

Aus dem Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger E. Scharf

Dynamik des Thrombuswachstums *in vitro*. Validierung digitaler
Imaging-Techniken zur exakten Bestimmung der Thrombusvolumina.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Jan Franz-Josef Peveling-Oberhag

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referentin: Prof. Dr. Kolb-Bachofen

Korreferent: Prof. Dr. Gödecke

Widmung:

Meinem Großvater Günter Beisemann

19. Juli 1931 – 28. Oktober 2008

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
1.1	Fachlicher Hintergrund und Einordnung der Arbeit	8
1.1.1	Die Rolle der Blutplättchen in der Entstehung der arteriellen Thrombose	8
1.1.2	Mechanismus der Thrombusentstehung in arteriellen Gefäßen	9
1.1.3	Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Glykoproteinkomplex IIb-IIIa)	12
1.1.4	Der HPA-1(PI^A)-Genpolymorphismus des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins	15
1.2	Bisherige Studien	16
1.2.1	Epidemiologische Studien zum HPA-1-Polymorphismus von $\alpha_{IIb}\beta_3$	16
1.2.2	Experimentelle Studien zum HPA-1-Polymorphismus von $\alpha_{IIb}\beta_3$	17
1.3	Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	20
1.3.1	Übergeordnete Zielsetzung	20
1.3.2	Spezifische Fragestellungen/Ziele	20
2	MATERIAL UND METHODIK	21
2.1	Material	21
2.1.1	Verwendete Materialien und Geräte	22
2.1.2	Verwendete Chemikalien	22
2.1.3	Rechteckige Strömungskammer	23
2.1.4	Blutfluss	26
2.1.5	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	26
2.1.6	Probanden	29
2.2	Methodik	31
2.2.1	Versuchsvorbereitung	31
2.2.2	Versuchsablauf	35
2.2.3	Computerverarbeitung und Auswertung der Daten	35
2.2.4	Statistische Auswertungen	38
3	ERGEBNISSE	40
3.1	Darstellungsweise der Ergebnisse	40
3.2	Validierung des experimentellen Verfahrens	40
3.2.1	Experimentelle Varianz	40
3.2.2	Spezifität der Plättchenadhäsion	41
3.2.3	Spezifität des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors	43

3.3	Intraindividuelle Varianz der Messmethode	45
3.3.1	Gesamt-Thrombusvolumen	46
3.3.2	Mittlere Thrombenanzahl	47
3.3.3	Mittleres Einzelthrombusvolumen	48
3.3.4	Mittlere Einzelthrombusgrundfläche	50
3.3.5	Mittlere Einzelthrombushöhe	51
3.4	Thrombusbildung über die Zeit bei homozygoten HPA-1a- und HPA-1b-Blutspendern	52
3.4.1	Mittlere Thrombusanzahl	53
3.4.2	Mittleres Einzelthrombusvolumen	54
3.4.3	Mittlere Einzelthrombusgrundfläche	55
3.4.4	Mittlere Einzelthrombushöhe	56
4	DISKUSSION	57
4.1	Vierdimensionale Thrombogenese	57
4.1.1	Validierung des Messverfahrens	58
4.2	Der HPA-1(PIA)-Genpolymorphismus von αIIbβ3	64
4.2.1	Statistik	64
4.2.2	Mittlere Thrombusanzahl	67
4.2.3	Mittleres Einzelthrombusvolumen	67
4.2.4	Mittlere Einzelthrombushöhe	68
4.2.5	Einzelthrombusgrundfläche	69
4.2.6	Schlussfolgerungen	69
4.3	Einordnung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Gesamtkontext und klinische Konsequenzen	72
4.3.1	Stand der wissenschaftlichen Forschung	72
4.3.2	Einordnung der eigenen Arbeiten	73
4.3.3	Mögliche Weiterentwicklung der Experimente und der Messmethode	76
5	LITERATURVERZEICHNIS	79
6	TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	84
6.1	Verzeichnis der Abbildungen	84
6.2	Verzeichnis der Tabellen	85
7	ZUSAMMENFASSUNG	86

8	DANKSAGUNG	87
9	LEBENS LAUF	88
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	91

1 Einleitung

Arterielle Thrombosen und ihre klinischen Komplikationen stellen die führende Todesursache in Deutschland und den Ländern der westlichen Welt dar (Statistisches-Bundesamt, 2010).

Die arterielle Thrombose ist die Bildung eines Plättchen-Fibrin-Pfropfs innerhalb eines arteriellen Gefäßes, meist auf dem Boden eines rupturierten lipidreichen artherosklerotischen Plaques. Durch den kompletten Verschluss eines Gefäßes manifestieren sich die Thrombosen klinisch als akuter Myokardinfarkt, Schlaganfall oder periphere arterielle Verschlusskrankheit (Chandler et al., 1974; DeWood et al., 1980).

Aufklärung der Ursache und Maßnahmen zur Prävention von arteriellen Thrombosen konzentrierten sich lange Zeit vor allem auf traditionelle Risikofaktoren (Rauchen, Hyperlipidämie, Bewegungsmangel etc.). Einen großen Anteil der thrombotischen Ereignisse erleiden allerdings Patienten, die diesen Risikofaktoren nicht ausgesetzt waren. Studien mit Zwillingen konnten zeigen, dass vererbte Risikofaktoren eine signifikante Rolle in der Entstehung von Herzinfarkten und Schlaganfällen spielen (Berg, 1982; Sorensen et al., 1988).

Somit verschob sich der Schwerpunkt der Forschung in der Ära der Entschlüsselung des menschlichen Genoms auf den Einsatz molekulargenetischer Methoden, um Ursachen und pathogenetische Zusammenhänge der arteriellen Thrombose näher zu charakterisieren. Es wurden in diesem Zusammenhang zahlreiche spezifische Gene entdeckt, die die arterielle Thrombogenese beeinflussen können.

Die Hämostase ist charakterisiert durch das Phänomen der Blutstillung, die ihrerseits die Gefäßwandintegrität gewährleistet. Es besteht unter physiologischen Bedingungen ein empfindliches Gleichgewicht zwischen prothrombotischen und antithrombotischen Prozessen, die durch zelluläre Bestandteile, lösliche Plasmaproteine und Faktoren endothelialen Ursprungs vermittelt werden. Änderungen auf genetischer Ebene, die die Produktion, Aktivität oder den Metabolismus dieser Komponenten beeinflussen, können das physiologische Gleichgewicht zugunsten prothrombotischer Vorgänge verschieben und somit zu atherothrombotischen und thrombembolischen Komplikationen prädisponieren (Rosenberg und Aird, 1999; Yee et al., 2005).

In dieser Arbeit soll das Augenmerk auf der Untersuchung eines speziellen Genabschnitts liegen, der in der Bevölkerung in polymorpher Form vorliegt. Es handelt sich um den HPA-1 (Human Platelet Antigen-1)-Polymorphismus des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$, einen thrombozytären Rezeptor, der über seinen Liganden, in erster Linie über Fibrinogen und den vWF, den Kontakt

zwischen Blutplättchen untereinander vermittelt (Lefkovits et al., 1995). Welche Bedeutung dieser Rezeptor für den Menschen besitzt, wird sehr eindrucksvoll durch die Blutungssymptomatik von Patienten mit Thrombasthenie Glanzman deutlich, einer schweren angeborenen Thrombozytopathie, bei der es sich um einen quantitativen oder qualitativen Defekt des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins handelt (Phillips und Agin, 1977).

1.1 Fachlicher Hintergrund und Einordnung der Arbeit

1.1.1 Die Rolle der Blutplättchen in der Entstehung der arteriellen Thrombose

Thrombozyten spielen die zentrale Rolle in der Pathogenese der arteriellen Thrombose (Gawaz, 1999). In den Koronargefäßen an Stellen von rupturierten arteriosklerotischen Plaques führt die Thrombusentstehung zu Symptomen der instabilen Angina Pectoris und zum Myokardinfarkt (DeWood et al., 1986; Fitzgerald et al., 1986; Fuster et al., 1992; Jang et al., 1994; Lam et al., 1986).

Thrombozyten besitzen die Fähigkeit, mit freigelegten Strukturen einer defekten Gefäßwand zu interagieren und anschließend untereinander zu aggregieren, was zur Bildung eines Thrombus führt. Die Thrombusbildung ist einerseits lebenswichtig zur Erhaltung der Gefäßintegrität, kann jedoch andererseits, durch Verschluss eines arteriosklerotisch veränderten Gefäßes, zu einer vitalen Bedrohung werden.

Normalerweise zirkulieren Blutplättchen im engen Kontakt mit den die Gefäßwand auskleidenden Endothelzellen, ohne an ihnen haften zu bleiben. Die Thrombozyten sind jedoch in der Lage, auf Änderungen der Oberflächenbeschaffenheit oder der hämodynamischen Bedingungen schnell zu reagieren und an der Gefäßwand zu adhären (Nivelstein et al., 1990).

Aus den hohen Strömungsgeschwindigkeiten innerhalb arterieller Gefäße resultieren starke tangential zur Gefäßwand wirkende Kräfte, die auf ein an der Gefäßwand adhärentes einzelnes Plättchen oder einen ganzen Thrombus einwirken. Um diesen sogenannten Scherkräften zu widerstehen, kommt einerseits der Verbindung des Einzelplättchens oder des Thrombus mit der Gefäßwand und andererseits dem Plättchen-Plättchen-Kontakt innerhalb eines Thrombozytenaggregats eine besondere Bedeutung zu (Kroll et al., 1996).

