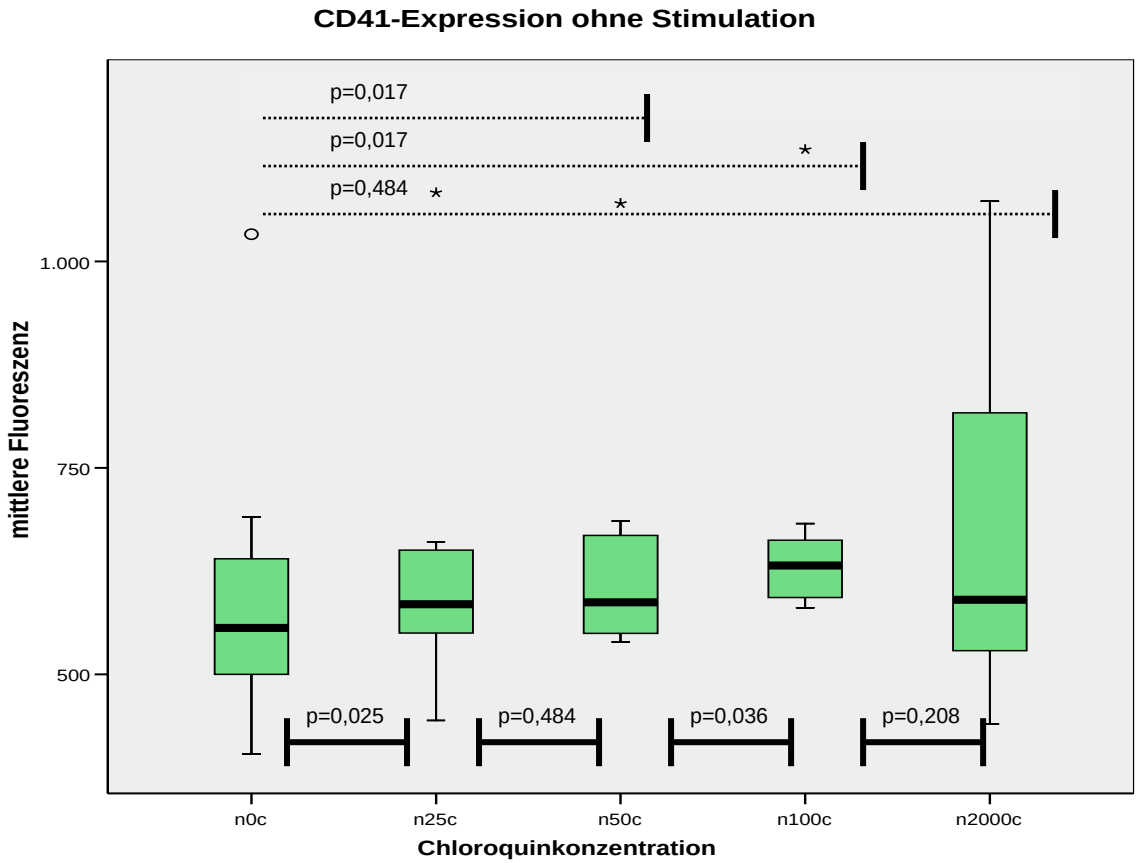


Abbildung 4.9.2)

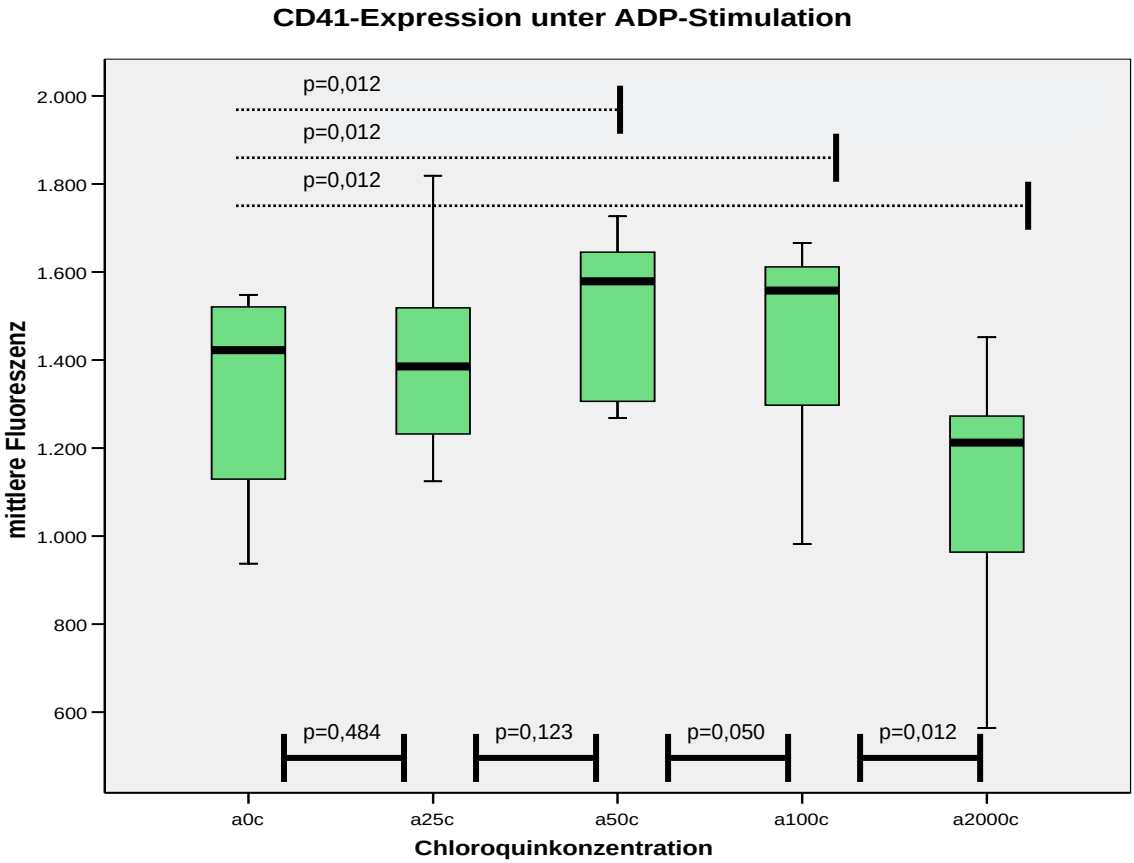
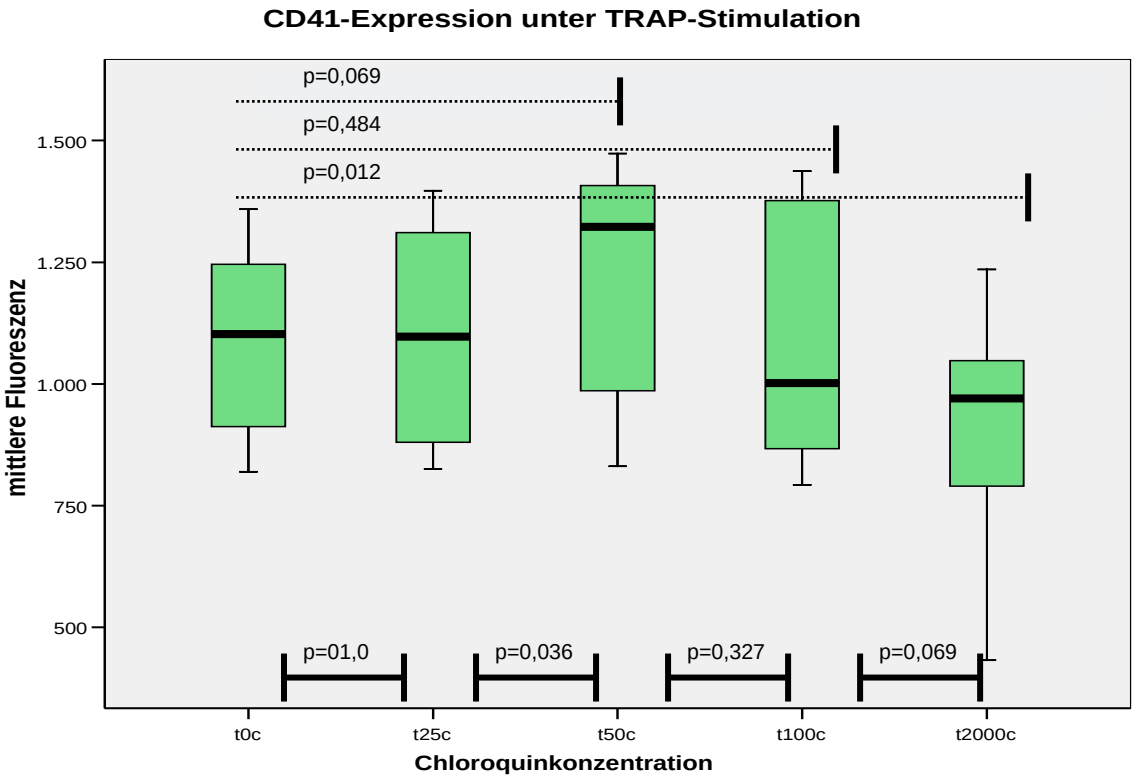


Abbildung 4.9.3)



Graphische Darstellung der Verteilung der mittleren Fluoreszenz und der Mediane in dimensionslosen Einheiten mit Angabe des Signifikanzniveaus zwischen den mittleren Fluoreszenzen bei steigender Chloroquinkonzentration (von links nach rechts 0, 25, 50, 100, 2000 in µg/ml). Die gestrichelten Linien kennzeichnen das Signifikanzniveau, der jeweiligen Konzentration, im Bezug auf den Nullwert, ohne Medikamentenzusatz, die durchgenenden schwarzen Linien kennzeichnen das Signifikanzniveau zwischen den einzelnen, benachbarten Konzentrationsschritten.

*Werte, die mehr als den 1,5-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Ausreißer und sind durch ein " o " gekennzeichnet. Werte, die mehr als den 3-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen gelten als Extremwerte und werden mit einem " * " gekennzeichnet.*

Innerhalb der unstimulierten Testreihe zeigt sich nur zwischen den Chloroquinkonzentrationen 0 und 25 bzw. 50 und 100µg/ml ein signifikanter Unterschied in der CD41-Expression. Die P-Werte liegen bei 0,025 bzw. 0,036.
Die signifikanten Unterschiede beruhen hier auf einer Zunahme des Medianes und nicht auf einer Abnahme.
Gegenüber der Ausgangskonzentration von 0µg Chloroquin pro ml ist außerdem ein kontinuierlicher Anstieg der Mediane und Mittelwerte bis zur Konzentration 100 µg/ml zu beobachten. Unter 2000µg/ml ist wiederum ein leichter Abfall von Mittelwert und Median vorhanden, welcher jedoch nicht auf das Ausgangsniveau abfällt.
Unter ADP-Stimulation gibt es zwischen den Konzentrationen 50 und 100 sowie 100 und 2000µg/ml einen signifikanten Unterschied (p=0,05; p=0,012). In diesem Falle ist jeweils ein Abfall von Mittelwert und Median vorhanden.
Die einzigen Mediane, die unterhalb der Ausgangskonzentration von 0µg Chloroquin liegen, finden sich bei den Konzentrationen 25 und 2000µg/ml. Der einzige Mittelwert, der unterhalb der Ausgangskonzentration liegt, findet sich bei 2000µg/ml.
Unter TRAP-Stimulation sieht es wie folgt aus: Die Mediane der CD41-Expression fallen unter steigenden Chloroquinkonzentrationen von der Ausgangskonzentration stetig ab, einzig die Konzentration von 50µg/ml stellt hier mit einer höheren CD41-Expression eine Ausnahme dar. Die Mittelwerte liegen unter 0; 25 und 100µg/ml sehr nahe beieinander, unter 50µg/ml ist er höher, unter 2000µg/ml deutlich niedriger als der Ausgangswert.
Signifikanz ist bei dem Konzentrationsschritt von 25 auf 50µg/ml zu sehen. Zwischen 100 und 2000µg/ml wird die Signifikanz mit einem P-Wert von 0,069 knapp verfehlt.

Abbildung 4.9.4)

CD41-Expression auf der Thrombozytenoberfläche ohne Stimulation				
Chloroquinkonzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	555,91	603,49	120,21	629,60
25	584,66	637,15	108,17	639,46
50	587,10	652,38	97,98	531,59
100	631,65	686,34	89,28	555,08
2000	590,09	672,96	159,88	633,47

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	25-50	50-100	100-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,025	0,484	0,036	0,208

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichung und der Spannweite, der CD41-Expression auf unstimulierten Thrombozyten sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Chloroquins.

Darstellung des Signifikanzniveaus zum Ausgangswert ohne Chloroquinzusatz				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	0-50	0-100	0-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,025	0,017	0,017	0,484

Darstellung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zum jeweiligen Ausgangswert von 0µg/ml Medikamentenzusatz.

Abbildung 4.9.5)

CD41-Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter ADP-Stimulation				
Chloroquinkonzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	1422,40	1328,75	183,55	611,10
25	1384,91	1401,77	168,71	694,72
50	1579,16	1506,93	143,04	458,06
100	1557,41	1447,66	160,24	684,25
2000	1212,44	1114,02	195,82	887,81

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	25-50	50-100	100-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,484	0,123	0,05	0,012

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichung und der Spann-weite, der CD41-Expression auf ADP-stimulierten Thrombozyten sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Chloroquins.

Darstellung des Signifikanzniveaus zum Ausgangswert ohne Chloroquinzusatz				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	0-50	0-100	0-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,484	0,012	0,012	0,012

Darstellung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zum jeweiligen Ausgangswert von 0µg/ml Medikamentenzusatz.

Abbildung 4.9.6)

CD41-Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter TRAP-Stimulation				
Chloroquinkonzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	1102,15	1087,37	158,88	539,43
25	1097,17	1099,82	215,87	572,28
50	1323,09	1217,26	195,87	642,64
100	1001,63	1089,97	160,24	644,45
2000	969,87	910,33	195,82	803,20

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	25-50	50-100	100-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	1,0	0,036	0,327	0,069

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichung und der Spannweite, der CD41-Expression auf TRAP-stimulierten Thrombozyten sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Chloroquins .