Der Kontakt der Blutplättchen zur Gefäßwand und der Thrombozyten untereinander wird über Adhäsionsrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche vermittelt, u. a. über sogenannte

Integrine. Thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren sind von elementarer Bedeutung für die Adhäsion von Plättchen an der Stelle der Gefäßverletzung und für die folgende Aggregation, die Bildung eines dreidimensionalen Netzwerks von Thrombozyten. Ein solches Netzwerk ist in der Lage, ein Gefäßlumen komplett zu verlegen und somit eine Thrombose zu verursachen (Thomas, 2002).

Der Aggregationsprozess im engeren Sinne wird über das ausschließlich auf Zellen der thrombozytären Reihe vorkommende $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin (GP[Glykoprotein]IIb-IIIa) mit seinen Liganden bewirkt, wodurch Plättchen-Plättchen-Kontakt ermöglicht wird (Savage et al., 1998).

Diesem Rezeptor kommt somit eine zentrale Bedeutung in der Entstehung arterieller Thrombosen zu. Es stellte sich so die Frage, ob diskrete Veränderungen seiner Struktur, wie zum Beispiel durch den hier untersuchten HPA-1-Genpolymorphismus von $\alpha_{IIb}\beta_3$, zu einer registrierbaren Veränderung seiner Funktion führen, sich somit die polymorphismustragenden Individuen phänotypisch von der Restpopulation unterscheiden und ob ein solcher Unterschied Einfluss nimmt auf den Prozess der arteriellen Thrombose und die damit verbundenen Komplikationen (Williams und Bray, 2001).

1.1.2 Mechanismus der Thrombusentstehung in arteriellen Gefäßen

1.1.2.1 Arterielle Flussbedingungen

Die rheologischen Bedingungen im arteriellen „High Flow“-System unterscheiden sich deutlich von denen im venösen „Low Flow“-Gefäßsystem (Rosenberg und Aird, 1999). Dies ist unter anderem auf Unterschiede in Blutdruck, Gefäßdurchmesser und Wanddicke zurückzuführen. Der Pathomechanismus der Thrombose in beiden Systemen weist daher ebenfalls große Unterschiede auf. Die folgenden Ausführungen befassen sich mit der Thrombogenese in Arterien.

Auch innerhalb der verschiedenen Abschnitte des arteriellen Systems gibt es deutliche Unterschiede zwischen den Strömungsverhältnissen. Durch den variierenden Gefäßdurchmesser unterscheiden sich die verschiedenen Arterien auch in der Flussgeschwindigkeit, mit der das Blut sie durchfließt.

Ebenfalls variiert die Verteilung der verschiedenen Blutzellen innerhalb des Gefäßquerschnitts mit dem Gefäßdurchmesser und der Flussgeschwindigkeit. Im High-Flow-System befinden sich Erythrozyten im Zentrum des Blutstroms, während Leukozyten und Thrombozyten sich vorwiegend in den gefäßwandnahen Randbereichen bewegen (Baskurt et al., 2004; Pries und Secomb, 2003).

Ebenso weist die Flussgeschwindigkeit innerhalb eines Gefäßes mit konstantem Durchmesser unterschiedliche Werte auf. In der Mittelachse ist sie maximal und nimmt zum Rand hin aufgrund der Reibung mit der Gefäßwand ab. Dieser Geschwindigkeitsunterschied ist durch einen Schereffekt bedingt. Der resultierende Geschwindigkeitsgradient ist dann die lokale Scherrate („shear rate“), sie hat die Dimension s^{-1} (reziproke Sekunde). Die Scherrate ist daher geeignet, die Strömungsverhältnisse während der Thrombogenese, die an der Wand des Gefäßes abläuft, zu beschreiben, und verhält sich gleichzeitig direkt proportional zur Schubspannung („shear stress“), der Kraft, die durch das vorbeifließende Blut tangential auf die Gefäßwand und somit auch auf wandnahe Blutzellen und wandadhärente Thromben einwirkt (Goldsmith und Turitto, 1986).

In großen Arterien beträgt die Scherrate $300-800 s^{-1}$, in Arteriolen $500-1600 s^{-1}$, in Venen $20-200 s^{-1}$. In stenosierten Gefäßen kann die Scherrate bis zu $10.000 s^{-1}$ betragen (Kroll et al., 1996).

1.1.2.2 Thrombozytenadhäsion

Gefäßverletzungen und die Ruptur arteriosklerotischer Plaques verursachen Unterbrechungen der Kontinuität des Endothels und führen so zur Freilegung der extrazellulären Matrix. Die extrazelluläre Matrix ist ein Maschenwerk aus Kollagen und elastischen Fibrillen, die in ein visköselastisches Gel aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und Wasser eingebettet sind. Kollagenfasern vor allem des Typs I und III bilden den Hauptbestandteil der subendothelialen Strukturproteine (Barnes, 1985; Murata et al., 1986).

Thrombozyten, die sich mit einer hohen Geschwindigkeit mit dem arteriellen Blutstrom bewegen, binden nun an diese Kollagenfasern und werden dadurch abrupt abgebremst. Für diesen ersten Kontakt zwischen Blutplättchen und Kollagen bei arteriellen Scherraten ist die Interaktion von GPIb-IX-V mit an Kollagen gebundenen vWF von vorrangiger Bedeutung (Kontaktphase) (Alevriadou et al., 1993). Diese Interaktion zwischen GPIb-IX-V und vWF ist charakterisiert durch eine sehr hohe Affinität, die besonders in Gefäßbereichen mit hoher

Scherkraft die Adhäsion der Blutplättchen an die Gefäßwand ermöglicht. Ebenfalls kennzeichnend für diese Bindung ist eine schnelle Reversibilität, so dass es in dieser Phase zu einer langsamen Rollbewegung der Plättchen über die Oberfläche der Gefäßwand kommt (Savage et al., 1996). Dieser Abbremsvorgang, das sogenannte „tethering“, ermöglicht nun anderen Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche (Kollagen-, Fibrinogen-, Fibronectin-, und Lamininrezeptor), sich mit ihren Liganden auf dem Subendothel zu verbinden (Savage et al., 1998). Besonders die Interaktion der beiden Kollagenrezeptoren $\alpha_2\beta_1$ (GPIIb/IIIa) und GPVI, einem Rezeptor aus der Familie der Immunglobuline, mit Kollagen ist elementar für die stabile Adhäsion der Plättchen (Nieswandt und Watson, 2003). Für die Assoziation der Bindung ist einerseits die Abbremsung der Plättchen notwendig, andererseits ist die Aktivierung der Thrombozyten von großer Bedeutung, um die Adhäsionsrezeptoren in einen hoch affinen Zustand zu versetzen, der eine starke Verbindung zur subendothelialen Matrix ermöglicht (Sarratt et al., 2005). Diese Verbindung ist in der Lage, auch sehr hohen Scherraten standzuhalten (Moroi et al., 2000). Besonders GPVI ist von besonderer Bedeutung in der Kollagen-vermittelten Aktivierung von Thrombozyten (Nieswandt und Watson, 2003; Siljander et al., 2004).

Die Aktivierung der Plättchen löst eine Reihe morphologischer und sekretorischer Veränderungen aus. Es kommt einerseits zu einer Formveränderung („shape change“) der Thrombozyten, bei der sich Pseudopodien ausbilden, welche die Thrombozytenoberfläche vergrößern und somit den Plättchen-Plättchen-Kontakt begünstigen. Gleichzeitig führen die Bildung von Thromboxan A_2 und die Sekretion von Granulainhaltsstoffen zu einer Verstärkung des Aktivierungsprozesses und gleichzeitig zur Stimulation und Rekrutierung noch ruhender zirkulierender Thrombozyten. Dieser Rekrutierungsprozess leitet nun den Aggregationsprozess ein (Scharf und Harker, 1987).

1.1.2.3 Plättchenaggregation

Durch die Aktivierung der adhären Plättchen wird das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ aus dem Ruhezustand in seinen aktiven Zustand versetzt. Das aktivierte Integrin ist nun imstande, über lösliches Fibrinogen bzw. löslichen vWF eine Verbindung zwischen Thrombozyten untereinander herzustellen (Ruggeri, 2003). Somit können sich nun auf der Schicht der am Subendothel adhären Plättchen weitere Plättchen anlagern und so einen dreidimensional wachsenden Thrombus bilden. Anfangs ist die Verbindung der Thrombozyten untereinander über Fibrinogen noch reversibel (primäre Aggregation); werden nun aber die neu angelagerten Plättchen

über die Freisetzung von Granulainhaltsstoffen ebenfalls aktiviert, kommt es zur irreversiblen Bindung an $\alpha_{IIb}\beta_3$ (sekundäre Aggregation). Durch Anlagerung von immer mehr Thrombozyten aus der Blutbahn wächst der Thrombus in das Gefäßlumen hinein und kann durch dessen Verlegung eine Thrombose verursachen (Gawaz, 1999).

Die Interaktion der Grundfläche des Thrombus mit den Kollagenfasern im Subendothel unterscheidet sich somit deutlich von der Interaktion der Plättchen untereinander. Diese Verbindung über das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und Fibrinogen oder vWF bedingt Volumen- und Höhenwachstum des Thrombus.

1.1.3 Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Glykoproteinkomplex IIb-IIIa)

1.1.3.1 Rezeptor-Struktur

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ gehört zur Gruppe der β_3 -Integrine und kommt primär nur bei Plättchen und Megakaryozyten vor, obwohl es manchmal auch auf Tumorzellen nachgewiesen wird (Tripathi et al., 1996). Es ist das Membranprotein, das auf der Oberfläche der Thrombozyten die höchste Rezeptordichte aufweist. Mit 60.000 bis 100.000 Rezeptorkopien macht es etwa ein bis zwei Prozent des Gesamtproteingehalts eines ruhenden Plättchens aus (Wagner et al., 1996). Bei Plättchenaktivierung kann sich die Oberflächenexpression des Rezeptors fakultativ um 25 bis 50 Prozent erhöhen (Niiya et al., 1987).

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist ein heterodimerer Komplex aus einer α - und einer β -Untereinheit. Durch die Aufklärung der kristallinen Struktur des Integrins $\alpha_v\beta_3$ (Xiong et al., 2001) ist auch der molekulare Aufbau von $\alpha_{IIb}\beta_3$ sehr genau charakterisiert, da beide Rezeptoren, $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$ sehr ähnlich aufgebaut sind und die gleiche β -Untereinheit besitzen. Beide Untereinheiten durchtreten jeweils einmal die Thrombozytenmembran und werden daher jeweils in einen zytosolischen-, transmembranären- und extrazellulären Abschnitt unterteilt. Die β_3 -Untereinheit besitzt ein Molekulargewicht von etwa 115 Kilodalton (kDa). Die α_{IIb} -Untereinheit weist ein Molekulargewicht von etwa 140 kDa auf und besteht aus einer niedermolekularen Kette („light chain“; 137 Aminosäuren) und einer höhermolekularen Kette („heavy chain“; 871 Aminosäuren), die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Poncz et al., 1987; Zimrin et al., 1988); siehe Abb. 1a/b.

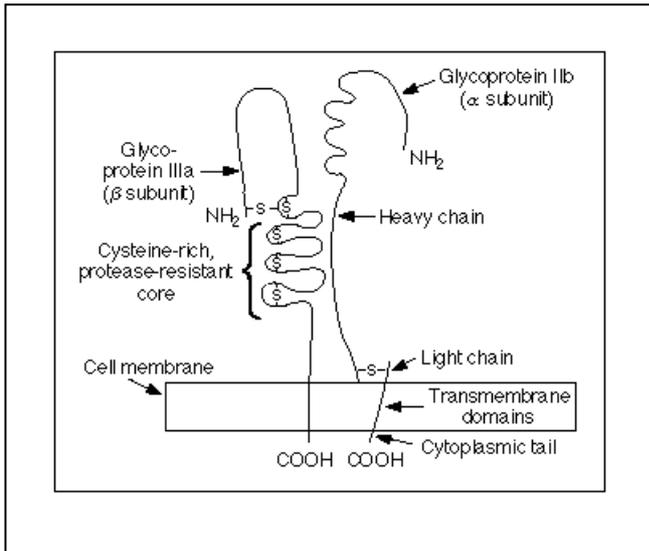


Abb.1a

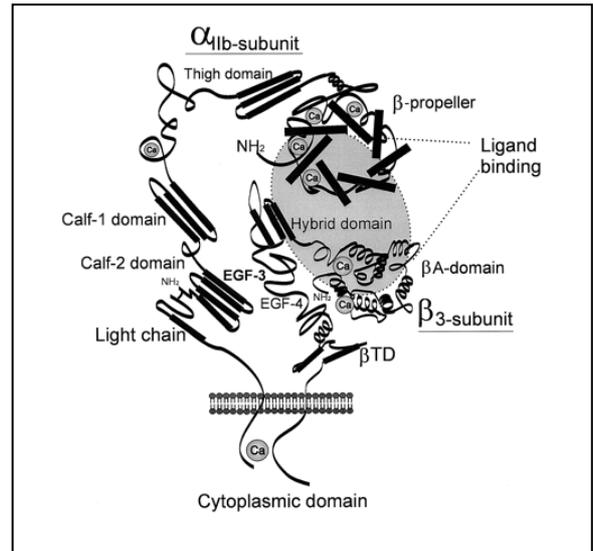


Abb.1b

Abb.1a: Vereinfachtes Schema von $\alpha_{IIb}\beta_3$ aus (Lefkovits et al., 1995). Abb.1b: Struktur des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$, aus (Quinn et al., 2003) basierend auf der kristallinen Struktur und Magnet-Resonanz-Aufnahmen. Das Modell in Abb.1b zeigt sowohl die α - als auch die β -Untereinheit von $\alpha_{IIb}\beta_3$, die sich wiederum aus Untereinheiten von verbundenen Domänen zusammensetzen. Die α -Untereinheit weist N-terminal einen „ β -Propeller“ auf, dessen sieben „Rotorblätter“ sich aus jeweils 60 Aminosäuren zusammensetzen. Der Rest der α -Untereinheit setzt sich aus einer „Oberschenkel“- und zwei „Unterschenkel“-Domänen zusammen. Zwischen der Oberschenkel- und der ersten Unterschenkeldomäne gibt es einen „Knie“-Abschnitt, eine Schleife, die das Zusammenklappen der beiden angrenzenden Domänen erlaubt. Die β -Untereinheit weist an Position 33 den in dieser Arbeit untersuchten HPA1-Genpolymorphismus auf. Des Weiteren ist eine lange Disulfidbrücke zwischen Cys5 und Cys435 abgebildet. Die erste identifizierbare Domäne, die A-Domäne, enthält zwei oder drei divalente kationische Elemente, unter anderem das MIDAS-Motiv, welches an der Ligandenbindung beteiligt ist. Nach einer Hybrid-Domäne folgen vier EGF-Domänen (endothelial growth factor like domains), die dann in die Transmembran-Domäne übergehen.

1.1.3.2 Ligandenbindung durch $\alpha_{IIb}\beta_3$

Ein typisches Charakteristikum der Integrine ist ihre Fähigkeit, „Botschaften“ von außen ins Zellinnere oder von innen in das Zelläußere zu vermitteln, sogenanntes bidirektionales Signaling. Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist in Bezug auf seine Liganden polyspezifisch, sein Liganden-Repertoire umfasst Fibrinogen, vWF, Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin, CD40L und diverse Schlangengifte (Plow et al., 2000). Für den Adhäsions- und Aggregationsprozess sind die Liganden Fibrinogen und vWF von entscheidender Bedeutung. vWF vermittelt die Plättchenadhäsion bei hohen Wandscherraten über GPIb-IX-V. Die Interaktion von $\alpha_{IIb}\beta_3$ und Fibrinogen ist elementarer Bestandteil der Verbindung von Thrombozyten untereinander bei der Aggregation, ist jedoch auch beteiligt an der Adhäsion, da der Rezeptor auch immobilisiertes Fibrinogen auf der Gefäßoberfläche bindet (Savage et al., 1992).

Zwei Aminosäuresequenzen definieren als Motive die Bindungsspezifität an $\alpha_{IIb}\beta_3$:

- I. Die RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Aspartat-Sequenz): Sie ist Bestandteil der Liganden Fibrinogen, Fibronectin, vWF und Vitronectin (Ruoslahti und Pierschbacher, 1987).
- II. Die Dodekapeptid-Sequenz: Eine aus zwölf Aminosäuren (AS 400-411; HHLGGAKQAGDV) bestehende Bindungsstelle im C-terminalen Teil der γ -Kette des Fibrinogens. Diese Bindungsstelle ist monospezifisch für Fibrinogen (Farrell et al., 1992).

Von-Willebrand-Faktor bindet über seine RGD-Sequenz an $\alpha_{IIb}\beta_3$. Obwohl Fibrinogen zwei RGD-Sequenzen aufweist, dürfte die γ -Kette seine Hauptbindungsstelle an das $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin darstellen (Farrell et al., 1992).

1.1.3.3 Aktivierungszustand von $\alpha_{IIb}\beta_3$

Im Ruhezustand tragen Blutplättchen ein nicht aktiviertes $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin auf ihrer Oberfläche. Es ist in der Lage, immobilisiertes, nicht jedoch lösliches Fibrinogen zu binden. Durch Plättchenaktivierung durch Agonisten (Thrombin, ADP, Thromboxan A_2), Kollagen oder durch Generierung eines Signals nach Adhäsion von $\alpha_{IIb}\beta_3$ an immobilisierten Liganden (sogenanntes outside-in signaling) wird der Rezeptor in einen Zustand mit hoher Affinität gegenüber löslichem Fibrinogen und anderen Adhäsivproteinen im Plasma versetzt. In diesem Zustand ist die Bindung von löslichem Fibrinogen möglich, das den Rezeptor in den ligandenbesetzten Funktionszustand überführt. Die Fibrinogen-Rezeptor-Interaktion bedingt verschiedene intrazelluläre Antworten. Es kommt zur Induktion von „Inside-out-Signalen“, die zur

Freisetzung von prokoagulatorischen Substanzen aus den Thrombozyten, Zytoskelettorganisationen und Expression von LIBS (ligandeninduzierte Bindungsstellen) führen (Gawaz, 1999).