Darstellung des Signifikanzniveaus zum Ausgangswert ohne Chloroquinzusatz				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	0-50	0-100	0-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	1,0	0,069	0,484	0,012

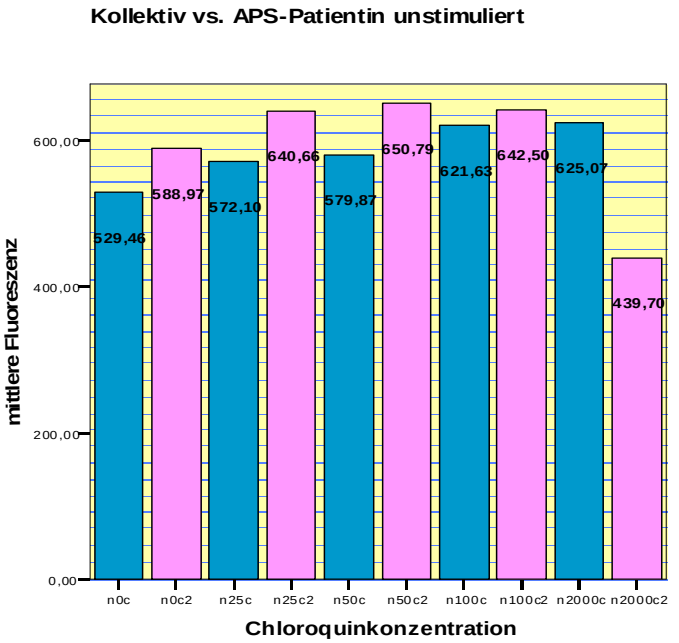
Darstellung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zum jeweiligen Ausgangswert von 0µg/ml Medikamentenzusatz.

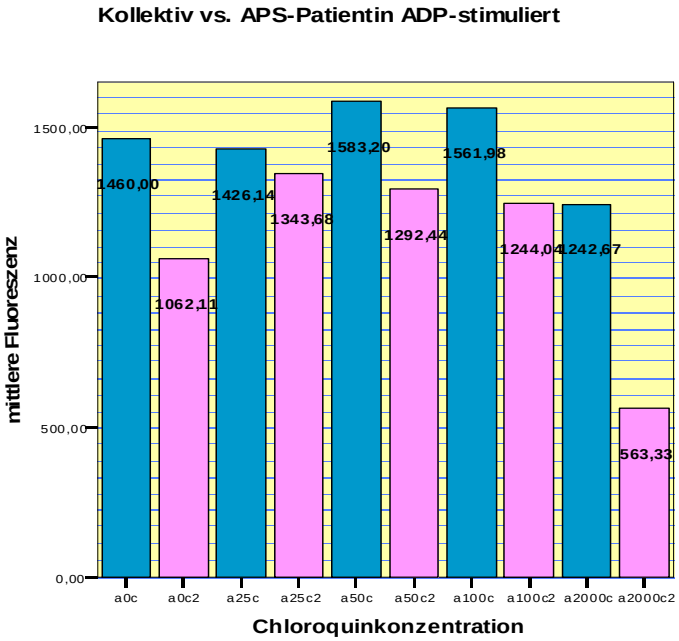
Insgesamt zeigt sich bei der CD41-Expression unter Chloroquinzusatz ein eher heterogenes Bild, wobei ohne Stimulation kein Abfall vom Mittelwert sowie Median der Fluoreszenz vorhanden ist.
In der ADP-stimulierten Testreihe zeigt sich eine Minderung des Medianes der Fluoreszenz gegenüber dem Ausgangswert bei 25 und 2000µg/ml, bei den Mittelwerten liegt der 2000er Wert deutlich unter dem Ausgangsmittelwert.
Bei der TRAP-stimulierten Reihe bei 25; 100 und 2000µg/ml zeigt sich eine Verminderung des Medianes bezüglich des Ausgangswertes, bei den Mittelwerten ist dies bei 2000µg/ml der Fall.
Zu den Ausgangswerten ohne Chloroquinzusatz kann man in der unstimulierten Testreihe für jegliche Chloroquinkonzentration nur Anstiege der CD41-Expression vermerken, wobei die ersten 3 signifikant sind. Die ADP-Stimulation zeigt nur für 50 und 100µg/ml Anstiege der Epitopendichte, welche beide Signifikanz erreichen. Die anderen Konzentrationen führen hier zu einem Rückgang derselbigen, einzig unter 2000µg/ml kann Signifikanz erreicht werden.
TRAP-Stimulation zeigt nur noch für die Chloroquinkonzentration 50µg/ml eine Erhöhung der CD41-Epitopendichte. Bei den restlichen Konzentrationen können hingegen rückläufige Werte beobachtet werden, Signifikanz wird wieder bei 2000µg/ml erreicht.

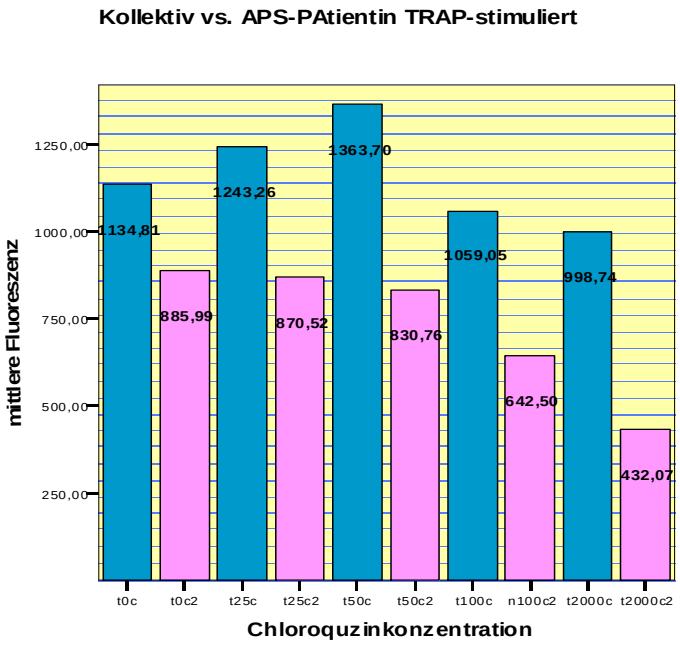
4.9.2) Vergleich der Daten der APS-Patientin mit den Mittelwerten der übrigen gesunden Probanden

Da eine Patientin des Kollektives unter dem APS-Syndrom leidet, wurden die mittleren Fluoreszenzen dieser Patientin mit denen der gesunden Probanden verglichen.

Abbildung 4.9.7)







*Graphische Darstellung der Mediane der mittleren Fluoreszenzen des gesunden Patientenkollektives (**blau**) mit den Messwerten einer APS-Patientin (**lila**) ohne Stimulation, unter ADP- und unter TRAP-Stimulation.*

Unstimuliert ist die CD41-Expression bei der APS-Patientin größer als beim Kollektiv. Einzig die Konzentration 2000µg/ml stellt hier eine Ausnahme dar, hier verhält es sich genau umgekehrt. (Abbildung 4.9.7)
In den beiden anderen Testreihen, unter ADP bzw. TRAP-Stimulation, liegt die CD41-Expression der APS-Patientin in allen Fällen unter der des Kontrollkollektives.

4.10) Messung der CD41-Expression bei verschiedenen Hydroxychloroquinkonzentrationen ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und unter TRAP-Stimulation

Analog zu der oben genannten Messung der CD62p und CD40L-Expression bei verschiedenen Stimulationen und unter verschieden Chloroquinkonzentrationen

ist die Testreihe noch einmal mit Hydroxychloroquin anstelle des Chloroquins durchgeführt worden. Es wurden daher dieselben Konzentrationen verwendet wie bei der Testreihe mit dem Chloroquin zuvor. Dies ermöglicht später auch einen direkten Vergleich der beiden Medikamente bezüglich ihres Einflusses auf die CD41-Expression.

Es folgen wie oben Tabellen und graphische Darstellungen in gleicher Weise, wie bei der zuvor mit Chloroquin durchgeführten Testreihe.

Abbildung 4.10.1)

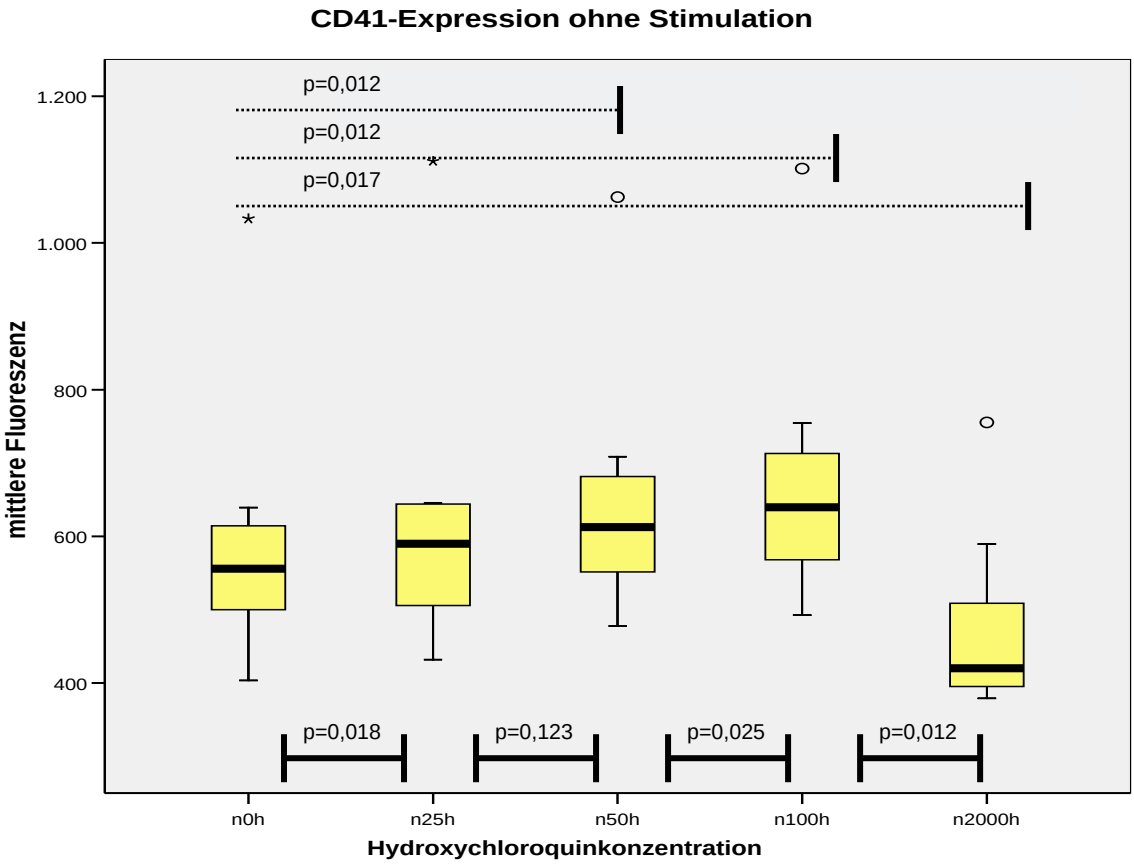


Abbildung 4.10.2)

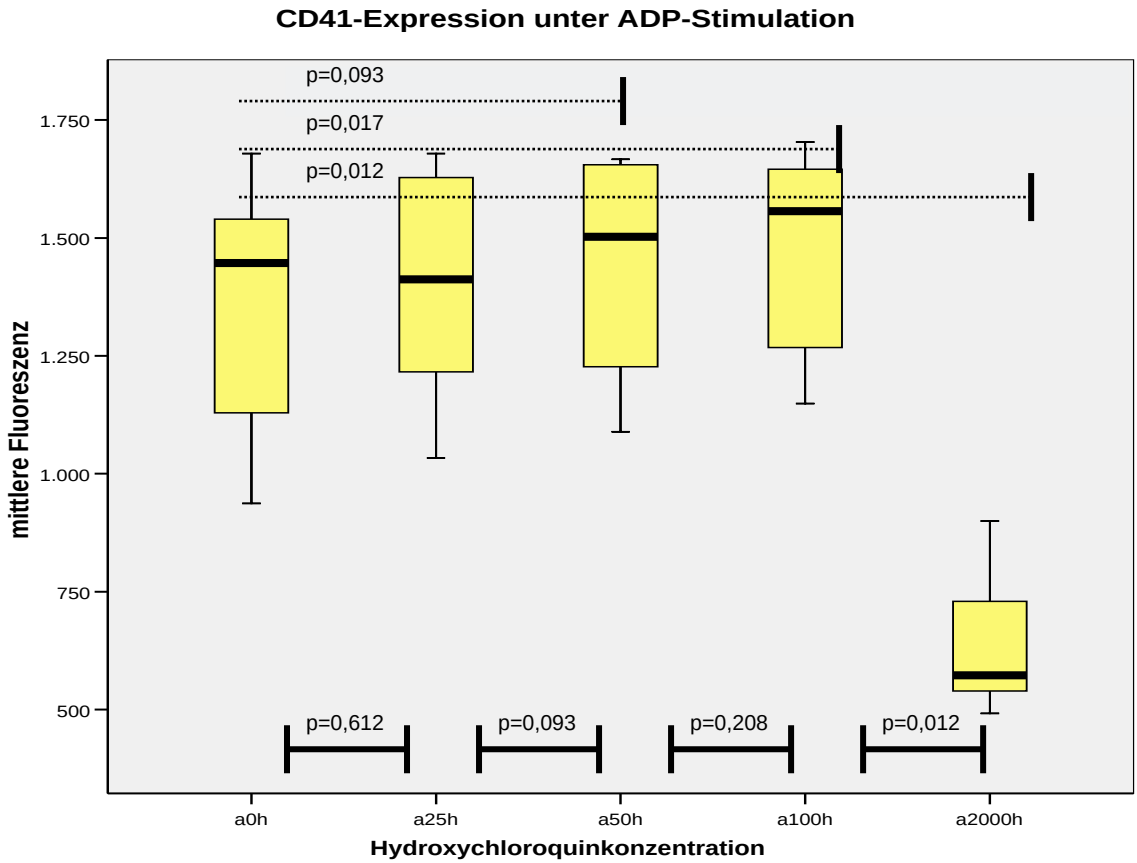
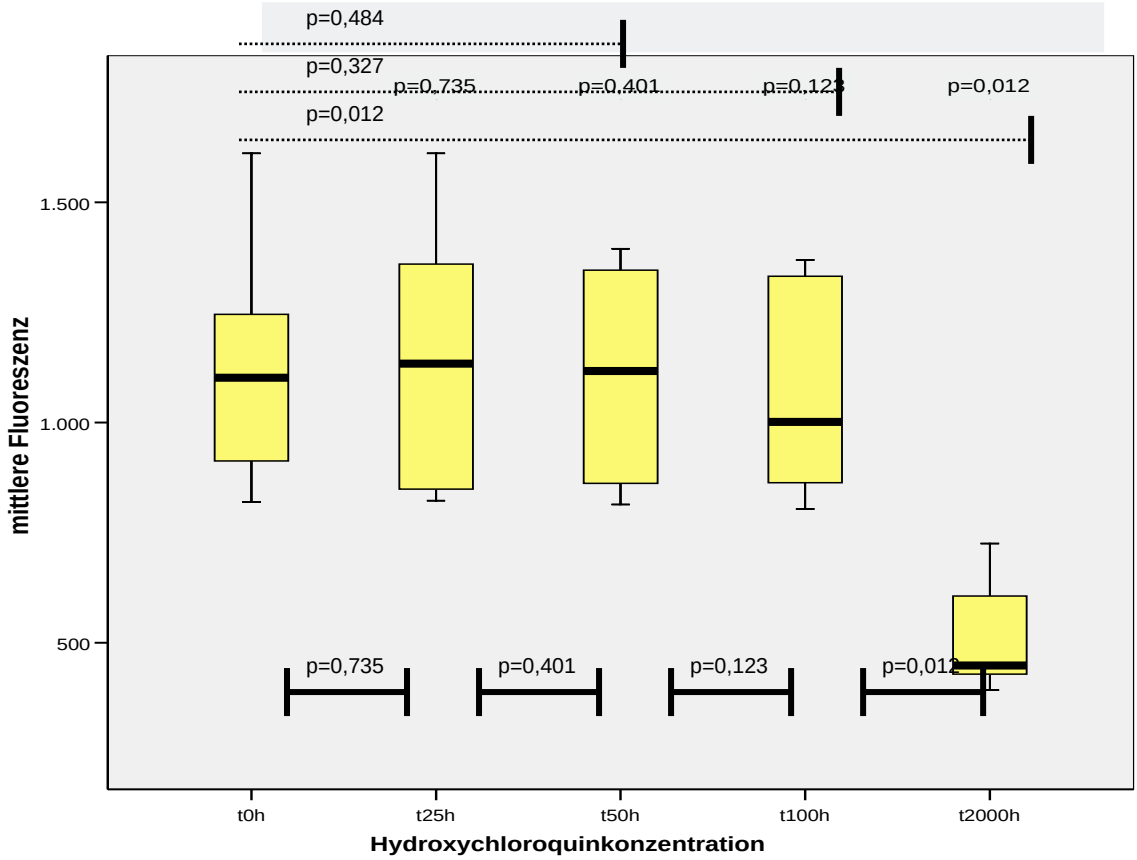