1.1.4 Der HPA-1(PI^A)-Genpolymorphismus des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins

Polymorphismen sind stabile Variationen der DNA-Sequenz, die in mehr als 1 % der Chromosomen in einer Population vorkommen (Bray, 2000).

Von bislang zwölf identifizierten Genvarianten der β -Untereinheit von $\alpha_{IIb}\beta_3$, die zu einem Aminosäureaustausch führen, kommt der HPA-1-Polymorphismus am häufigsten vor und hat die größte klinische Relevanz. Der Austausch von Thymin gegen Cytosin an Position 1565 in Exon 2 des ITGB3 Gens führt zum Austausch von Prolin für Leucin an der Aminosäureposition 33 (Leu33→Pro) am N-terminalen Ende der β -Untereinheit der β_3 -Integrine (Newman, 1997; Valentin und Newman, 1994). Der Aminosäureaustausch verursacht eine Konformationsänderung in der aminoterminalen Disulfidschleife der β -Untereinheit (siehe Abb.1), die für die Fibrinogenbindung wichtig ist (Voetsch und Loscalzo, 2004).

Die homozygote Leu33-Variante wird als HPA-1a/1a (PI^{A1/A1}) bezeichnet. Der größte Teil der europäischen Bevölkerung trägt diesen Genotyp. Der heterozygote Genotyp HPA-1a/1b (PI^{A1/A2}) ist mit einem Anteil von ca. 25 % in Europa ebenfalls relativ häufig vertreten, während die Häufigkeit homozygoter HPA-1b-Träger (PI^{A2/A2}) lediglich 2 % beträgt (Williams und Bray, 2001).

Der HPA-1-Genpolymorphismus ist schon lange bekannt durch seine Assoziation mit den Krankheitsbildern der posttransfusionellen Purpura und der neonatalen Alloimmunthrombozytopenie. In beiden Fällen kommt es durch die Bildung von Alloantikörpern gegen das HPA-1a-Antigen zu schweren Thrombozytopenien (Müller-Berghaus, 1999).

Seit 1996 erstmals über eine erhöhte Prävalenz des HPA-1b-Allels bei Patienten mit instabiler Angina oder akutem Myokardinfarkt berichtet wurde (Weiss et al., 1996), richtete sich das Augenmerk der Forschung auf den β_3 -Genpolymorphismus als Risikodeterminante der koronaren Herzkrankheit (KHK).

1.2 Bisherige Studien

1.2.1 Epidemiologische Studien zum HPA-1-Polymorphismus von $\alpha_{IIb}\beta_3$

In der Studie von Weiss et al. wurde von einer signifikant erhöhten Prävalenz vom HPA-1b Genotyp bei Patienten mit Myokardinfarkt und instabiler Angina im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne KHK (39 % versus 19 %, $p = 0,01$) berichtet. Bei Patienten, die zum Zeitpunkt ihres Myokardinfarkts jünger als 60 waren, war der Unterschied zur Kontrollgruppe sogar noch größer (50.0 % versus 13.9 %, $p = 0.002$) (Weiss et al., 1996).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen ergab sich im Rahmen der Physicians' Health Study, einer großen prospektiven Studie mit ca. 15.000 Probanden, kein Unterschied in der Prävalenz von HPA-1b bei Vergleich von Patienten mit akutem Myokardinfarkt (25 %) mit Kontrollpersonen ohne KHK (26 %, $p = 0,4$) (Ridker et al., 1997).

Seit diesem Zeitpunkt sind über 30 Veröffentlichungen erschienen, die HPA-1b im Hinblick auf eine Rolle als potenziellen Risikofaktor verschiedener Manifestationen der koronaren Herzkrankheit untersucht haben. Etwa die Hälfte dieser Studien konnte einen Zusammenhang zwischen HPA-1b und akutem Myokardinfarkt bzw. Schlaganfall zeigen (Carter et al., 1997; Garcia-Ribes et al., 1998; Pastinen et al., 1998; Weiss et al., 1996), die andere Hälfte stellte einen solchen Zusammenhang allerdings in Frage (Corral et al., 1997; Herrmann et al., 1997; Ridker et al., 1997; Scaglione et al., 1998). Die verschiedenen Studien unterschieden sich allerdings stark in ihrem Design.

Meta-Analysen postulierten, dass HPA-1b einen milden Risikofaktor für die KHK (nicht jedoch für Schlaganfall) darstellt, mit einer höheren odds ratio für Patienten jünger als 60 Jahre (Di Castelnuovo et al., 2001; Meisel et al., 2004; Wu und Tsongalis, 2001).

Vor dem Hintergrund dieser widersprüchlichen epidemiologischen Datenlage entstand die Hypothese, dass das HPA-1b-Allel des β_3 -Polymorphismus keinen Risikofaktor für die Arteriosklerose, sondern eine Risikodeterminante für eine gesteigerte Plättchenthrombogenität darstellt und daher bei bereits vorhandener KHK frühzeitiger zu einem Myokardinfarkt führt (Zotz et al., 1998).

Diese Hypothese wird unterstützt durch verschiedene Studien:

Eine Assoziation zwischen HPA-1b-Genotyp und erhöhter Reoklusionsrate koronarer Bypassgefäße und Stents, bei der die plättchenvermittelte arterielle Thrombose die zentrale Rolle spielt, konnte gezeigt werden (Kastrati et al., 1999; Walter et al., 1997; Zotz et al., 2000).

Autopsie-Studien zeigten eine signifikant erhöhte Prävalenz des HPA-1b-Genotyps bei Myokardinfarkten, die durch arterielle Thrombose ausgelöst waren, im Vergleich zu Infarkten durch schwere Stenosierung der Koronargefäße durch Arteriosklerose (Mikkelsson et al., 2000; Mikkelsson et al., 1999).

Des Weiteren konnte in einer Studie mit über 4000 Probanden gezeigt werden, dass es bei Trägern des HPA-1b-Allels keine erhöhte Prävalenz von koronarer Herzkrankheit und Myokardinfarkt gab, jedoch bei Patienten mit KHK ein Myokardinfarkt im Median 5,2 Jahre früher ($p=0,006$) auftrat (Loncar et al., 2005).

1.2.2 Experimentelle Studien zum HPA-1-Polymorphismus von $\alpha_{IIb}\beta_3$

Die Zahl der funktionellen Studien zum HPA-1-Polymorphismus ist deutlich niedriger als die epidemiologischer Untersuchungen. Diese Untersuchungen wurden zumeist unter statischen Bedingungen, in Zellsuspensionen ohne Blutfluss durchgeführt.

1.2.2.1 Aktivierungsunterschiede unter statischen Bedingungen

In einer umfangreichen Studie (Michelson et al., 2000) wurde die Thrombozytenfunktion mit dem HPA-1-Genotyp korreliert. Unter Stimulation mit ADP zeigten die HPA-1b-positiven Plättchen signifikant höhere Oberflächenexpression von P-Selektin (CD62P), $\alpha_{IIb}\beta_3$ -gebundenem Fibrinogen und aktiviertem $\alpha_{IIb}\beta_3$ als Plättchen vom Genotyp HPA-1a/1a. Während die Oberflächenexpression von $\alpha_{IIb}\beta_3$ sich bei ruhenden Plättchen zwischen den Genotypen nicht unterschied, zeigte sich nach Aktivierung mit ADP im Vergleich zum HPA-1a/1a-Genotyp eine signifikant höhere Konzentration von $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf der Oberfläche von Plättchen mit dem Genotyp HPA-1b/1b. Eine andere Studie konnte diese Resultate bei Stimulation mit ADP nicht bestätigen, zeigte aber ähnliche Ergebnisse bei Plättchenstimulation durch Arachidonsäure und Thromboxan A_2 (Andrioli et al., 2000).

Eine weitere Studie (Feng et al., 1999) untersuchte 1422 Probanden der Framingham-Offspring-Studie. Der HPA-1-Genotyp der Probanden wurde mit der „Thrombozytenaggregabilität“, bestimmt mit einer aggregometrischen Messung nach Born (Born, 1962), korreliert. Es konnte gezeigt werden, dass bei Plättchen der HPA-1b-positiven Genotypen eine signifikant niedrigere Konzentration von Adrenalin zur Aktivierung ausreichte, um eine Aggregation auszulösen, als bei Plättchen mit dem HPA-1a-Genotyp. Unter Aktivierung mit ADP konnte jedoch kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

1.2.2.2 Unterschiede in der Fibrinogenbindung

Auch bei Untersuchungen zu Unterschieden in der Fibrinogenbindung von Plättchen mit verschiedenen HPA-1-Allelen wurden diskrepante Ergebnisse veröffentlicht.

Einige Studien zeigten eine erhöhte Fibrinogenbindung (Goodall et al., 1999) bei HPA-1b-positiven Thrombozyten, andere konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen (Bennett et al., 2001; Meiklejohn et al., 2001).

*1.2.2.3 α I**IIb** β 3-transfektierte CHO-Zellen als Modell zur Untersuchung des HPA-1-Polymorphismus*

Ein ganz anderer Studienansatz trug zur weiteren phänotypischen Charakterisierung der HPA-1-Genotypen bei. Es wurden Untersuchungen an α _{IIb} β ₃-transfektierten CHO-Zellen (Chinesische Hamsterovarienzellen) durchgeführt, die entweder den HPA-1a- oder den HPA-1b-Genotyp von α _{IIb} β ₃ exprimierten. Es zeigte sich bei diesen Zelllinien kein Unterschied in der Bindung von löslichem Fibrinogen, unabhängig vom Aktivierungszustand des Rezeptors. Allerdings gab es eine signifikant erhöhte Bindung von HPA-1b-exprimierenden CHO-Zellen an immobilisiertes Fibrinogen im Vergleich zur HPA-1a-Variante. Bei der HPA-1b-Variante konnte ebenfalls im Vergleich zum HPA-1a-Genotyp eine signifikante Erhöhung des polymerisierten Aktin innerhalb der Zellen, des „cell-spreading“, der Tyrosin-Phosphorylierung von pp125^{FAK} und der Fibrin-Retraktion nachgewiesen werden (Vijayan et al., 2000).

An der gleichen CHO-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte Adhäsion von HPA-1b (an immobilisiertes Fibrinogen) mit einer höheren Aktivierung der Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (MAPK) ERK2 (extracellular signal-regulated kinase 2) und der

myosin light-chain kinase (MLCK) als bei der HPA-1a-Isoform einhergeht (Vijayan et al., 2003b).

Weiter zeigte sich unter Flussbedingungen in einem Flusskammermodell bei Scherraten zwischen 25 und 100 s⁻¹ eine signifikant erhöhte Adhäsionsrate von HPA-1b-CHO-Zellen an Fibrinogen im Vergleich zu HPA-1a-Zellen (Vijayan et al., 2003a).

In einer Abwandlung dieses Experiments konnte gezeigt werden, dass CHO-Zellen mit dem HPA-1b-Genotyp scheinbar stabiler an immobilisiertes Fibrinogen binden. Die CHO-Zellen wurden hier unter statischen Bedingungen zur Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen gebracht und dann innerhalb einer Strömungskammer ansteigenden Scherraten ausgesetzt. Es zeigte sich, dass die HPA-1a-Variante schon bei niedrigeren Scherraten die Verbindung zum Fibrinogen verlor und abgelöst wurde als der HPA-1b-Isotyp (Berendes, Doktorarbeit "in Progress"). Diese Beobachtungen könnten zurückzuführen sein auf genotypabhängige Unterschiede in „outside-in“ Signalen generiert durch den Kontakt von $\alpha_{IIb}\beta_3$ mit thrombogenen Substraten. Es gibt Hinweise darauf, dass der HPA-1b Genotyp eben solche outside-in Signale verstärkt durch eine Aktivierung der Serin/Threonin Phosphorylierung von ERK2 und der myosin light chain (MLC) (Vijayan et al., 2005).

Die Versuche an CHO-Zellen lassen vermuten, falls sie auf Thrombozyten übertragbar sind, dass die $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Polymorphismen die Signaltransduktion innerhalb der Plättchen beeinflussen könnten. Die erhöhte Resistenz der HPA-1b-Isotypen gegenüber ansteigenden Scherraten könnte einen Phänotyp dieses Polymorphismus darstellen und zur Erklärung der klinischen Befunde beitragen.

1.2.2.4 Versuche unter flussdynamischen Bedingungen

Da sich in den Experimenten mit CHO-Zellen gezeigt hat, dass unter Applikation von Scherkräften der Unterschied in der Zelladhäsion an Fibrinogen zwischen dem HPA-1a- und 1b-Genotyp besonders ausgeprägt ist, ist es nahe liegend, analoge Versuchsbedingungen auch bei einer In-vitro-Untersuchung im Vollblut herzustellen. Obwohl der Einsatz von Vollblut in Flusskammermodellen ein in der Hämostaseologie zunehmend häufiger angewendetes Untersuchungsverfahren darstellt (Grabowski, 1990; Patel et al., 2003; Savage et al., 1998), gibt es bisher keine Veröffentlichung zur Untersuchung des HPA-1-Polymorphismus von $\alpha_{IIb}\beta_3$ unter flussdynamischen In-vitro-Bedingungen im Vollblut. Es wurde jedoch eine eigene Studie am Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin (IHTM) zu dieser Thematik durchge-

führt (Loncar et al., 2007). Hier wurde bei Versuchen mit einer Strömungskammer die Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen im Vollblut untersucht. Das Adhäsionsverhalten der Plättchen von Blutspendern mit den Genotypen HPA-1a/1a, HPA-1a/1b und HPA-1b/1b wurde bei verschiedenen Scherraten (50s^{-1} , 500s^{-1} , 1500s^{-1}) miteinander verglichen. Beim Vergleich der absoluten Adhäsionsraten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen HPA-1a und HPA-1b. Vergleich man jedoch den relativen Unterschied zwischen Adhäsionsrate zu Versuchsbeginn und Versuchsende (Adhäsion nach Minute 5 dividiert durch Adhäsion zu Versuchsbeginn), zeigte sich eine signifikant erhöhte relative Plättchenadhäsion der HPA-1b-Genotypen.

Zu den Auswirkungen des HPA-1-Polymorphismus des $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Integrins auf die Aggregation und Thrombusbildung unter flussdynamischen Bedingungen existieren bisher keine In-vitro-Daten.

1.3 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

1.3.1 Übergeordnete Zielsetzung

- a) Entwicklung und Validierung eines In-vitro-Modells, das den Prozess der Thrombogenese möglichst getreu der Verhältnisse in vivo simuliert, das die Thrombusentstehung in ihrer Dreidimensionalität darstellt und gleichzeitig auch ihren zeitlichen Ablauf als vierte Dimension erfasst.
- b) Einsatz des validierten Messverfahrens, um phänotypische Auswirkungen des HPA-1-Genpolymorphismus von $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ auf die Thrombogenese in vitro zu charakterisieren.

1.3.2 Spezifische Fragestellungen/Ziele

- aa) Eichung des Messverfahrens an einem internen Standard (Mikrosphären).
- ab) Welche Rolle spielt $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ für die Thrombusentstehung im Messsystem? Kommt es zur Ausbildung von Thromben unter der Blockade von $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$?
- ac) Validierung des Messverfahrens durch wiederholte Messungen mit dem Blut eines Individuums

Unterscheiden sich innerhalb des Messsystems HPA-1a/1a- und HPA-1b/1b-Genotyp hinsichtlich ihrer mittleren

ba) Thrombusanzahl?

bb) Einzelthrombusvolumen?

bc) Einzelthrombusgrundfläche?

bd) Einzelthrombushöhe?

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Materialien und Geräte

Die folgenden Materialien und Geräte wurden für die Studie benötigt:

- Deckgläser für Mikroskopie, 24 x 50 mm, (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde)
- Kolbenhub-Pipetten (Eppendorf reference 10-100 µl und 0,5-10 µl, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf)
- Pipettenspitzen (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf)
- Petrischalen (Greiner Labortechnik, No. 639102, 145/20 mm)
- 30-ml-Spitzboden-Schraubröhrchen (Greiner, Nürtingen)
- Perfusorpumpe (Standard-Pumpe 22 Holliston, Harvard Apparatus, Massachusetts, USA)
- Perfusorspritzen (Original-Perfusor-Spritze, OPS, 50 ml, Luer Lock, B. BRAUN Melsungen AG, Melsungen)
- Venenpunktionsbesteck (W.I.N. 21G, Innendurchmesser 0,6 mm, Abbott Ireland, Sligo/Irland, 63-HF-0050-01)
- Vacutainer® Natrium-Citrat (Konz. 0,129M) (BD, New Jersey, USA, Katalognr.: 363079)
- Spritzenkonus: 2-ml-Spritze (BD, New Jersey, USA)

- Taumelschüttler (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
- Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop, Zeiss Axiovert 100 M (Stativ) und LSM 510 (Scanmodul) (Carl Zeiss, Oberkochen)
- Computer (Siemens Scenic Pro M7)
- Blutbild (Sysmex, Norderstedt)
- CO₂-Gas (Linde, Pullach)
- Bildverarbeitungssoftware ECCET (WWW.ECCET.de)
- Statistikprogramm Graphpad InStat (Graphpad, San Diego, CA 92130 USA)

2.1.2 Verwendete Chemikalien

- PBS (Phosphate Buffer Solution)-Puffer (pH 7,3 Serag-Wiessner GmbH & Co. KG, Naila)
- Mepacrin (gelöst in PBS-Puffer, Stocklösung 10 mM, Endkonzentration 10 µM)
(N⁴-(6-chloro-2-methoxy-9-acridinyl)-N¹, N¹-diethylpentan-1,4-diamin)
(Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA)
- Kollagen (Kollagen TypS, Roche, Mannheim)
- Abciximab (ReoPro® Lilly Indianapolis, Indiana 46285 USA)
- BSA (Bovines Serum Albumin) (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA)
- Edisonite Schnellreiniger (Art.-Nr. 60129, Merz + Co., Frankfurt, UBA-Nr.:05860001)
- Natrium-Citrat (Konz. 0,129M) Vacutainer (BD, New Jersey, USA, Katalognr.: 363079)
- Amidoblack (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA)
- Mikrosphären (Cat.Nr. F-36905, Molecular Probes, Eugene, USA)

2.1.2.1 Mepacrin

Mepacrin oder auch Quinacrin (N⁴-(6-chloro-2-methoxy-9-acridinyl)-N¹, N¹-diethylpentan-1,4-diamin) ist ein trizyklisches und basisches Amin. Es besitzt eine intrinsische, gelb-grüne Fluoreszenz bei Anregung durch einfallendes Licht der Wellenlänge 440 nm zu emittieren. Die Emissionswellenlänge beträgt 505 nm. Aufgrund seiner hohen Affinität zu dem in der

dichten Granula der Plättchen gespeicherten Adenosintriphosphat (ATP) findet eine schnelle und selektive Akkumulation von Mepacrin in diesen Organellen statt (Skaer et al., 1981), außerdem auch in der Granula von Leukozyten (Read und Trist, 1982).