Abbildung 4.10.3



Graphische Darstellung der Verteilung der mittleren Fluoreszenz und der Mediane in dimensionslosen Einheiten mit Angabe des Signifikanzniveaus zwischen den mittleren Fluoreszenzen bei steigender Chloroquinkonzentration (von links nach rechts 0, 25, 50, 100, 2000 in µg/ml). Die gestrichelten Linien kennzeichnen das Signifikanzniveau, der jeweiligen Konzentration, im Bezug auf den Nullwert, ohne Medikamentenzusatz, die durchgehenden schwarzen Linien kennzeichnen das Signifikanzniveau zwischen den einzelnen, benachbarten Konzentrationsschritten.

*Werte, die mehr als den 1,5-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Ausreißer und sind durch ein " o " gekennzeichnet .Werte, die mehr als den 3-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen gelten als Extremwerte und werden mit einem " * " gekennzeichnet.*

Unter Hydroxychloroquinzusatz in der unstimulierten Testreihe, kann zwischen den Konzentrationen 0 und 25µg/ml, 50 und 100µg/ml sowie 100 und 2000µg/ml eine Signifikanz nachgewiesen werden.

Bei den ersten beiden Konzentrationsschritten handelt es sich um eine Steigerung von Mittelwert und Median. Unter Zusatz von 2000µg/ml ist ein Abfall von Mittelwert und Median vorhanden.

Mittelwert und Median unter 2000µg/ml sind die Einzigen, die die Ausgangswerte bei 0µg/ml unterschreiten, hierbei wird Signifikanz erreicht (p=0,017).

In der ADP-stimulierten Testreihe liegen die Mediane und Mittelwerte der Konzentration 2000µg/ml unter der der Ausgangskonzentration von 0µg Chloroquin pro ml. Mediane und Mittelwerte der Konzentrationen 25, 50 und 100µg/ml liegen darüber.

Signifikanz zeigt sich zwischen 100 und 2000µg/ml mit einem P-Wert von 0,012.

Das Signifikanzniveau der Senkung der CD41-Expression, der Konzentration 2000µg/ml gegenüber dem Ausgangswert bei 0µg/ml, liegt ebenfalls bei 0,012.

In der TRAP-Reihe liegen Mittelwerte und Mediane bei 50 und 100µg/ml über dem Ausgangswert, der Rest liegt darunter.

Signifikanz ist zwischen den Konzentrationen 100 und 2000µg/ml vorhanden (p=0,012).

Gegenüber den Werten der Konzentration 0µg/ml liegt ebenfalls ein signifikanter Abfall der CD41-Expression vor (p=0,012).

Abbildung 4.10.4)

CD41-Expression auf der Thrombozytenoberfläche ohne Stimulation				
Hydroxychloroquin-konzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	555,91	597,05	113,89	629,60
25	590,13	627,97	131,86	679,49
50	612,60	654,03	113,16	584,52
100	639,83	679,39	112,80	608,88
2000	420,06	472,86	76,84	376,03

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Hydroxychloroquin µg/ml)	0-25	25-50	50-100	100-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,018	0,123	0,025	0,012

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichungen und der Spannweite, der CD41-Expression auf unstimulierten Thrombozyten sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Hydroxychloroquins.

Darstellung des Signifikanzniveaus zum Ausgangswert ohne Hydroxychloroquinzusatz				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	0-50	0-100	0-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,018	0,012	0,012	0,017

Darstellung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zum jeweiligen Ausgangswert von 0µg/ml Medikamentenzusatz.

Abbildung 4.10.5)

CD41-Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter ADP-Stimulation				
Hydroxychloroquin-konzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	1447,08	1356,09	210,89	741,65
25	1412,30	1216,11	201,23	1511,79
50	1502,76	1440,87	189,37	577,78
100	1556,83	1474,13	165,64	554,89
2000	572,72	634,38	101,27	408,11

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Hydroxychloroquin µg/ml)	0-25	25-50	50-100	100-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	,499	,093	,208	,012

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichungen und der Spannweite, der CD41-Expression auf ADP-stimulierten Thrombozyten sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Hydroxychloroquins.

Darstellung des Signifikanzniveaus zum Ausgangswert ohne Hydroxychloroquinzusatz				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	0-50	0-100	0-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,612	0,093	0,017	0,012

Darstellung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zum jeweiligen Ausgangswert von 0µg/ml Medikamentenzusatz.

Abbildung 4.10.6)

CD41-Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter TRAP-Stimulation				
Hydroxychloroquin-konzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	1102,15	1118,9688	190,48	792,26
25	1133,57	1139,9475	150,45	788,74
50	1117,35	1107,5038	213,95	580,99
100	1001,30	1070,9988	209,04	565,77
2000	447,77	510,2313	85,99	332,76

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Hydroxychloroquin µg/ml)	0-25	25-50	50-100	100-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,735	0,401	0,123	0,012

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichungen und der Spannweite, der CD41-Expression auf TRAP-stimulierten Thrombozyten sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Hydroxychloroquins.

Darstellung des Signifikanzniveaus zum Ausgangswert ohne Hydroxychloroquinzusatz				
Konzentrationsstufen (Chloroquin µg/ml)	0-25	0-50	0-100	0-2000
Signifikanzniveau (p-Wert)	0,735	0,484	0,327	0,012

Darstellung des Signifikanzniveaus der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen zum jeweiligen Ausgangswert von 0µg/ml Medikamentenzusatz.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CD41-Expression, nach Inkubation mit 2000µg/ml in allen drei Testreihen, signifikant unter der mit 0µg/ml Hydroxychloroquin liegt. In der ADP-stimulierten Reihe liegen außerdem noch die Werte bei 25µg/ml unter denen der 0µg/ml Konzentration, wobei jedoch keine Signifikanz zu beobachten ist.
Letztlich zeigt sich in dem TRAP-stimulierten Ansatz bei 50µg/ml ein niedrigerer Mittelwert und bei 100µg/ml verhält es sich mit Mittelwert und Median in dieser Weise in Bezug auf die Ausgangswerte.
Für Hydroxychloroquin ergibt sich im Vergleich mit dem Wert für 0µg/ml unter

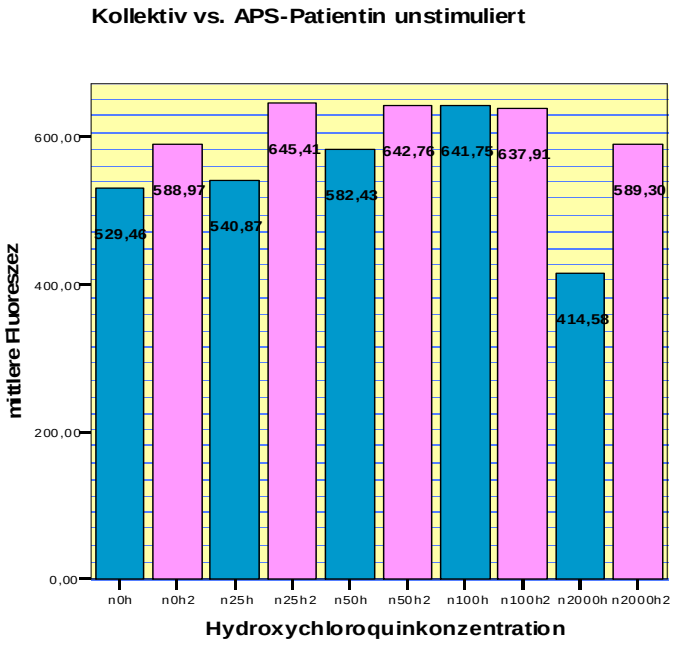
jeder Hydroxychloroquinkonzentration eine statistische Signifikanz, wobei es sich lediglich bei jener, die unter 2000µg/ml beobachtet wird, um eine Reduktion handelt.

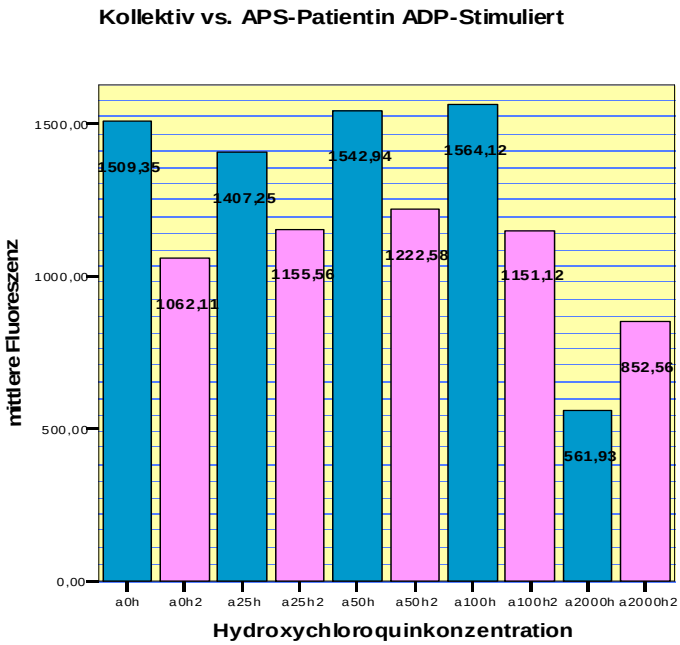
Bei der ADP-Stimulation können für die Hydroxychloroquinkonzentrationen 100 und 2000µg/ml Signifikanzen beobachtet werden. Bei ersterer handelt es sich um einen Anstieg, bei zweiter um einen Rückgang der CD41-Epitopendichte.

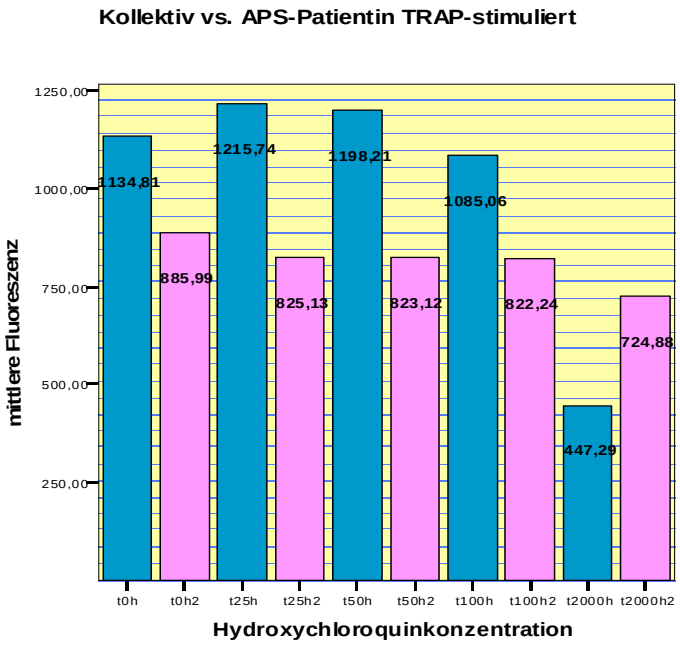
Zuletzt ergibt sich unter TRAP-Stimulation nur ein signifikantes Ergebnis. Bei 2000µg/ml Hydroxychloroquin, wobei eine Senkung der CD41-Expression zu registrieren ist.

4.10.1) Vergleich der Daten der APS-Patientin mit den Mittelwerten der übrigen gesunden Probanden

Abbildung 4.10.7)







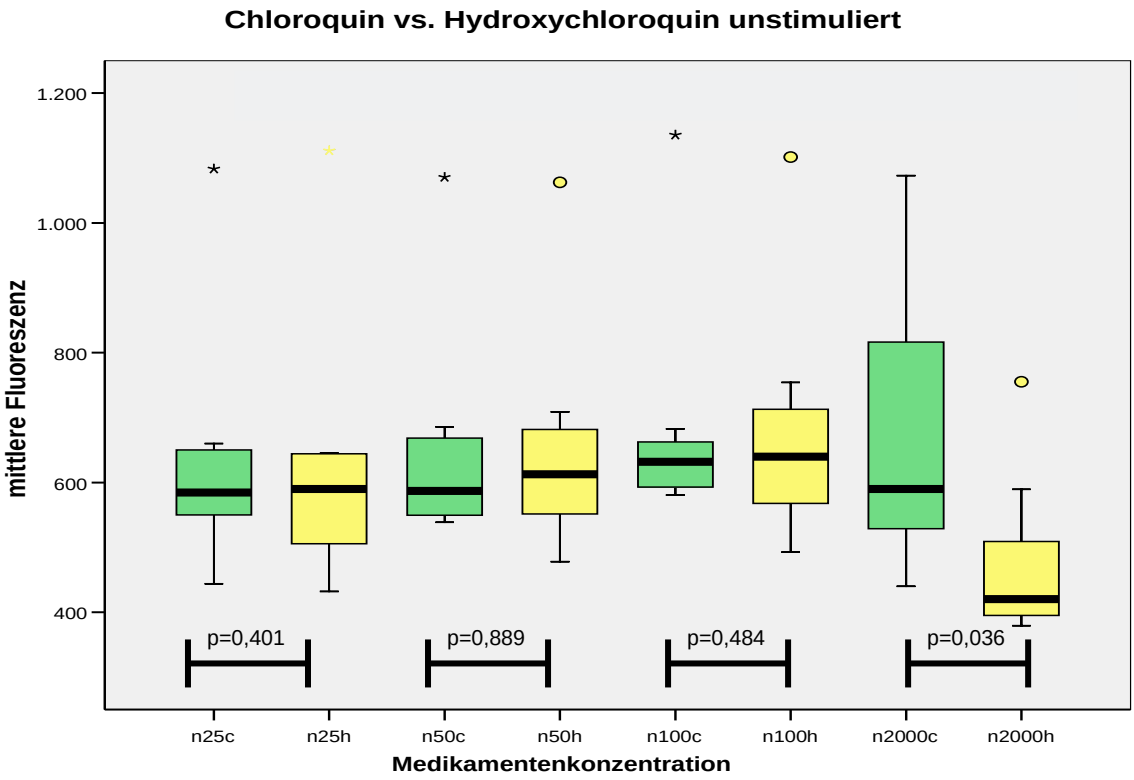
*Graphische Darstellung der Mediane der mittleren Fluoreszenzen des gesunden Patientenkollektives (**blau**) mit den Messwerten einer APS-Patientin (**lila**) ohne Stimulation, unter ADP- und unter TRAP-Stimulation im Vergleich*

Im unstimulierten Zustand liegt die CD41-Expression der APS-Patientin bei allen Hydroxychloroquinkonzentrationen, mit Ausnahme der Konzentration von 100µg/ml, über der des Kontrollkollektives.
Unter ADP-Stimulation und TRAP-Stimulation liegen die CD41-Expressionen bei der APS-Patientin von 0 bis 100µg/ml unter derjenigen des restlichen Kollektives. Unter Zusatz von 2000µg/ml Hydroxychloroquin hingegen ist diese in beiden Fällen, in Bezug auf das Kollektiv, deutlich erhöht.

4.11) Vergleich zwischen Chloroquin und Hydroxychloroquin bezüglich ihres Einflusses auf CD41-Expression

Da nun jedes Medikament und sein Einfluss auf die CD41-Expression, in verschiedenen Konzentrationen und unter verschiedenen Stimulationen für sich dargestellt wurde, wurden wie schon bei der CD62p und CD40L-Expression, auch beide Medikamente untereinander verglichen. Es sind immer dieselben Konzentrationen bei derselben Stimulation miteinander verglichen worden.

Abbildung 4.11.1)



*Graphische Darstellung der Verteilung der mittleren Fluoreszenz und der Mediane in dimensionslosen Einheiten mit Angabe des Signifikanzniveaus zwischen den mittleren Fluoreszenzen bei steigender Chloroquin- bzw. Hydroxychloroquinkonzentration (von links nach rechts 25, 50, 100, 2000 in µg/ml). Die jeweils gleichen Konzentrationen von jedem Medikament sind nebeneinander dargestellt. Die Angabe des P-Wertes bezieht sich jeweils auf die Differenz der CD41-Expression zwischen den korrespondierenden Konzentrationen von Chloroquin (**grün**) und Hydroxychloroquin (**gelb**).*

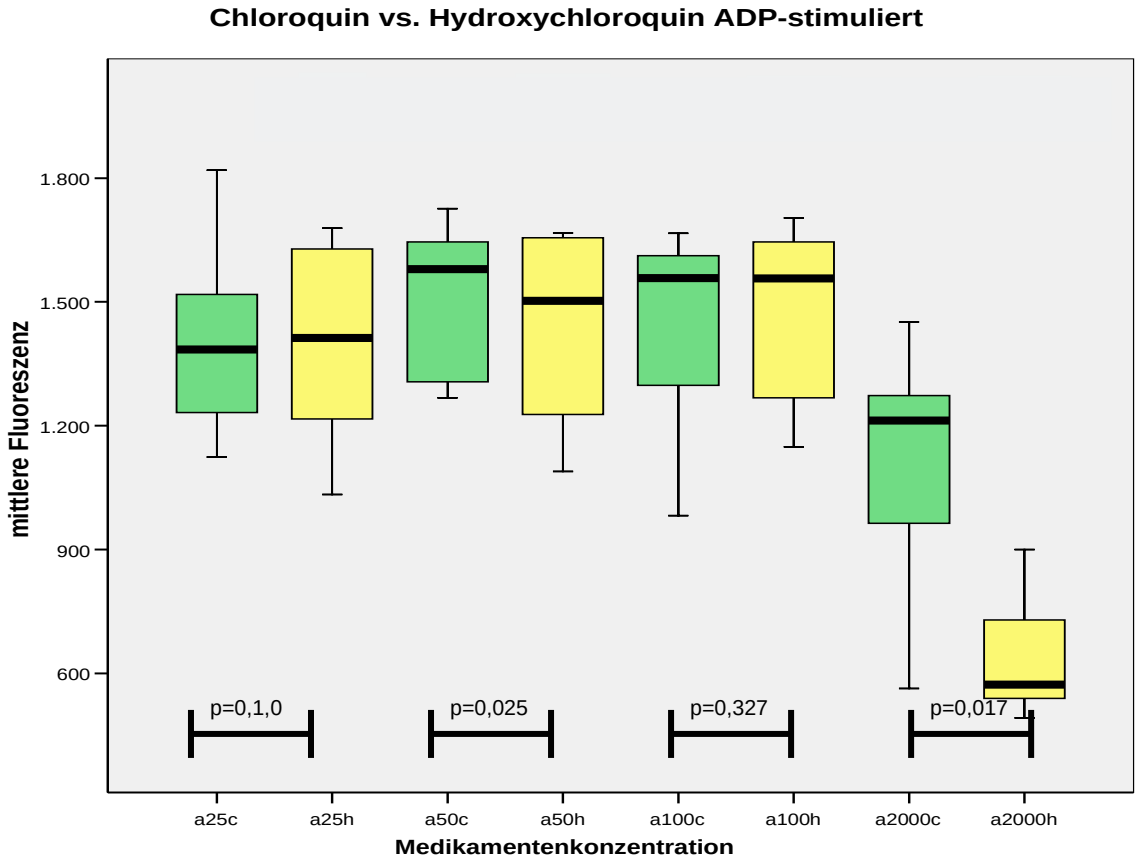
*Werte, die mehr als den 1,5-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Ausreißer und werden durch ein " o " gekennzeichnet. Werte, die mehr als den 3-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Extremwerte und werden mit einem " * " gekennzeichnet.*

Abbildung 4.11.2)

CD41-Expression auf der Thrombozytenoberfläche ohne Stimulation				
Hydroxy-/Chloroquin-konzentration µg/ml	25	50	100	2000
Mediane Chloroquin	584,66	587,10	631,65	590,09
Mediane Hydroxychloroquin	590,13	612,60	639,83	420,06
Signifikanzniveau (p-Wert)	**0,401**	**0,889**	**0,484**	**0,036**

Darstellung der Mediane, der CD41-Expression auf unstimulierten Thrombozyten, sowie des Signifikanzniveaus, der Differenzen der CD41-Expression zwischen den jeweils korrespondierenden Konzentrationen der beiden Antimalariamittel.

Abbildung 4.11.3)



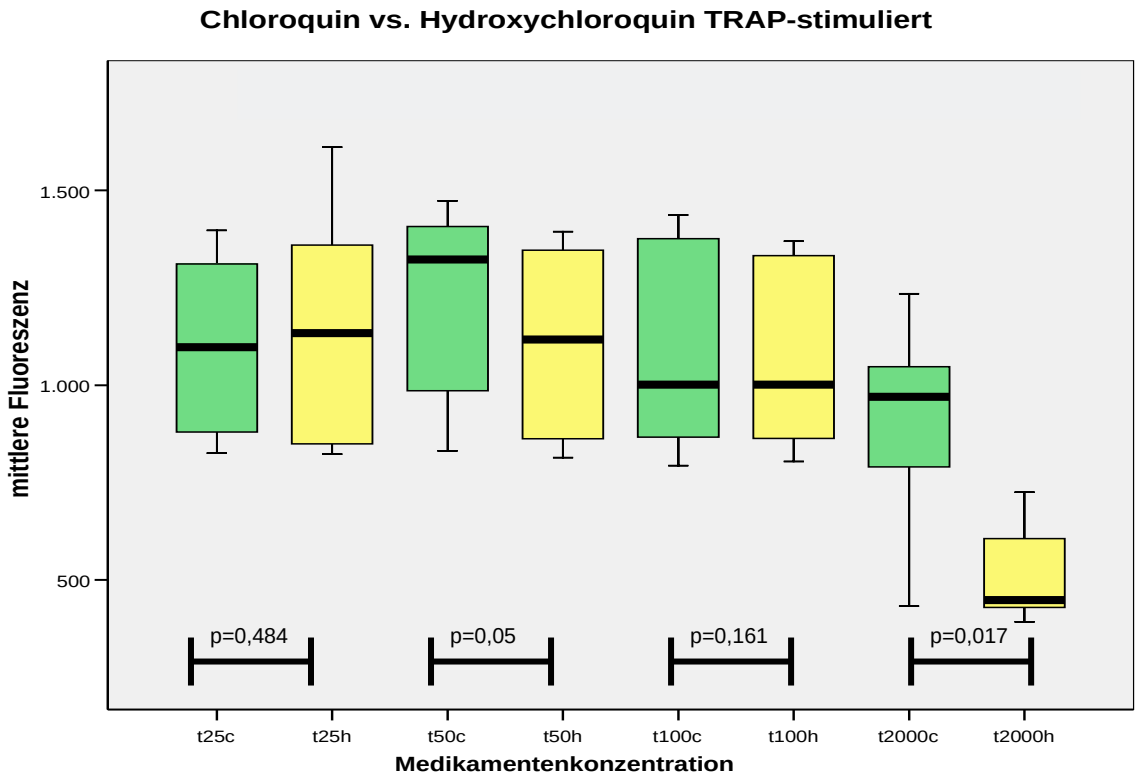
*Graphische Darstellung der Verteilung der mittleren Fluoreszenz und der Mediane in dimensionslosen Einheiten mit Angabe des Signifikanznivaus zwischen den mittleren Fluoreszenzen bei steigender Chloroquin- bzw. Hydroxychloroquinkonzentration (von links nach rechts 25, 50, 100, 2000 in µg/ml). Die jeweils gleichen Konzentrationen von jedem Medikament sind nebeneinander dargestellt. Die Angabe des P-Wertes bezieht sich jeweils auf die Differenz der CD41-Expression zwischen den korrespondierenden Konzentrationen von Chloroquin (**grün**) und Hydroxychloroquin (**gelb**).*
*Werte, die mehr als den 1,5-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Ausreißer und werden durch ein " o " gekennzeichnet. Werte, die mehr als den 3-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Extremwerte und werden mit einem " * " gekennzeichnet.*

Abbildung 4.11.4)

CD41-Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter ADP-Stimulation				
Hydroxy-/Chloroquin-konzentration µg/ml	25	50	100	2000
Mediane Chloroquin	1384,91	1579,16	1557,41	1212,44
Mediane Hydroxychloroquin	1342,10	1502,76	1556,83	572,72
Signifikanzniveau (p-Wert)	**1,0**	**0,025**	**0,327**	**0,017**

Darstellung der Mediane, der CD41-Expression auf unstimulierten Thrombozyten, sowie des Signifikanzniveaus, der Differenzen der CD41-Expression zwischen den jeweils korrespondierenden Konzentrationen der beiden Antimalariamittel.

Abbildung 4.11.5)



*Graphische Darstellung der Verteilung der mittleren Fluoreszenz und der Mediane in dimensionslosen Einheiten mit Angabe des Signifikanzniveaus zwischen den mittleren Fluoreszenzen bei steigender Chloroquin- bzw. Hydroxychloroquinkonzentration (von links nach rechts 25, 50, 100, 2000 in µg/ml). Die jeweils gleichen Konzentrationen von jedem Medikament sind nebeneinander dargestellt. Die Angabe des P-Wertes bezieht sich jeweils auf die Differenz der CD41-Expression zwischen den korrespondierenden Konzentrationen von Chloroquin (**grün)** und Hydroxychloroquin (**gelb**).*

*Werte, die mehr als den 1,5-fachen Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Ausreißer und werden durch ein " o " gekennzeichnet. Werte, die mehr als den 3-fachn Quartilsabstand von der Box abweichen, gelten als Extremwerte und werden mit einem " * " gekennzeichnet.*

Abbildung 4.11.6)

CD41-Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter TRAP-Stimulation				
Hydroxy-/Chloroquin-konzentration µg/ml	25	50	100	2000
Mediane Chloroquin	1097,17	1323,09	1001,63	969,87
Mediane Hydroxychloroquin	1133,57	1117,35	1001,30	447,77
Signifikanzniveau (p-Wert)	**0,484**	**0,05**	**0,161**	**0,017**

Darstellung der Mediane, der CD41-Expression auf unstimulierten Thrombozyten, sowie des Signifikanzniveaus, der Differenzen der CD41-Expression zwischen den jeweils korrespondierenden Konzentrationen der beiden Antimalariamittel.

Abbildung 4.11.7)

Unstimuliert

Konz. µg/ml	25	50	100	2000
Chloroquin	5,2 **S**	5,6 **S**	13,6 **S**	6,2
Hydroxychloroquin	6,2 **S**	10,2 **S**	15,1 **S**	24,4 **S**

ADP-stimuliert

Konz. µg/ml	25	50	100	2000
Chloroquin	2,6	11,0 **S**	9,5 **S**	14,8 **S**
Hydroxychloroquin	2,4	3,8	7,6 **S**	60,4 **S**

TRAP-stimuliert

Konz. µg/ml	25	50	100	2000
Chloroquin	0,5	20,0	9,1	12,0 **S**
Hydroxychloroquin	2,9	1,4	9,2	59,4 **S**

Darstellung der Reduktion/Steigerung (in rot dargestellt) des CD41-Epitopes auf der Thrombozytenoberfläche bei steigenden Hydroxy-/Chloroquinkonzentrationen in %, ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und TRAP-Stimulation, im

Verhältnis zu den Ausgangswerten bei 0µg/ml Wirkstoffzusatz. Signifikante Änderungen der CD41-Expression, bezüglich der Ausgangsexpression ohne Medikamentenzusatz sind mit ***S*** *gekennzeichnet.*

In der direkten Gegenüberstellung von Chloroquin und Hydroxychloroquin tritt in der unstimulierten Reihe einzig bei der Wirkstoffkonzentration von 2000µg/ml ein signifikanter Unterschied (p=0,036) auf, wobei die CD41-Expression unter Hydroxychloroquinzusatz unter der beim Chloroquinzusatz liegt.
Unter ADP-Stimulation liegt die CD41-Expression mit Hydroxychloroquinzusatz bei 50 bzw. 2000µg/ml signifikant unter der mit Chloroquinzusatz (p=0,025 bzw. p=0,017).
In der TRAP-stimulierten Reihe zeigen sich die Unterschiede an denselben Stellen in gleicher Weise, lediglich die P-Werte unterscheiden sich (p=0,05 bzw. p=0,017).