In der in dieser Studie verwendeten Endkonzentration von 10 μM hat Mepacrin keinen Einfluss auf die normale Plättchenfunktion (Dise et al., 1982; Savage et al., 1996).

2.1.2.2 Abciximab

Abciximab (ReoPro®) ist das Fab-Fragment des chimären monoklonalen Antikörpers 7E3 und antagonisiert das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ der Thrombozyten. Abciximab bindet mit hoher Affinität am Rezeptor, blockiert die Bindung plasmatischer Liganden (wie Fibrinogen und vWF) und verhindert damit die Plättchenaggregation und Plättchenthrombusbildung.

2.1.2.3 Kollagen

Mischung aus 95 Prozent Typ I Kollagen und fünf Prozent Typ III Kollagen, gelöst in Eisessig (gebrauchsfertige Lösung vom Hersteller).

2.1.2.4 Mikrosphären

Fluoreszierende Kügelchen mit einem definierten Durchmesser von $6\mu\text{m}$ mit einer SD von max. drei Prozent (Herstellerangabe). Die Mikrosphären wurden eingesetzt, um die Methode zu kalibrieren.

2.1.3 Rechteckige Strömungskammer

Für das Messverfahren vierdimensionale Thrombogenese wurde eine neue Strömungskammer gebaut, die speziell auf die besonderen Anforderungen des neuen Messverfahrens abgestimmt ist. Sie hat Flußkanalabmessungen, die innerhalb des Meßzeitraums eine Simulation einer arteriellen Stenose durch entstehende Plättchen-Fibrin-Thromben erlauben. Des Weiteren weist die Konstruktion ein sehr kleines Totraumvolumen auf und ermöglicht einen minimalen Abstand zwischen Mikroskopobjektiv und Blutfluss für eine optimale mikroskopische Visualisierung. Die Länge des Flusskanals beträgt 5cm, seine Breite 0,5cm und seine Höhe $90\mu\text{m}$. Die Abbildungen 2 bis 4 zeigen schematische und fotografische Darstellungen der Kammer.

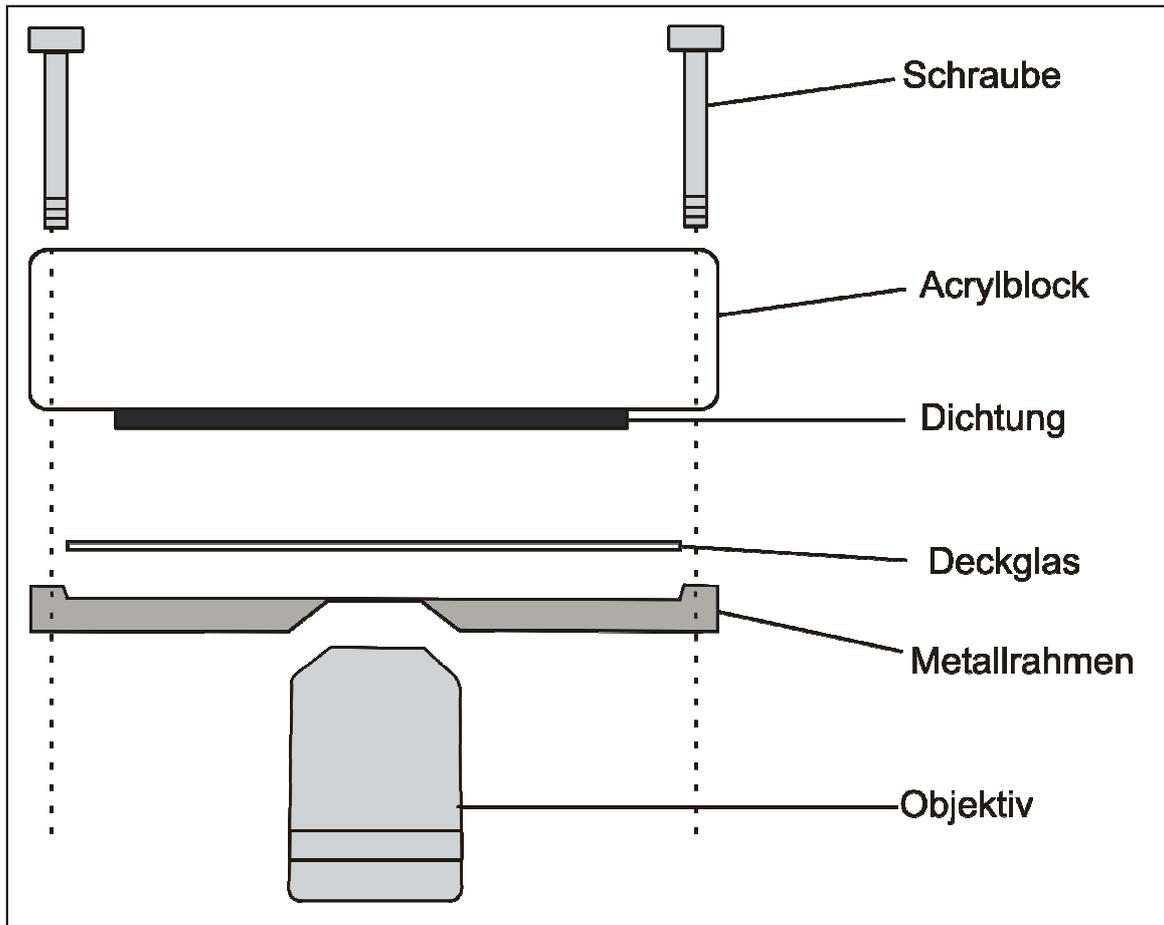


Abb.2: Schematischer Aufbau der rechteckigen Strömungskammer



Abb.3: Strömungskammer (Einzelteile)

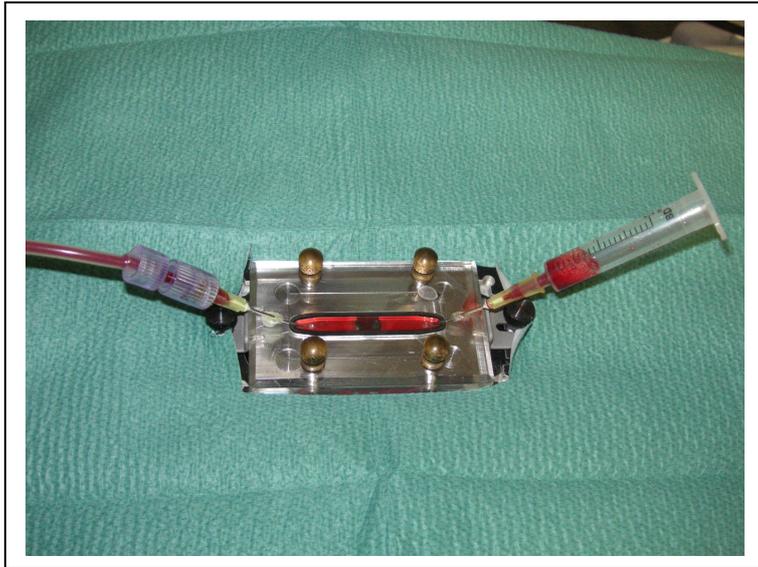


Abb.4: Zusammengesetzte Strömungskammer

2.1.4 Blutfluss

Das Blut wird von einem Reservoir auf der Kammerzuflussseite mittels einer Präzisionsperfusorpumpe (Harvard Apparatus) auf der Abflussseite durch die Kammer hindurch aspiriert.

Durch die Blutaspiration ist es möglich, das Totraumvolumen zu minimieren, indem das Blutreservoir direkt auf die Kammer aufgesteckt wird. Des Weiteren macht es das Aspirationsverfahren möglich, in Zukunft dem Blut während des Strömungsexperiments Substanzen (Medikamente, Antikörper etc.) hinzuzufügen.

Der Blutfluss wird mittels der Perfusorpumpe so reguliert, dass eine initiale Wandscherrate von 500s^{-1} innerhalb der Kammer entsteht.

Zur Berechnung der Scherrate γ in der rechteckigen Strömungskammer wird folgende Formel verwendet:

$$\gamma = \frac{6 \cdot Q}{w \cdot h^2}$$

wobei Q = Flussrate in ml/s

w = Länge des Feldes der Flusskammer (40 mm)

h = Höhe der Flusskammer (90 μm)

Die in dieser Studie gewählte Scherrate von 500s^{-1} entspricht einer Flussrate von 9,6 ml/h.