4.12) Messung der CD41-Expression bei verschiedenen Simvastatinkonzentrationen ohne Stimulation, unter ADP-Stimulation und unter TRAP-Stimulation

Analog zu der oben genannten Messung der CD40L-Expression und CD62p-Expression unter verschiedenen Simvastatinkonzentrationen, ist eine Messung der CD41-Expression durchgeführt worden.
Es folgen tabellarische Darstellungen, um diesen Einfluss unter den verschiedenen Stimulationen zu verdeutlichen.

Abbildung 4.12.1)

CD41-Expression auf der Thrombozytenoberfläche ohne Stimulation				
Simvastatinkonzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	581,96	695,84	215,85	1207,60
0,1	609,67	723,49	202,69	1284,98
1	582,96	725,78	243,18	1359,11
10	562,63	705,27	228,27	1333,58
1000	657,61	727,05	241,52	1370,75

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Simvastatin µg/ml)	0-0,1	0,1-1	1-10	10-1000
Signifikanzniveau (p-Wert)	**0,345**	**0,893**	**0,080**	**0,225**

Abbildung 4.12.2)

CD41-Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter ADP-Stimulation				
Simvastatinkonzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	1368	1467,11	325,72	1317,43
0,1	1692,66	1539,12	331,23	1232,03
1	1628,89	1513,55	311,82	1203,27
10	1549,41	1504,86	645,94	1306,16
1000	1495,44	1457,84	328,23	1266,52

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Simvastatin µg/ml)	0-0,1	0,1-1	1-10	10-1000
Signifikanzniveau (p-Wert)	**0,345**	**0,225**	**0,500**	**0,080**

Abbildung 4.12.3)

CD41-Expression auf der Thrombozytenoberfläche unter TRAP-Stimulation				
Simvastatinkonzentration µg/ml	Median	Mittelwert	mittlere Abweichung	Spannweite
0	1257,29	1254,91	435,16	1207,36
0,1	1222,68	1313,87	342,35	1259,54
1	1224,85	1320,83	341,53	1218,56
10	1226,58	1314,19	330,61	1227,13
1000	1256,83	1323,60	358,96	1241,68

Darstellung des Signifikanzniveaus zur jeweils nächsten höheren Konzentration				
Konzentrationsstufen (Simvastatin µg/ml)	0-0,1	0,1-1	1-10	10-1000
Signifikanzniveau (p-Wert)	**0,080**	**0,345**	**0,686**	**0,893**

Darstellung der Mediane, Mittelwerte, mittleren Abweichungen und der Spannweite, der CD41-Expression auf unstimulierten Thrombozyten sowie des Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen des Simvastatins.

Wie in den obigen Tabellen zu entnehmen ist, lässt sich, wie schon bei der CD40L-Expression zuvor, nirgendwo ein signifikanter Unterschied in der CD41-Expression bei verschiedenen Simvastatinkonzentrationen beobachten.

5) Diskussion

5.1.) Wirkung von Chloroquin und Hydroxychloroquin auf die CD62P, CD41 und CD40L-Expression

Bisher finden Chloroquin und Hydroxychloroquin, ursprünglich Antimalariamittel, hauptsächlich Anwendung in der Malariatherapie sowie in der Behandlung der rheumathoiden Arthritis und des diskoiden/systemischen Lupus erythematodes.
Chloroquin und Hydroxychloroquin haben jedoch beide, in vitro und in vivo gezeigt, dass sie einen signifikanten, senkenden Effekt bezüglich der Thrombozytenaggregation bzw. Thrombozytenaktivierung besitzen, wobei der genaue Wirkmechanismus noch unklar ist. [14, 15, 52]
Mittels Durchflusszytometrie lassen sich Thrombozytenoberflächenproteine, welche bei Aktivierung dieser verstärkt exprimiert werden, quantitativ erfassen.
Momentan ist in der Therapie des APS Warfarin/Cumarin das Mittel der Wahl in der Langzeitantikoagulation. Hier könnte z.B. Hydroxychloroquin eine relativ sichere Alternative darstellen, welche nahezu keine Blutungskomplikationen aufweist. [10, 14]
Hydroxychloroquin, welches die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten hemmt, wobei es erstere stärker beeinflusst, könnte unter anderem ASS ergänzen, welches seine Hauptwirkung in der Inhibition der Thrombozyten-aggregation besitzt.
Hydroxychloroquin könnte z.B. seine Wirkung in traumatischen Situationen unter Beweis stellen, in denen viel subendotheliale Matrix freigelegt wird, wohingegen ASS eher in Situationen in denen Stase das Hauptproblem darstellt von Nutzen sein sollte, wie z.B. Immobilisation nach Operationen.
Eine weitere Indikation für den Einsatz von Hydroxychloroquin könnte der Einsatz bei Patienten mit Aspirinallergie oder gastrointestinalen Blutungen unter ASS sein. [10]
Ein direkter Vergleich zwischen Chloroquin und Hydroxychloroquin bezüglich des thrombozytenhemmenden Effektes lag bis zu diesem Zeitpunkt nicht vor.

Eine deutliche Inhibition der Thrombozytenaggregation von ADP, Thrombin bzw. von adrenalinaktivierten Thrombozyten konnte ebenfalls nachgewiesen werden. [32, 50]

Des Weiteren interessiert hier der antithrombotische Effekt von Statinen.
Einige Autoren zeigten bereits einen anti-thrombozytären Effekt von Statinen in vivo, welcher mittels durchflusszytometrischer Detektion von membranständigen Glykoproteinen, im speziellen CD62P und CD40L, demonstriert wurde.
Eine Reduktion von löslichem CD40L in hypercholesterinämischen Patienten in Assoziation mit erniedrigten Spiegeln von löslichem CD62P mit Thrombozyten, als primären Ursprung, wurde ebenso beobachtet.
In klinischen Studien zeigte Simvastatin eine deutliche Senkung der CD62P-Expression. [58]
In vivo konnten bei vielen Patienten in mehreren Studien zahlreiche positive Effekte von Statinen bezüglich thrombembolischer Komplikationen nachgewiesen werden.
Das Hauptaugenmerk soll auch hier auf das Verhalten der CD40L-Expression gerichtet werden, da hier, wie bei den Antimalariamitteln, noch keine konzentrationsabhängigen Effekte nachgewiesen werden konnten. Ebenso wenig konnte bis dato keine in vitro Studie eine Beeinflussbarkeit des membranständigen CD40L durch Statine nachweisen.

Wie bereits erwähnt wird CD62p in unstimmulierten Thrombozyten nur in sehr geringem Maße an der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert. CD62p wird hauptsächlich in den Weibl-Palade-bodies sowie in den α-Granula von Endothelzellen und Thrombozyten gespeichert.
Bei der Aktivierung von Thrombozyten findet hier eine Translokation an die Zelloberfläche statt, weshalb die CD62p-Expression an der Zelloberfläche als gutes Maß für die Thrombozytenaktivierung gesehen werden kann. [7, 34, 46, 53]

CD62p spielt besonders bei der Adhäsion von Thrombozyten an die Endotheloberfläche eine große Rolle, somit könnte es bei einer Beeinflussung der Expression zu einer positiven Beeinflussung bezüglich der arteriosklerotischen Plaquebildung kommen. [4]

Sowohl Chloroquin als auch Hydroxychloroquin konnten in dieser in vitro Studie einen deutlichen konzentrationsabhängigen inhibitorischen Effekt bezüglich der CD62p-Expression unter Beweis stellen.

Der inhibitorische Effekt des Hydroxychloroquins bezüglich der CD62-Expression ist insgesamt stärker ausgeprägt als der inhibitorische Effekt des Chloroquins.

Selbst in der unstimulierten Testreihe zeigten Chloroquin, als auch Hydroxychloroquin einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die CD62p-Expression.

Vereinbar ist dies zum Beispiel bei der eigentlich unstimulierten Testreihe mit einer verminderten artifiziellen Thrombozytenaktivierung bei der Probenaufbereitung und beim Probentransport welches nicht gänzlich zu verhindern ist.

Die stärksten inhibitorischen Effekte bezüglich der CD62p-Expression lassen sich sowohl beim Chloroquin als auch beim Hydroxychloroquin bei der höchsten gewählten Konzentration von 2000µg/ml abgrenzen.

Hier ist zu erwähnen das dieser Wert die physiologische Vollblutkonzentration welche bei der täglichen Einnahme von 500mg Hydroxy/-chloroquin erreicht wird weit überschreitet. Die in der Literatur angegebenen Vollblutspiegel liegen hier bei ca. 32µg/ml für das Chloroquin, sowie bei 50µg/ml für das Hydroxychloroquin. [5,21,23]

Da die Angaben hier jedoch sehr stark variieren sollen diese Werte nur eine grobe Orientierung darstellen.

Die Konzentrationen von 25-2000µg/ml sind als Anlehnung an eine Studie gewählt worden bei der diese Hydroxychloroquinkonzentrationen in einem ähnlichen Versuchsaufbau zu einer deutlichen Reduktion der CD41- und CD61-Expression führte. [15]

An dieser Stelle ist auch zu berücksichtigen, dass sich sowohl Chloroquin als auch Hydroxychloroquin stark intrazellulär anreichern und die Inkubationszeit hier lediglich bei ca. 30 Minuten lag.

In der Literatur wurde beschrieben, dass bei der in vitro Inkubation 50-100 fache Plasmakonzentrationen nötig waren um ähnliche intrazelluläre Spiegel wie bei der therapeutischen Dosierung zu erzielen.

Die Plasmaspiegel liegen ca. um den Faktor 5-10 unter dem der Vollblutkonzentration.

CD41 ist das mit ca. 40.000-80.000 Molekülen am häufigsten auf der Thrombozytenoberfläche vertretene Adhäsionsmolekül und fungiert hauptsächlich als Rezeptor für Fibrinogen. [6, 19, 20, 35, 37, 77]

Er stellt einen thrombozytenspezifischen Rezeptor dar. Auf unstimulierten Thrombozyten befindet sich der Rezeptor überwiegend in einer inaktiven Konformation, in welcher er eine niedrige Affinität zu gebundenem Fibrin besitzt. [69, 75]

Die Aktivierung von Thrombozyten durch Agonisten (z.B. ADP; TRAP; Kollagen etc.) führt über eine von innen nach außen gerichtete Signaltrans-duktionskaskade (inside-out-signalling) zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, welche es ihm ermöglicht, gelöstes Fibrinogen, von Willebrand-Faktor sowie andere Liganden zu binden, wodurch die Thrombozyten-Aggregation bzw. Thrombozyten-Endothel Interaktionen/ Adhäsion ermöglicht werden. [54]

Für CD41 konnte bereits ein konzentratinsabhängiger Effekt von Hydroxychloroquin auf dessen Expression beobachtet werden, schon ab einer Konzentration von 25 µg/ml Hydroxychloroquin zeigte sich ein deutlich senkender Effekt auf die CD41-Expression . [15]

In dieser Studie kann hier jeweils nur bei sehr hohen Konzentrationen von Chlloroquin und Hydroxychloroquin eine signifikante Senkung der CD41 Exprssion beobachtet werden.

Die absolut gesehene stärkste Inhibition tritt für Chloroquin und Hydroxy-chloroquin in der ADP-stimulierten Reihe mit 2000µg/ml Antimalariamittel auf.

Auch wenn die Wirkung der Antimalariamittel auf die Expression dieses Liganden weniger eindrucksvoll ist als sie es innerhalb der CD62p Bestimmung war, ist sie doch deutlich, wenn hohe Konzentrationen verwendet werden.
Unter ähnlichen Versuchsbedingungen konnten NSAID´S wie Metamizol oder Diclofenac keine signifikante Änderung der CD41-Expression herbeiführen. [62]

Ein Hauptaugenmerk soll hier auf den membranständigen CD40-Liganden gerichtet werden, für den noch keine konzentrationsabhängigen Effekte der Antimalariamittel bezüglich dessen Expression beschrieben wurden. Außerdem ist der CD40L auch von besonderem klinischem Interesse, da gezeigt werden konnte, dass ein erhöhter Spiegel von löslichem CD40L mit einem höheren Infarktrisiko einhergeht.
Eine direkte Bindung von sCD40L an membranständiges CD40 auf der Thrombozytenoberfläche kann zu einer Autostimulation führen, welche mit erhöhter CD62p-Expression, α- und dense-Granula Freisetzung und den klassischen morphologischen Formänderungen einhergeht. [29]
Der Zell-Zell-Interaktion von CD40 und CD40L wird außerdem eine wichtige Rolle in entzündlichen Prozessen und in der Pathogenese der Arteriosklerose zugesprochen. [29]
Knockoutmäuse, denen der CD40L fehlte, zeigten z.B. eine Störung der Thrombus-Bildung und zeigten einen Schutz vor Atereosklerose, in welcher ja die Gerinnung und Inflammation einen besonderen Synergismus an den Tag legen. [37]
Der Nachweis einer erhöhter Expression des CD40L ist unter anderem bei Patienten mit prokoagulatorischen Zuständen, bei instabiler Angina pectoris und nach cerebrovaskulären Insulten gelungen. [38, 40]
Es gelang sogar schon eine Risikoabschätzung für myokardiale Infarzierungen bei asymptomatischen Patienten anhand der Höhe des löslichen CD40L. [25]
Bei Patienten mit primären Antiphospholipidsyndrom ist ebenfalls eine erhöhte Konzentration von löslichem CD40L im Vergleich mit gesunden Patienten beschrieben worden. Hier erwies es sich auch als fördernder Faktor für die

Pathogenese der Arteriosklerose. Ein Zusammenhang zu Thrombosen ist jedoch nicht nachgewiesen worden. [1]

Da wie gesagt noch kein Einfluss von Chloroquin und Hydroxychloroquin auf die CD40L-Expression auf der Thorombozytenoberfläche beschrieben wurde sind diese Ergebnisse von besonderem Interesse.

Insgesamt stellte sich das Hydroxychloroquin im Vergleich mit Chloroquin auch bei diesem Marker als deutlich stärkerer Inhibitor dar.

Hier konnte ähnlich wie beim CD41 nur bei sehr hohen Hydroxychloroquinkonzentrationen von 2000 μg/ml eine deutliche Senkung der CD40L-Expresseion, sowohl in der unstimulieren Testreihe als auch in den stimulierten Testreihen, nachgewiesen werden.

Hydroxychloroquin konnte sowohl in der unstimulierten als auch in den stimulierten Testreihen einen inhibitorischen Effekt auf die CD40L-Expression unter Beweis stellen. Es muss jedoch festgehalten werden das nicht bei allen Schritten eine Signifikanz zu verzeichnen ist.

Die einzelnen nichtsignifikanten Steigerungen, die zwischendurch besonders unter Chloroquin beobachtet werden können, sind wohl eher artifiziell bedingt, da Scherkräfte und Erschütterungen während der Präparation bereits ausreichen, um eine Thrombozytenaktivierung herbeizuführen.