2.1.5 Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop

Das verwendete konfokale Laser-Scanning-Mikroskop Axiovert 100 M (konfokales LSM) ist ein inverses Lichtmikroskop, an das eine LSM-Einheit (bestehend aus einem Laser- und einem Scanning-Modul) gekoppelt ist.

Der Laser regt einen vorher zugesetzten Fluoreszenzfarbstoff innerhalb der Blutplättchen an, dessen Signal vom Detektor (Photomultiplier) Ebene für Ebene erfasst und an den Computer weitergeleitet wird. Dieser rekonstruiert ein dreidimensionales Bild aus diesen Schnittebenen.

Die folgende Abbildung (Abb.5) zeigt schematisch den Strahlengang des Lichtes im LSM. Hier sind das einfallende Licht (blaue Pfeile), das auf die Strömungskammer trifft, und das

entstehende Fluoreszenzsignal (grüner Pfeil) dargestellt. Die roten Pfeile markieren die Flussrichtung des Blutes durch die Strömungskammer.

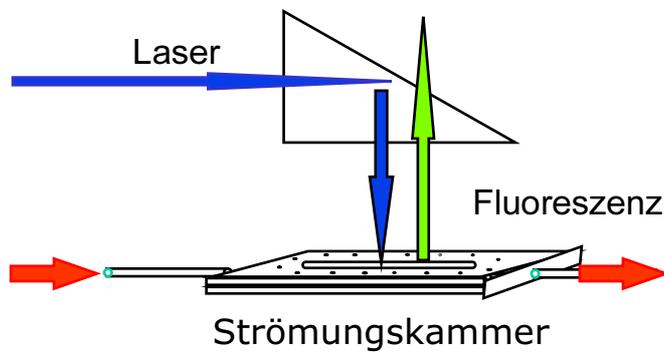


Abb.5: Vereinfachte Darstellung des Strahlenganges im Laser-Scanning-Mikroskop (übernommen von V. Stoldt, Mitarbeiter des IHTM)

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen den Versuchsaufbau.



Abb.6: Versuchsaufbau, Aufbau des Laser-Scanning-Mikroskops



Abb.7: Versuchsaufbau, die Strömungskammer im Laser-Scanning-Mikroskop

2.1.6 Probanden

Nach Zustimmung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der HHU (11.09.2001; AZ:1864) wurden in der Zeit von September 2004 bis Dezember 2004, von insgesamt 16 männlichen und weiblichen Blutspendern, die nach eigenen Angaben gesund waren und in den vorangegangenen zwei Wochen keine Medikamente eingenommen hatten, Daten für die Studie gewonnen. Die Probanden waren bereits im Vorfeld mittels allelspezifischer Restriktionszymanalyse im Hinblick auf den HPA-1-Polymorphismus des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPII-bIIIa) genotypisiert worden und wurden gezielt für die Studie einbestellt. Alle Probanden waren regelmäßige Blutspender der Blutspendezentrale der Universität Düsseldorf. Sie hatten nach ausführlicher Aufklärung gemäß den Empfehlungen der Helsinki-Erklärung durch Unterschrift ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie erklärt. Den Probanden wurde entweder vor oder während ihrer regulären Blutspende zusätzlich Blut in vier Citrat-Vacutainer abgenommen. Das Blut von Proband 26 musste wegen vorzeitiger Gerinnung während des Anfärbungszeitraums mit Mepa-crin von der Auswertung ausgeschlossen werden. Die Zusammensetzung des Probandenkollektivs ist in Tabelle 1 dargestellt.

Genotyp HPA1	Spender-Nr.	Geburtsjahr	Alter zum Ver- suchszeitpunkt	Versuchstag	PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)
HPA-1a/1a	1	1947	58	03.09.2004	136
HPA-1a/1a	9	1984	21	09.09.2004	Keine Mes- sung
HPA-1a/1a	16	1965	40	17.09.2004	264
HPA-1a/1a	22	1957	48	28.09.2004	189
HPA-1a/1a	24	1967	38	29.09.2004	154
HPA-1a/1a	25	1976	29	30.09.2004	242
HPA-1a/1a	28	1954	51	02.11.2004	172
HPA-1a/1a	30	1980	25	02.12.2004	162
MW			38,75		188,43
STDEV			13,13		47,41
HPA-1b/1b	14	1951	54	14.09.2004	228
HPA-1b/1b	17	1952	53	21.09.2004	238
HPA-1b/1b	18	1966	39	22.09.2004	223
HPA-1b/1b	20	1960	45	23.09.2004	Keine Mes- sung
HPA-1b/1b	21	1958	47	24.09.2004	224
HPA-1b/1b	23	1962	43	28.09.2004	Keine Mes- sung
HPA-1b/1b	26	1970	35	30.09.2004	200
HPA-1b/1b	29	1959	46	02.11.2004	201
MW			45,25		219
STDEV			6,43		15,28

Tab.1: Probandenkollektiv und Untersuchungszeitpunkt

2.2 Methodik

2.2.1 Versuchsvorbereitung

2.2.1.1 Vorbereitung der Deckgläschen

Pro Versuch wurde jeweils ein Deckgläschen mit den Abmessungen 24 x 50 mm benötigt. Um es von den Chemikalienrückständen der Herstellung zu befreien, wurde das Deckglas einige Sekunden mit der blauen Flamme des Bunsenbrenners auf der Oberfläche erhitzt und dann bei Zimmertemperatur wieder vollständig abgekühlt. Dieser Prozess ist wichtig für die gleichmäßige Verteilung des Kollagens auf der Glasoberfläche.

2.2.1.2 Beschichtung der Deckgläschen

Die Deckgläschen wurden mit Kollagen (Typ I 95 %, Typ III 5 %) beschichtet, um eine thrombogene Oberfläche zu schaffen. Dazu wurde ein einzelner Tropfen Kollagen auf die Mitte der Glasoberfläche aufgetragen und getrocknet. Dies hatte den Vorteil, dass im Messbereich in der Mitte des Deckglases eine homogene kontinuierliche Kollagenmatrix bestand und die Thrombozyten erst im Messbereich das erste Mal mit dem Kollagen in Kontakt kamen und somit nicht durch Kollagen außerhalb dieses Bereiches aktiviert werden konnten. Die Gleichmäßigkeit der Kollagenbeschichtung wurde mit dem Farbstoff Amidoblack nachgewiesen.

Zum Aufbringen des Kollagentropfens wurden die vorbereiteten Deckgläschen auf eine Schablone aufgelegt, die die Positionierung des Tropfens genau in der Mitte des Deckglases ermöglicht. Um diesen aufzubringen, wurde eine Kolbenhub-Pipette verwendet, die auf 2 µl eingestellt war. Die Kollagenlösung innerhalb der Pipette wurde bis zum ersten Druckpunkt herausgedrückt und dann auf die Mitte des Deckgläschens appliziert. Dieser Kollagentropfen wurde nun durch 30 min Lagerung bei Zimmertemperatur zum Eintrocknen gebracht. Abb.8 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme des Kollagentropfens.

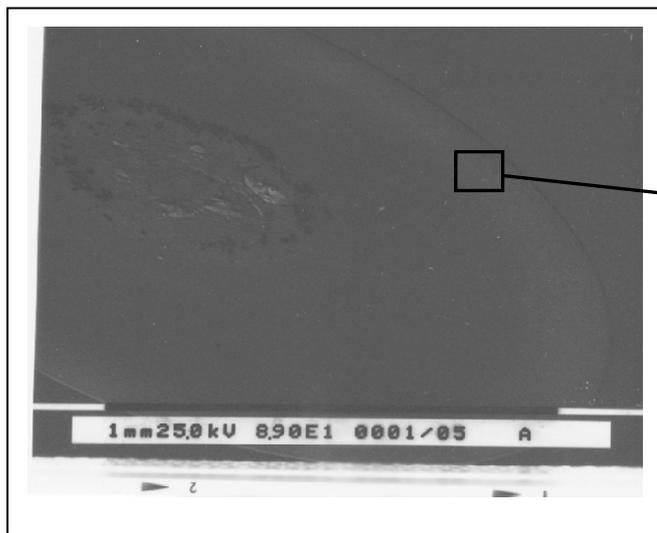


Abb. 8a

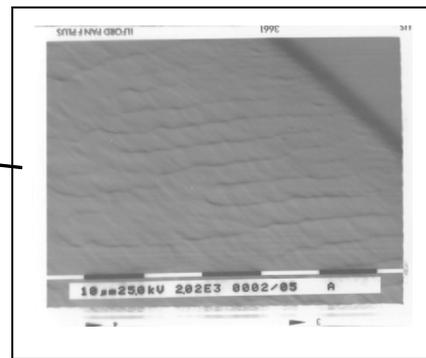


Abb. 8b

Abb.8: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Kollagentropfens. a: 900-fache Vergrößerung, b: 2000-fache Vergrößerung.