Bei hochgewählten Hydroxychloroquinkonzentrationen von 2000 μg/ml konnte eine deutlich stärkere Inhibition der CD40L-Expression als beim Chloroqun in selbiger Konzentration beobachtet werden.

Interessanterweise ergab eine Studie, die die CD40L-Expression von Patienten mit akutem Koronarsyndrom verglich, bestehend aus eine Kohorte ohne Medikation und einer mit anti-anginöser Medikation bzw. ASS. zwischen beiden Gruppen keine Unterschiede im Grad der CD40L-Expression. [66] Dies ist insofern bemerkenswert, als das Chloroquin und Hydroxychloroquin ja hier, selbst ohne Stimulation, schon einen Einfluss auf die CD40L-Expression unter Beweis stellen konnten, wenngleich dieser Effekt bei der CD62p-Expression ausgeprägter war.

Dies ist besonders interessant, da gerade Patienten mit zerebralen Ischämien akuten Koronarsyndrom ACS und Hypercholesterinämie erhöhte CD40L-Level

aufwiesen. [25, 31, 70]

Da ASS, wie oben beschrieben, keinen Einfluss auf die CD40L-Expression zu haben scheint und der experimentelle Einsatz eines CD40L-Antikörpers ebenfalls fehlschlug, ist die Wirkung des Hydroxychloroquins besonders hervorzuheben. [36, 40, 57]

Es kann festgehalten werden, dass Hydroxychloroquin dem Chloroquin unstimuliert sowie ADP- und TRAP-stimuliert, überlegen ist.

Den größten inhibitorischen Effekt erreicht das Hydroxychloroquin wie schon zuvor unter TRAP-Stimulation.

Chloroquin zeigt ebenfalls parallel zu den Ergebnissen der CD62p-Expression seinen größten inhibitorischen Effekt unter ADP-Stimulation.

Wenn der Einfluss der Antimalariamittel hier auch nicht ganz so durchschlagend zu sein scheint, wie sich dieser in den Ergebnissen der CD62p Messung zuvor darstellte, muss doch erwähnt werden, dass gerade das Hydroxychloroquin in höheren Konzentrationen und besonders unter stimulatorischen Bedingungen einen deutlich inhibierenden Effekt besitzt.

Auch hier ist bezüglich eines möglichen klinischen Nutzens die Tatsache zu erwähnen, dass es gerade bei Patienten mit thrombembolischen oder arteriosklerotischen Komplikationen, wie zuvor schon erwähnt, oft Thrombozyten mit erhöhtem Aktivitätsniveau zu finden sind.

Auch das CD40L-Epitop ist schon bei prokoagulatorischen Zuständen, instabiler Angina und bei cerebrovaskulären Insulten, in erhöhter Expression auf der Thrombozytenoberfläche von Patienten nachgewiesen worden. [38, 40]

Wichtig ist, dass dem CD40L, ähnlich wie dem CD62p, eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose zukommt. Hier könnte man evtl. einen synergistischen Effekt von Hydroxychloroquin, welches ja die Expression bzw. Freisetzung beider Glykoproteine inhibiert, erwarten. [55]

Insgesamt ist bei allen Markern zu beobachten, dass ab einer Wirkstoffkonzentration von 2000µg/ml bei allen Oberflächenmarker ein deutlicher Abfall der Expression auf der Thrombozytenoberfläche zu verzeichenen ist, dieser ist besonders stark beim Zusatz von Hydroxychloroquin ausgeprägt.

Gegen avitale Thromboyten durch die hohe Wirkstoffkonzentration spricht hier jedoch das unter stimulatorischen Bedingungen gegenüber der unstimulierten Kontrolle eine geringradige, jedoch konstant höhere Expression der Marker bei 2000µg/ml Hydroxychloroquinzusatz besteht.
Die Expressionsabnahme bei steigender Wirkstoffkonzentration in den unstimulierten Ansätzen ist am ehesten durch eine Inhibition der artifiziellen Thrombozytenaktivierung während der Probenaufbereitung und während des Probentransportes bedingt.

5.2.) Vergleich APS-Patientin mit Normalkollektiv

Unter den Probanden befand sich auch eine Patientin mit einem Antiphospholipidsyndrom.
Die Oberflächenepitopendichte der Marker CD62p, CD40L sowie CD41 wurde hier ohne Stimulation sowie unter Stimulation mit denen des „gesunden“ Kontrollkollektives verglichen. Der Vergleich erfolgte jeweils unter Zugabe gleicher Antimalariamittelkonzenration.
Hydroxychloroquin konnte in Studien bereits, in vitro, seine Wirkung auf mittels TRAP-6 und antiphospholipid-Antikörpern stimulierten Thrombozyten unter Beweis stellen, wobei sich eine deutliche Reduktionen der Epitope CD41 sowie CD61 zeigten. [15, 33]
Wie es sich jedoch genau bei verschieden stimulierten Thrombozyten bzw. unstimulierten Thrombozyten, auch im Vergleich mit Chloroquin verhält, soll hier evaluiert werden.
Wie den Diagrammen (Abbildung 4.1.7, 4.2.7, 4.5.7, 4.6.7, 4.9.7, 4.10.7) in der Statistik zu entnehmen ist, zeigen sich, im Vergleich zum Kontrollkollektiv, bezüglich der Mediane der CD62p- und CD40L-Expressionen unter Chloroquinzusatz sowie unter Hydroxychloroquinzusatz ohne Stimulantien, keine durchgreifende Expressionsunterschiede. Bezüglich der CD41-Expression ist zu sagen, dass die Expression ohne Stimulation sowohl für

Hydroxychloroquin als auch für Chloroquin über derjenigen des Kontrollkollektives liegt.

Unter Stimulanzienzugabe (ADP und TRAP) zeigen die Thrombozyten der APS-Patientin für alle Oberflächenmarker unter Chloroquin als auch unter Hydroxychloroquinzusatz eine geringere Expression als die Kontrollgruppe. Die einzige Ausnahme zeichnet sich hier, wie schon im unstimulierten Vergleich für die CD41 Expression unter Hydroychloroquinzusatz ab. Beim Zusatz von 2000µg/ml zeigt sich von der unstimulierten Reihe über die ADP- und TRAP-Stimulation eine deutlich höhere Markerexpression bei der APS-Patientin. Da diese Messwerte jedoch selbst innerhalb der mit Hydroxychloroquin behandelten Thrombozyten aus dem Rahmen fallen muss hier zum Beispiel an eine vermehrte artifizielle Aktivierung in diesem Ansatz gedacht werden.

Eine Differenz der CD62p-Grundexpression bei APS-Patienten und gesunden Patienten wird kontrovers diskutiert. Eine Studie zeigte eine signifikant erhöhte CD62p-Expression bei APS-Patienten.

Eine andere Studie zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Expression von membranständigem CD62p, wohl aber ein erhöhtes lösliches CD62p. [26]

In den hiesigen Vergleichen konnte, wider allen Erwartungen, vorwiegend eine verminderte CD62p-Expression bei der APS-Patientin beobachtet werden.

Es ist jedoch anzumerken, dass eine APS-Patientin nicht als repräsentativ anzusehen ist. Die Patientin stand außerdem unter ASS 100 Therapie.

Es ist jedoch interessant, dass trotz der Inhibition von Thrombozyten durch ASS eine zusätzliche deutliche Verminderung der CD62p-Expression verzeichnet werden konnte.

Wie schon erwähnt liegen die Werte der CD41-Expression unter Stimulation, abgesehen von der Ausnahme unter 2000µg/ml Hydroxychloroquinzusatz, ähnlich wie beim CD62p unter denen des Kontrollkollektives. Dies wird in der graphischen Darstellung (Abbildung 4.9.7 und 4.10.7) sowohl unter ADP als auch unter TRAP-Stimulation deutlich.

Dies wurde eigentlich nicht erwartet, da zumindest für die Stimulation mit TRAP in Kombination mit antiphospholipid-Antikörpern, eine höhere CD41 Expression zu erwarten wäre als unter alleiniger TRAP-Stimulation. [15]
Natürlich führen auch antiphospholipid-Antikörper alleine schon zu einer erhöhten Expression des CD41-Epitopes, was die höhere Expression bei der APS-Patientin ohne Zugabe von Stimulantien erklären könnte. [15]
Der CD40 Ligand zeigt ebenfalls unter Stimulation im Vergleich zum Kollektiv, eine deutlich stärkere Reduktion in der Thrombozytenoberflächendichte, ähnlich wie beim CD41 und beim CD62p.
(Abbildung 4.5.7 und 4.6.7)
Insgesamt ist zu anzumerken, dass es sich hier ganz ähnlich wie zuvor beim CD62p verhält, nämlich so, dass ohne Stimulation eine relativ vergleichbare Epitopendichte auf der Thrombozytenoberfläche von Kollektiv und APS-Patientin herrschen.
Unter Stimulation verschieben sich jedoch auch hier alle Werte zu einer stärkeren Reduktion der CD40L-Expression zugunsten der APS-Patientin.
Zum einen kann das ein Zufall sein, da Werte einer APS-Patientin nicht repräsentativ sein können.
Zum anderen herrschen auch große interindividuelle Unterschiede in der Epitopendichte von Thrombozyten.
Allerdings würde man in diesem Fall schon einen Unterschied in der unstimulierten Reihe erwarten, wobei wiederum die Möglichkeit einer erheblichen intravesikulären Differenz der CD40L-Menge unberücksichtig bleibt.
Bemerkenswerterweise ist erst unter stimulatorischen Bedingungen ein ausgeprägter Unterschied eruierbar.
Wenn man das CD40L-Epitop als reinen Aktivierungsmarker betrachtet bzw. Ergebnisse von anderen aktivierunsabhängigen Oberflächenmarkern miteinbezieht, wäre bei einem manifesten APS wie auch bei den anderen beiden diskutierten Markern eher mit einer erhöhten Expression im Vergleich zu Normalprobanden zu rechnen.

Andererseits steht die Patientin unter ASS-Therapie, welche einen möglichen additiven inhibitorischen Effekt ausübt, obwohl in einer Quelle ein Effekt von ASS bezüglich der CD40L-Expression dementiert wurde. [40]
Da die APS-Patientin wie schon erwähnt unter ASS-Medikation stand ist hier die wider Erwarten geringere Thrombozytenakivierung als im Kontrollkollektiv möglicherweise durch einen additiven Effekt beider Medikamente bedingt.
Wie schon erwähnt kann eine zweite Möglichkeit in der interindividuellen Differenz der Oberflächenmarkerexpression auf Thrombozyten liegen. Hiergegen sprechen jedoch die geringeren Expressionsunterschiede in den unstimulierten Testreihen aller drei gemessenen Oberflächenmarker.
Interessanterweise gelingt es hier jedoch nachzuweisen das Hydroxychloroquin tatsächlich eine additive Thrombozyteninhibition bei Patienten welche bereits unter ASS-Medikation stehen bewirken kann.
Hier ist zum Beispiel ein möglicher additiver Effekt der postulierten Inhibition der Phospholipase A2 durch Hydroxychloroquin beziehungsweise Chloroquin und der Inhibition der Cyclooxygenase 2 durch ASS zu diskutieren.
Beide Mechanismen führen letztlich zu einer verminderten Thromboxan A2 Synthese. Thromboxan A2 wiederum spielt eine essentielle Rolle in der Thrombozytenaktivierung und derer irreversieblen Aggregation. (siehe auch Abbildung 1.3). [28,39]
Ebenfalls ist bereits von Pierangeli et al. unter Hydroxychloroquin eine dosisabhängige Senkung der CD61 sowie CD41a-Epitopendichte auf Thrombozyten nachgewiesen worden, welche in Gegenwart von IgG-APS mittels TRAP stimuliert wurden. [15]
Das Hydroxychloroquin liefert hier etwas andere Ergebnisse (Abbildung 4.2.7). Hier sind zwischen APS-Patientin und Kollektiv ohne Stimulation nur sehr geringe Differenzen vorhanden.
Auch nimmt der Betrag der Differenzen in der CD62p-Expression über die ADP-Stimulation bis zur TRAP-Stimulation zu. Nur bei der Hydroxychloroquinkonzentration von 2000µg/ml zeigt sich unter allen stimulatorischen Bedingungen ein sehr geringer Unterschied zwischen APS Patientin und Kollektiv.

Hydroxychloroquin konnte bei Anwesenheit von APS-IgG, bereits in Experimenten und klinischen Studien seine inhibitorische Wirkung auf die Thrombusgröße und auf thrombembolische Komplikationen zeigen. [14]

5.3.) Bestimmung der Epitopenexpression unter Zusatz verschiedener Simvastatinkonzentrationen.

Die Messung der CD62p-Epitopendichte ergab weder in der unstimulierten noch in der ADP- oder TRAP-stimulierten Testreihe einen signifikanten Unterschied in irgendeine Richtung. (Abbildung 4.4.1-3)
Da, wie schon in der Einleitung und Fragestellung erwähnt, konnten Statine in vivo schon öfters ihre inhibitorische Wirkung auf Thrombozyten offenbaren, jedoch ist dies in vitro noch nicht gelungen. [15]
Dies ist auch hier der Fall, da in keinem Falle eine Beobachtung gemacht werden konnte, welche sich der statistischen Zufallswahrscheinlichkeit entzog.
Lediglich für Endothelien egaben sich in Studien auch in vitro Effekte, welche als protektiv im Bezug auf thrombembolische Kompikationen gewertet werden können.
Dazu zählen unter anderem eine Reduktion der Tissue Factor-Expression welche auf indirektem Weg zu einer verminderten Thrombozytenaktivierung führen kann, sowie eine Reduktion der CD40/CD40L-Expression auf Endotheloberfläche sowie auch zu einer vermehrten NO-Synthese des Endothels. [8] Die verschiedenen in der Einleitung erwähnten möglichen Beeinflussungen der Thrombozytenaktivität scheinen also wirklich nur in vivo zu greifen, was hier die Grenzen der Epitopendichtebestimmung in vitro bezüglich der Übertragung auf die Klinik verdeutlicht.
Im Hinblick auf die beiden anderen gemessenen Epitope, CD40L und CD41, verhält es sich ebenso wie bei der CD62p-Expression, da auch hier nirgendwo eine Signifikanz vorhanden ist. (Abbildung 4.8.1-3; 4.12.1-3)
Da hier keine erwähnenswerte Besonderheit zu beobachten ist, wird hier von einer genaueren Diskussion abgesehen.

5.4) Resümee

Bisher finden Chloroquin und Hydroxychloroquin hauptsächlich Anwendung in der Malariatherapie sowie in der Behandlung der rheumathoiden Arthritis und des diskoiden/systemischen Lupus erythematodes, wobei Hydroxychloroquin das Chloroquin weitgehend abgelöst hat (außer bei Personen, die in Malaria Endemiegebiete reisen). [61]

Chloroquin und Hydroxychloroquin haben jedoch beide, in vitro und in vivo gezeigt, dass sie einen signifikanten, senkenden Effekt bezüglich der Thrombozytenaggregation bzw. Thrombozytenaktivierung besitzen. [14, 15, 52]

Mehrere Berichte weisen darauf hin, dass Patienten, die sich in einem hyperkoaglem Zustand befinden, unter der Einnahme von Hydroxychloroquin weniger zu Thrombosen neigen.

Dieses beinhalten auch mehrere retrospektive Studien, die eine Assoziation zwischen dem Einsatz von Hydroxychloroquin bei SLE-Patienten und einer Reduktion von thrombembolischen Komplikationen beinhalten. [13, 53] APS-Patienten und postoperative chirurgische Patienten konnten ebenfalls von der Hydroxychloroquineinnahme profitieren. [10, 15]

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, das sowohl Chloroquin, als auch Hydroxychloroquin einen deutlichen dosisabhängigen Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung haben.

Momentan ist in der Therapie des APS Warfarin/ Cumarin das Mittel der Wahl in der Langzeitantikoagulation. Hier könnte z.B. Hydroxychloroquin eine relativ sichere Alternative darstellen, welche nahezu keine Blutungskomplikationen aufweist. [10, 14]

Hydroxychloroquin, welches Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten hemmt, wobei es erstere stärker beeinflusst, könnte unter anderem ASS ergänzen, welches seine Hauptwirkung in der Inhibition der Thrombozytenaggregation besitzt.

Hydroxychloroquin könnte z.B. seine Wirkung in traumatischen Situationen unter Beweis stellen, in denen viel subendotheliale Matrix freigelegt wird, wohingegen ASS eher in Situationen in denen Stase das Hauptproblem darstellt von Nutzen sein sollte, wie z.B. Immobilisation nach Operationen.

Eine weitere Indikation für den Einsatz von Hydroxychloroquin könnte der Einsatz bei Patienten mit Aspirinallergie oder gastrointestinalen Blutungen unter ASS sein. [10]

Chloroquin zeigte, dass es in der Lage ist, die thrombinabhängige Konversion von Fibrinogen zu Fibrin zu inhibieren. Des Weiteren zeigte Chloroquin, dass es in vitro in Konzentrationen von 1000µmol/ml eine nahezu komplette Inhibition der Thrombozytenaggregation (turbidometrische Messung) und in der Konzentration von 100µmol/ml eine fast vollständige Inhibition der Thromboxan A2 Synthese(RIA) bewirkt. [33]

Eine deutliche Inhibition der Thrombozytenaggregation von ADP, Thrombin bzw. von adrenalinaktivierten Thrombozyten konnte ebenfalls nachgewiesen werden. [32, 50]

Insbesondere ist hier anzumerken, dass sich in dieser Studie auch ein konzentrationsabhängiger Effekt beider Antimalariamittel auf das Verhalten der CD40L-Expression zeigt. Insbesondere bei höheren Hydroxychloroquin-konzentrationen ist eine deutliche Reduktion der CD40L-Expression zu beobachten. Dies ist u.a. von klinischem Interesse, da gezeigt werden konnte, dass ein erhöhter Spiegel von löslichen CD40L mit einem höheren Infarktrisiko einhergeht. Ebenfalls ist hier anzumerken, dass Acetylsalicylsäure in einer Studie nicht in der Lage war die CD40L-Expression bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom signifikant zu beeinflussen. [40]

Dies ist insbesondere interessant, da der CD40L auch eine wichtige Rolle bei Immunreaktionen und daher auch innerhalb entzündlicher Prozesse wie der Arteriosklerose einnimmt. [29]

Die Annahme, dass dem CD40L eine wesentliche Rolle in der Arterioskleroseentstehung zukommt, wird u.a. dadurch erhärtet, dass CD40L-Knockoutmäuse einen gewissen Schutz vor einer Arterioskleroseentstehung zeigten. [1] So könnte Hydroxychloroquin eventuell auch einen Einfluss auf die

Arteriosklerose entstehung haben, was natürlich noch in in vivo Studien abgeklärt werden müsste.
Einige Autoren zeigten bereits einen anti-thrombozytären Effekt von Statinen in vivo, welcher mittels durchflusszytometrischer Detektion von membranständigen Glykoproteinen, im speziellen CD62P und CD40L, demonstriert wurde.
Eine Reduktion von löslichem CD40L in hypercholesterinämischen Patienten in Assoziation mit erniedrigten Spiegeln von löslichem CD62P mit Thrombozyten, als primären Ursprung, wurde ebenso beobachtet.
In klinischen Studien zeigten bereits 20mg Simvastatin täglich eine deutliche Senkung der CD62P-Expression. [58]
In vivo konnten bei vielen Patienten in mehreren Studien zahlreiche positive Effekte von Statinen bezüglich thrombembolischer Komplikationen nachgewiesen werden.
In diesem in vitro Versuch konnte keine signifikante Beeinflussung der Thrombozytenaktivität beobachtet werden. Dies mag vor allem daran liegen, dass die postulierten Wirkmechanismen hauptsächlich über das Gefäßendothel ablaufen, welches bei diesem Versuchsaufbau nicht berücksichtigt wurde.

Zusammenfassend kann hier festgehalten werden:

1) Sowohl Chloroquin, als auch Hydroxychloroquin haben einen Einfluss auf die Expression von CD41; CD40L und CD62P **in vitro.**

2) Bis auf wenige Ausnahmen, sind deutlich konzentrationsabhängige Effekte der beiden Antimalariamittel auf die CD41; CD62p und auch auf die CD40L Expression zu beobachten.

3) Konzentrationsabhängige Effekte von Chloroquin und Hydroxychloroquin sind auch bei der APS-Patientin zu beobachten!

4) Bei hohen Chloroquinkonzentrationen, scheinen diese, unter ADP-Stimulation, eine etwas stärkere relative inhibitorische Wirkung zu haben als unter TRAP-Stimlation.

5) Im direkten Vergleich von Chloroquin und Hydroxychloroquin in jeweils korrespondierender Konzentration, zeigt sich das Hydroxychloroquin durchweg effektiver bezüglich der Senkung Expression von CD41, CD40L und CD62P, ist.

6) In vitro kann kein Effekt von Simvastatin auf die CD41, CD40L und CD62P-Expression nachgewiesen werden.

6) Zusammenfassung

Eine gesteigerte Aktivität von Thrombozyten kann bei einer Vielzahl pathologischer Entitäten beobachtet werden, wodurch es in der Klinik schließlich zu thrombembolischen Komplikationen kommen kann. Dies beinhaltet z.B. Patienten mit Antiphospholipidsyndrom, SLE- Patienten oder postoperative Patienten, um nur einige Beispiele zu nennen. Eine Senkung der Rate solcher Komplikationen ist für die beiden Antimalariamittel Chloroquin und Hydroxychloroquin, sowie in vivo für HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine) beschrieben worden.

Diese Studie nutzt die Expression der Thrombozytenoberflächenmarker CD62p, CD40L und CD41, die bei erhöhter Expression auf der Thrombozytenoberfläche als Parameter für eine etwaige Thrombozytenaktivierung angesehen werden können.

Die Expression dieser Marker wurde mittels Durchflusszytometrie quantitativ bestimmt.

Da sich die Anzahl der auf der Thrombozytenoberfläche gemessenen Marker äquivalent zur Thrombozytenaktivität verhält, wurde die gemessene Expression als Indikator für die Thrombozytenaktivierung genutzt.

Der Versuch beinhaltete jeweils eine unstimulierte Testreihe sowie eine mit ADP und eine mit TRAP-6 stimulierte Reihe. TRAP-6 und ADP sind in der Lage Thrombozyten zu aktivieren und erhöhen die gemessene Expression der genannten Oberflächenmarker.

Für Hydroxychloroquin ist bereits eine konzentrationsabhängige Reduktion der CD41 und der CD62p-Expression bei unstimulierten und TRAP-stimulierten Thrombozyten beschrieben worden.

Hier sollten folgende Punkte geklärt werden:

1. Wie können Chloroquin und Hydroxychloroquin den Thrombozytenphänotyp und Aktivierungszustand beeinflussen?
2. Wie stark unterscheiden sich Chloroquin und Hydroxychloroquin in ihrer Wirksamkeit?

3. Können die beiden Antimalariamittel auch die CD40L-Expression modulieren?

Die Expression des jeweilig gemessenen Markers wurde im unstimulierten und stimulierten Zustand unter Zugabe verschiedener Medikamentenkonzentrationen gemessen um somit deren konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung zu untersuchen.

Für die CD62p-Expression, bei der eine Reduktion durch Hydroxychloroquin bereits beschrieben wurde, erwies sich Hydroxychloroquin deutlich wirksamer als Chloroquin. Der maximale Rückgang des CD62p-Epitopes lag unter Stimulation bei > 90% für Hydroxychloroquin.

Bei der CD40L-Expression, für die noch keine Expressionsmodulation durch die Antimalariamedikamente vorbeschrieben ist, konnte unter hohen Antimalariamittelkonzentrationen unter allen stimulatorischen Bedingungen eine deutliche Reduktion der Epitopendichte gemessen werden. Auch hier erwies sich Hydroxychloroquin als das wirksamere Mittel mit einer maximalen CD40L Reduktion von mehr als 50 % unter Stimulation.

Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass die beiden Antimalariamittel, vor allem Hydroxychloroquin in adäquater Konzentration, die CD40L-Oberflächenkonzentration wirksam beeinflussen kann.

Bei der Bestimmung der CD41-Expression führen in der Regel erst höhere Wirkstoffkonzentrationen zu deutlichen Effekten. Die maximale CD41-Reduktion liegt bei 14,8% für Chloroquin und bei 60,4% für Hydroxychloroquin.

Beim Vergleich der APS-Patientin mit dem restlichen Kollektiv konnte erst unter Stimulantienzusatz, ein signifikanter Abfall der Epitopdichte nachgewiesen werden.

Ein möglicher beeinflussender Faktor kann die ASS-Medikation der Patientin sein.

Im zweiten Teil des Experiments ist eine Testreihe in analoger Weise mit Simvastatin durchgeführt worden. Signifikante Verminderungen der genannten Epitope waren hier jedoch nicht zu verzeichnen.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die in vivo beobachtete positive Wirkung der Statine auf thromboembolische Ereignisse nicht primär auf einer Modulation der Thrombozytenoberflächenantigene beruht.

Basierend auf diesen in vitro Ergebnissen kann diskutiert werden, ob z.B. Hydroxychloroquin als Ergänzung zu ASS oder auch als Ersatz bei Patienten mit gastrointestinalen Blutungen eingesetzt werden kann.

Es könnte z.B. zur postoperativen Thrombembolieprophylaxe oder auch zur Langzeitantikoagulation von Patienten mit Blutungskomplikationen unter Phenprocoumontherapie als relativ sichere Alternative eingesetzt werden.

Diesbezüglich wäre natürlich noch ein direkter Vergleich mit klassischen Antikoagulantien und Thrombozytenaggregationshemmern wünschenswert.

7) Literaturverzeichnis

1 Aleksandrova EN, Novikov AA, Popkova TV, Reshetniak TM, Novikova DS, Kliukvina NG, IL`ina, Mach ES, Volkov AV, Nasonov EL.
Solouble CD40 ligand in systemic kupus erythematosus and antiphosholipid Syndrome
Ter Arkh. 2006; 78(6): 35-39

2 Aurigemma Cristina, Fattorossi Andrea, Sestito Alfonso, Sguelia Gregory A., Farnetti Sara, Buzonetti Alexia, Infusino Fabio, Landolfi Raffaele, Scanbia Giovanni, Crea Filippo, Lanza Gaetano A.
Relationship between changes in platelet reactivity and changees in platelet receptor Expression induced by physical exercise.
Thrombosis Research 2007:120; 901-909

3 Bihour C, Durrie-Jais C, Besse P, Nurden P, Nurden AT.
Flow cytometriy reveals activated GP IIb-IIIa complexes on platelets undergoing thrombolytic therapy after acute myocardial infarction
Blood Coagulation and Fibrinolysis 1995; 6: 395-410

4 Blann Andrew D., Nadar Sunil K., Lip Gregory Y.H.
The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease
European Heart Journal 2003; 24: 2166-79

5 Brorson O, Brorson SH.
An in vitro study of the susceptibility of mobile and cystic forms of Borrelia burgdorferi to hydroxychloroquine
Int Microbiol/ 2002 Mar; 5(1): 25-31

6 Calvete Juan J.
Platelet Integrin GPIIb/IIIa: Structure-Function Correlations. An Update and Lessons from Other Integrins

Update to Proc Soc Exp Biol Med 1995; 208: 346-60

7 Celi Alessandro, Pellegrini Giuliana, Lorenzet Robert, De Blasi Antonio, Ready Neal, Furie Barbara C., Furie Bruce.
P-selectin induces the expression of tissue Factor on monocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994; 91; 876-71

8 Chello Massimo M.D., Spadaccio Cristiano M.D., Anselmi Amedeo M.D., Patti Giuseppe M.D., Lusini Mario M.D., Di Sciascio Germano M.D., Covino Elvio M.D.
Simvastatin Reduces CD40 Expression in an Experimental Model of Early Arterialization of Saphenous Vein Graft
Journal of Surgical Research 2006;136: 302-308

9 Choudhury Anirban MBBS, Freestone Bethan MD, Patel Jeetesh PhD, Lip Gregory Y. H. MD
Relationship of Soluble CD40 Ligand to Vascular Endothelial Growth Factor, Angiopoietins, and Tissue Factor in Atrial Fibrillation.
A Link Among Platelet Activation, Angiogenesis, and Thrombosis?
Chest 2007; December 132(6): 1913-1919

10 Chrisman Donald O. M.D., Snook George A. M.D., Wilson Thomas C. M.D., Short John Y. M.D.
Prevention of Venous Thromboembolism by Administration Of Hydroxychloroquine
The Journal of Bone and Joint Surgery 1976; 58-A (7): 918-20

11 Coleman Robert W, Marder Victor J., Clowes Alexander W., George James N., Goldhaber Samuel Z.
Hemostasis and Thrombosis 5th Edition
Chapter 26: 463-81; Chapter 39: 617-29; Chapter 45: 691-706

12 Danese S, Sans M, Fiocchi C
The CD40/CD40L costimulatory pathway in Inflammatory bowel disease
Gut 2004; 53: 1035-43

13 Davi Giovanni, Ferroni Patrizia
CD40-CD40L interactions in platelet activation
Thromb Haemost 2005; 93; 1011-2

14 Edwards Michael H. MD, Pierangeli Silvia PhD, Wei Liu Xiao MD, Baker John H. PhD, Anderson Gary PhD, Harris E. Nigel MD.
Hydroxychloroquine Reverses Thrombogenic Properties of Antiphospholipid Antibodies in Mice
Circulation 1997; 96: 4380-4

15 Espinola Ricardo G., Pierangeli Silvia S., Ghara Azzudin E., Harris E. Nigel
Hydroxychloroquin Reverses Platelet Activation Induced by Human IgG Anti-Phospholipid Antibodies
Thromb Haemost 2002; 87: 518-22

16 Ferrara D.E., Swerlick R., Kasper K., Meroni P.L., Vega-Ostertag M.E., Harriss E.N., Pierangeli S.S.
Fluvastatin inhibits up-regulation of tissue factor expression by antiphospholipid antibodies on endothelial cells
Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2, Recceived 3 March 2004: 1558-1563

17 Forastero Martinuzzo M, Carreras LO, Maclouf J.
Anti-beta 2 glycoprotein I antibodies and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome association with increases secretion of plateled derived thromboxane metabolites
Thromb Haemost 1998; 79: 42-5

18 Freund Prof. Dr. med. Mathias.
Vorlesung Hämostasiologie II Vaskuläre hämorrhagische Diarhesen, Immunothrombopenien, TTP, HUS, Antiphospholipid-Syndrom, Thrombophilie, Antikoagulation
Hämatologie und Onkologie Universität Rostock 17.4.2002

19 Fullard John F
The Role of the Platelet Glycoprotein IIb/IIIa in Thrombosis and Haemostasis.
Current Pharmaceutical Design 2004; 10: 1567-1576

20 Gemmel Cynthia H., Sefton Michael V., Yeo Erik L.
Platelet-derived Microparticle Formation Involves Glycoprotein IIb-IIIa.
The Journal of Biological Chemestry 1993; 20; 14586-89

21 Goodmann & Gilman`s
Hydroxychloroquine-Chloroquine, Pharmacokinetic Data
The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th edition (1996)

22 Grodzińska Lilia, Starzyk Dorota, Bieroń Krzysztof, Goszcz Aleksandra, Korbut Ryszard
Simvastatin Effects in Normo- and Hypercholesterolaemic Patients with Peripheral Arterial Occlusive Disease: A Pilot Study
Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2005; 96: 413-9

23 Groot de Philip G., Derksen Ronald H.W.M.
Protein C Pathway, Anti-Phospholipid Antibodies and Thrombosis
Lupus 1994; 3: 229-33

24 Hanly John G.
Antiphospholipid syndrome: an overview
JAMC 24. Juni 2003; 168(13): 1675-82

25 Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher Am, Simoons ML.
Soluble CD40 ligand in acute coronary syndrome
N Engl J Med. 2003; 348: 1104-11

26 Henn V, Slupsky J R , Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczek R A.
CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells
Nature 1998; 391 (5): 591-4

27 Henn V, Steinbach S, Büchner K, Presek P, Kroczek R A.
The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40
Blood 2001; 98: 1047-54

28 Huang, Simon H.K.
Rheumatology: 7. Basics of therapy
Canadian Medical Association Journal 2000; 163(4):417-23

29 Inwald David P, McDowall Alison, Peters Mark J., Callard Robin E., Klein Nigel J.
CD40 Is Constitutively Expressed on Platelets and Provides a Novel Mechanism for Platelet Activation
Circ Res. 2003; 92: 1041-48

30 Isley William L., Park Youngsoon, Harris William S.
The effect of high dose Simvastatin on, platelet size in patients with, type 2 Diabetes mellitus
Platelets, August 2006; 17(5): 292-295

31 Jae-Kwan Cha, Jeong Min-Ho, Jang Ji-Yeon, Bae Hae-Rahn, Lim Yeong-Jin, Kim Junf Sun, Kim Sang-Ho, Kim Jae Woo
Serial Measurement of Surface Expressions of CD63, P-Selctin and CD40 Ligand On Platelets in Atherosclerotic Ischemic Stroke
Cerebrovasc Dis 2003; 16:376-382

32 Jančinová Viera, Nosál´ Rado, Petriková Margita
On the inhibitory Effect of Chloroquine on Blood Platelet Aggregation
Thrombosis Research 1994; 74 (5): 495-504

33 Jančinová V., Májeková M., Nosál´ R., Petriková M.
Inhibition of blood platet functions by cationic amphiphilic drugs in relation to their physico-chemical properties
Blood Coagulation and Fibrinolysis 1996; 7: 191-3

34 Joseph JE, Donohoe S, Harrison P, Mackie IJ, Machin SJ
Platelet activation and turnover in primary antiphospholipid syndrome
Lupus 1998; 7: 333-40

35 Jurasz Paul, Stewart Michael W., Radomski Anna, Khadour Fadi, Duszyk Marek, Radomski Marek W.
Role of von Willebrand factor in tumor cell-induced platelet Aggregation: differential regulation by NO and prostacyclin.
British Journal of Pharmacology 2001; 134; 1104-12

36 Kawai Tatsuo, Andrews David, Colvin Robert B., Sachs David H., Cosimi A. Benedict
Thrombolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand
Nature Medicine 2000; 6 (2): 114

37 Kickler Thomas S. MD
Platelet biology- an overview
Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine 2006:2; 79-85

38 Kurabayashi H, Tamuira J, Naruse T, Kubota K.
Possible existence of platelet activation before the onset of cerebral infarction
Atherosclerosis 2000; 153: 203-7

39 Kwon JS, JT Snook, GM Wardlaw and DH Hwang
Effects of diets high in saturated fatty acids, canola oil, or safflower oil on platelet function, thromboxane B2 formation, and fatty acid composition of platelet phospholipids
American Journal of Clinical Nutrition, Vol 54, 351-358, Copyright 1991 by the American Society for Clinical Nutrition, Inc

40 Lee Y, Lee WH, Lee SC, Ahn KJ, Choi YH, Park SW, Seo JD, Park JE.
CD40L activation in circulating platelets in patients with acute coronary syndrome
Cardiology 1999; 92: 11-16

41 Liani M, Salvati F, Tresca E, Di Paolo G, Vitacolonna L, Golato M, Velussi C.
Ateriovenous fistula obstruction and expression of platelet receptors for von Wllebrand factor and for fibrinogen in hemodialysis patients
Int J Artif Organs 1996; 19: 451-4

42 López José A, Kearon Clive, Lee Agnes Y. Y.
Deep Venous Thrombosis
Hematology 2004: 239-256

43 Ludwig RJ, Schön MP, Boehncke WH
P-selectin: a common therapeutic target for cardiovascular disorders, inflammation and tumour metastasis.
Expert Opin Ther Targets 2007 Aug; 11(8): 1103-17

44 Harigai Masayoshi
Invilvement of CD40-CD154 interaction in immunopathogenesis of collagen diseases and its application to a novel therapeutic strategy
Japanese Journal of Clinical Immunology 2004; 27(6): 379-388

45 Merhi Y, Provost P, Chauvet P, Theoret JF, Phillips ML, Latour JG.
Selectin blockade reduces neutrophil interaction with platelets at the site of deep arterial injury by angioplasty in pigs
Aterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19 (2): 327-7

46 Michelson Alan D., Barnard Marc R., Hechtman Herbert B., MacGregor Hollace, Connolly Raymond J., Loscalzo Joseph, Valeri Robert
In vivo tracking of platelets: Circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to Circulate and function.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996; 93; 11877-82

47 Miller Donald R., Khalil Shoukry K.W., Nygard Gloria A.
Steady-State Pharmacokinetics of Hydroxychloroquine in Rheumatoid Arthritis Patients DICP,
The Annals of Pharmacotherapy 1991; 25: 1302-5

48 Mirabet M, Barrabés JA, Quiroga A, Garcia-Dorado D
Platelet pro-aggregatory effects of CD40L monoclonal antibody
Molecular immunology 2008 Feb.; 45(4): 937-944

49 Nojima Junzo, Suehisa Etsuji, Kuratsune Hiroko, Machii Takashi, Koike Tako, Kitani Teruo, Kanakura Yuzuru, Amino Nobuyuki

Platelet Activation Induced by Combined Effects of Anticardiolipin and Lupus Erythematosus
Thromb Haemost 1999; 81:436-41

50 Nosál´ Rado, Jančinová Viera, Danihelová Edita
Chloroquin: A Multipotent Inhibitor of Human Platelets in Vitro
Thrombosis Research 2000; 98: 411-21

51 Nosal R.
Antiplatelet and antileucocyte effects of cardiovascular, immunmodulatory and Chemotherapeutic drugs.
Cardiovas Hematol Agents Med Chem 2006 Jul; 4(3): 237-261

52 Nosál´ Rado, Jančinová Viera, Petriková Margita
Chloroquin inhibits stimulated platelets at the arachodonic acid pathway
Thrombosis Research 1995; 77 (6): 531-42

53 Ozsavci Derya, Yardimici Turay, Demirel Gulderen Yanikkaya, Demiralp Emel, Uras Fikriye, Önder Ekin
Flow cytometric assay of platelet glycoprotein receptor numbers in hyper-Cholesterolemia.
Platelets 2002; 13; No. 4; 223-9

54 Phillips David R., Charo Israel F., Parise Leslie V., Fitzgerald Laurence A.
The Platelet Membrane Glycoprotein IIb-IIIa Complex.
Blood 1988; 71; 831-43

55 Phipps R. P.
Atherosclerosis: The emerging role of inflammation and the CD40-CD40 ligand system
PNAS 2000; 97: 6930-2

56 Pierangeli Silvia S., Chen Pojen P., González Emilio B.
Antiphospholipid antibodies and the antiphospholipid syndrome: an update on Treatment
Current Opinion in Hematology 2006; 13: 366-375

57 Pierangeli SS, Vega-Ostertag M, Harris EN.
Intracellular signaling triggered by antiphospholipid antibodies in platelets and Endothelial cells: a pathway to targeted therapies
Thrombosis Research 2004; 114(5-6): 467-476

58 Pucetti Luca, Pasqui Anna Laura, Auteri Alberto, Bruni Fulvio
Mechanisms for Antiplatelet Action of Statins
Current Drug Targets-Cardiovascular & Haematological Disorders 2005; 5: 121-6

59 Ramanathan V. D., Sengupta U.
In vitro inhibition of the activation of the human complement and coagulation systems by chlooquine
Int. J. Immunopharmac. 1985; 5: 769-73

60 Revelle B. Mitch, Scott Dee, Kogan Timothy P., Zheng Jianhua, Beck Pamela J.
Structure-Function Analysis of P-selectin-Sialyl Lewis Binding Interactions.
The Journal of Biological Chemestry 1996; 271; No. 8; 4289-97

61 Roque Manolette R.
Chloroquine/Hydroxychloroquine Toxicity
eMedicine updated 16.2.2006

62 Scheinichen D, Elsner H A; Osorio R, Jüttner B, Gröschel W, Jaeger K, Piepenbrock S.
Lack of influence of the COX inhibitors metamizol and diclofenac on platelet GPIIb/IIIa and P-selectin expression in vitro
BMC Anesthesiol. 2004; 4: 4

63 Schmitt-Sody M., Metz P., Gottschalk O., Birkenmaier C., Zysk S., Veihelmann A., Jansson V.
Platelet P-Selectin is significantly involved in leukocyte-endothelial cell interaction in Murine antigen-induced arthritis.
Platelets August 2007; 18(5): 365-372

64 Schönbeck Uwe, Libby Peter
CD40 Signaling and Plaque Instability.
Circ Res. 2001; 89; 1092-03

65 Schuchmann S., Dörner T.
Antiphospholipidsyndrom 2007 Aktuelle Aspekte in Labordiagnostik und deren Therapeutische Konsequenzen
Zeitschrift für Rheumatologie 2007; 66: 198-205

66 Schulz Christina MD, Schäfer Andreas MD, Stolla Moritz MD, Kerstan Sandra, Lorenz Michael BSc, von Brühl Marie-Luise DVM, Schiemann Matthias PhD, Bauersachs Johann MD, Gloe Torsten PhD, Buwsch Dirk H. MD, Gawaz Meinard MD, Massberg Steffen MD
Chemokine Fractalkine Mediates Leucocyte Recruitment to Inflammatory Endothelial Cells in Flowing Whole Blood. A Critical Role for P-Selectin Expressed on Activated Platelets.
Circulation. 2007;116:764-773

67 Soong T. Rinda BS, Barouch Lili A.MD, Champion Hunter C. MD PhD, Wigley Frederick MD, Halushka Marc K. MD PhD

New clinical and ultrastructural findigs in hydroxychloroquine-induced cardiomyopathy-a report of 2 cases
Human Pathology (2007); 38: 1858-1863

68 Stellos Konstantinos, Gawaz Meinard
Platelet interaction with proginitor cells: Potential implications for regenerative Medicine.
Thrombosis and Haemostasis 2007; 98: 922-929

69 Vandendries Erika R., Furie Barbara C., Furie Bruce
Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis
Thrombosis and Haemostasis 2004; 92: 459-66

70 Vishnevetsky D, Kiyanista V A, Ghandhi P J.
CD40 Ligand: A novel target in the fight against cardiovascular disease
The annals of Pharmacotherapy 2004; 38: 1500-8

71 Vorchheimer David A. MD, Becker Richard MD.
Platelets in Atherosklerosis
Mayo Clin Proc. 2006:81(1); 59-68

72 Vowinkel Thorsten, Anthoni Christoph, Wood Kaatherine C., Stokes Karen Y., Russell Janice, Gray Laura, Bharwani Sulaiman, Senninger Norbert, Alexander J. Steven, Kriegelstein Christian F., Grisham Matthew B., Granger D. Neil
CD40-CD40 Ligand Mediates the Recruitment of Leukocytes and Platelets in Inflamed Murine Colon.
Gastroenterology 2007; 132: 955-965

73 White James G., Rao Gundu H. R.
Microtubule Coils versus the Surface Membrane Cytoskeleton in Maintenance and Restoration of Platelet Discoid Shape.

American Journal of Pathology 1998; 152; 2: 597-609

74 Wiener HM, Varidon N, Yust L.
Platelet antibody binding and spontaneous aggregation in 21 lupus anticoagulant patients
Vox sanguinis 1991; 61: 111-21

75 Witting Kathrin, Rothe Gregor, Schmitz Gerd
Inhibition of Fibrinogen Binding and Surface Recruitment of GpIIb/IIIa as Dose-Dependent Effects of the RGD-Mimetic MK-852.
Thromb Haemost 1998; 79: 625-30

76 Yokoyoma Shinji MD, Ikeda Hisao MD PhD, Haramaki Nobuya MD PhD, Yasukawa Hideo MD PhD, Katoh Atsushi MD PhD, Imaizumi Tsutomu MD PhD
HMG-CoA Reductase Inhibitor Protects Against In Vivo Arterial Thrombosis by Augmenting Platelet-Derived Nitric Oxide Release in Rats
Cardiovasc Pharmacol 2005; 45 (4): 375-80

77 Zou Zhiying, Chen Hong, Schmaier Alec A., Hynes Richard O., Kahn Mark L.
Structure-function analysis reveals discrete 3 integrin inside-out and outside-in signaling pathways in platelets
Blood: 15 April 2007, Volume 109, Number 8; 3284-3289

8) Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Köln, 02.08.2010