2.2.1.3 Blutentnahme

Den Probanden wurde 18 ml venöses Blut entnommen, welches in vier Natrium-Citrat-Vacutainern (Konz. 0,129M) aufgefangen wurde. Die Blutabnahme erfolgte entweder direkt aus einer Kubitalvene mittels einer 21-Gauge-Nadel oder aus der Probenentnahmeverrichtung des Blutspendesystems zu Anfang der Vollblutspende. Die Bestimmung der Plättchenkonzentration erfolgte in Citrat-Blut am Sysmex-Zellcounter. Die vier Röhrchen mit antikoaguliertem Blut wurden nun in einem 30-ml-Röhrchen zusammengeführt und mit 10 μ M Mepacrin inkubiert. Das 30-ml-Röhrchen wurde verschlossen und für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler bei 15 Umdrehungen pro Minute gelagert. Diese Zeitspanne wurde benötigt, um eine möglichst vollständige Anfärbung der Thrombozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Mepacrin zu gewährleisten.

2.2.1.4 Reinigung der Strömungskammer

Die rechteckige Flusskammer und die zugehörigen Komponenten (abführender Schlauch mit Luer Drei-Wege-Hahn, 2-ml-Spritze) wurden durch Reinigung über Nacht in einer Reinigungslösung (Edisonite Schnellreiniger) von jeglichen Rückständen befreit und in der Folge mit bidest. H₂O gründlich gespült. Zum Trocknen wurden die Bestandteile der Kammer auf

Zellstoff ausgelegt und die restliche Feuchtigkeit aus Kammerzufluss und -abfluss mit CO₂-Gas entfernt.

2.2.1.5 Vorbereitung der Strömungskammer

Ein mit Kollagentropfen beschichtetes Deckgläschen wurde mit der beschichteten Seite nach oben in den Metallrahmen der Strömungskammer eingelegt. Der trockene Acrylglasblock wurde von oben aufgelegt und die Halteschrauben wurden fest eingeschraubt. Die 2-ml-Spritze, die als Blutreservoir diente, wurde auf der blutzuführenden Seite der Kammer aufgesteckt. Anschließend wurde der abführende Schlauch mit einer Perfusorspritze verbunden, die eine Lösung 2%-ige BSA, gelöst in PBS-Puffer, enthielt. Nun wurde der Schlauch mit dem blutabführenden Ende der Kammer verbunden und die Kammer retrograd zur späteren Blutflussrichtung mit dem Puffer-BSA-Gemisch luftblasenfrei befüllt, bis sich etwa 0,5 ml der Lösung im Reservoir befanden. Die Perfusorspritze wurde sodann vom Schlauch entfernt und die gesamte Apparatur auf die Haltevorrichtung des Mikroskops aufgesetzt.

Das abführende Schlauchende wurde jetzt mit einer leeren Perfusorspritze verbunden, die bereits in die Perfusorpumpe eingelegt war.

Die Perfusorpumpe wurde dann mit einer Flussrate von 9,6 ml/h programmiert, um das im Reservoir befindliche Puffer-BSA-Gemisch in gleicher Richtung wie der spätere Blutfluss durch die Kammer hindurch zu aspirieren. Dieser Zeitpunkt dient der Kontrolle, ob das System luftblasenfrei ist, der Kollagentropfen nicht abgelöst ist und der Flüssigkeitsfluss einwandfrei funktioniert. Nachdem etwa die Hälfte der Lösung im Reservoir die Kammer passiert hatte, wurde der Perfusor gestoppt und das Reservoir abgenommen.

Eine weitere 2-ml-Spritze ohne Stempel wurde nun komplett mit Blut befüllt und unter Abdrücken der oberen Spritzenöffnung mit dem Daumen auf den Kammerzufluss aufgesteckt.

2.2.1.6 Einstellungen des Laser-Scanning-Mikroskops

- Argonlaser (100%-Leistung, Wellenlängen 458)
- optische Vergrößerung 400-fach (Zeiss Plan-Neofluar 40*/0,3-Objektiv)
- Scanmode: Time series, 25 Staks, 12 bit
- Stack-Size 512 x 256 x 30, 230,3µm x 115,1µm x 29µm
- Scaling: 0,45µm x 0,45µm x 1µm

- Beam Splitter: MBS: HFT 458
- Filter: Ch2: BP 505-550
- Pinhole: 80 μ m
- Scan-Geschwindigkeit pro Pixel: 1,12 μ s
- Scan-Geschwindigkeit pro Bild: 491,5 ms
- Detektor Gain: 670
- Amplification Offset: 0,675
- Amplification: 1,3

2.2.2 Versuchsablauf

Zur korrekten Fokuseinstellung wurde mit der Durchlichtfunktion des Mikroskops auf die Kollagenmatrix fokussiert. Sodann wurde wieder auf den Strahlengang für die Laserscanningfunktion gewechselt. An der Perfusorpumpe wurde nun der Blutfluss gestartet. Sobald das Blut den Kollagentropfen erreichte, wurde die Messung gestartet. Die Zeitserien („Time-Series“)-Funktion der Mikroskopsoftware führte nun automatisch die Einzelmessungen im voreingestellten Zeitplan durch. Es wurden so bei jedem Probanden ab Start der Messung 25 Bildstapel im Abstand von jeweils 25 Sekunden in einem Gesamtzeitraum von zehn Minuten erfasst. Jeder der 25 Bildstapel bestand aus jeweils 30 Einzelschichten, die jeweils in einem Abstand von $1\mu\text{m}$ voneinander aufgenommen wurden (Abb.9).

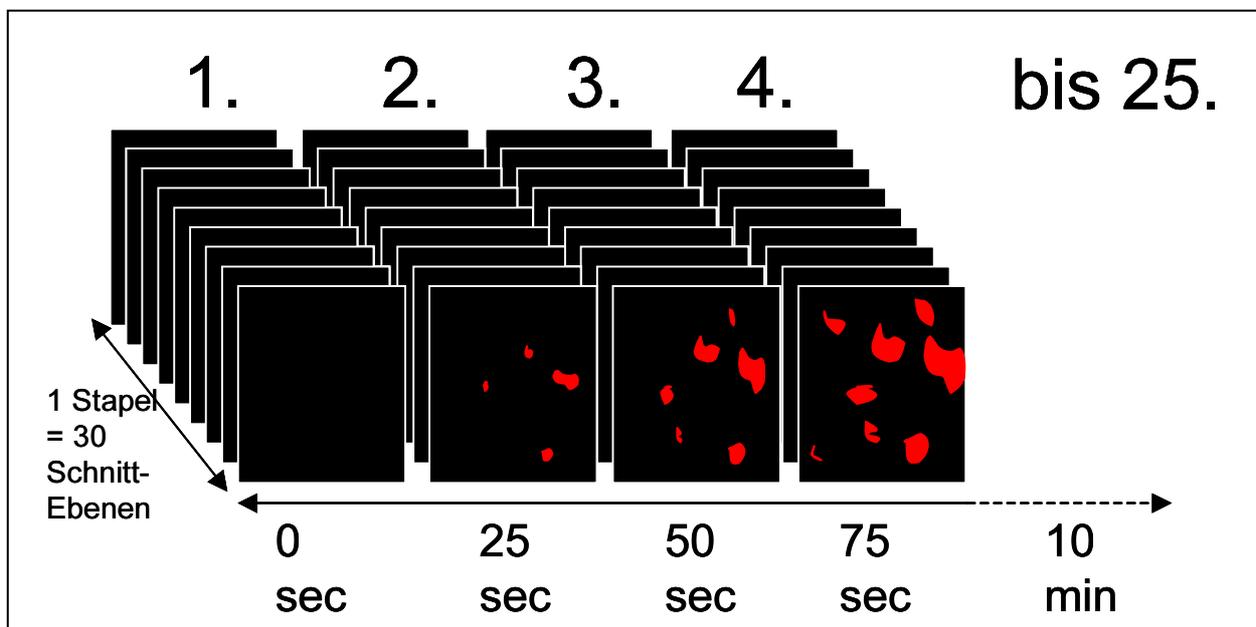


Abb.9: Darstellung der Bildakquisition durch den Computer

2.2.3 Computerverarbeitung und Auswertung der Daten

2.2.3.1 Computerverarbeitung

Die Messdaten jedes Probanden wurden von einem mikroskopsoftwareeigenen Format zu einem Standardformat exportiert. So entstanden für jede Messung jeweils 1750 fortlaufend nummerierte Einzelbilder im PNG-Format (PNG = Portable Network Graphics). Diese Einzelbilder wurden nun mit der Software „ECCET“ (Prof. Volker Aurich, Institut für Informatik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, www.eccet.de) verarbeitet und ausgewertet. Die ECCET-Software setzt die akquirierten Schnittbilder für jeden Messzeitpunkt jeweils zu einer

dreidimensionalen Abbildung zusammen. Für jeden Versuch entstanden so 25 dreidimensionale Abbildungen, die den zeitlichen Verlauf der Thrombogenese räumlich darstellten. Zur Darstellung und Auswertung der Daten wurde der Messbereich in „Voxel“ (dreidimensionales Äquivalent eines Pixels) unterteilt. Die generierten Voxel waren quaderförmig mit einer Ausdehnung von $0,45\mu$ in der X-, $0,45\mu$ in der Y- und 1μ in der Z-Achse. Ein Voxel wurde von der Software als aktiv bzw. belegt gewertet, sobald in mehr als 50 Prozent des Quaders ein Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte (siehe Abb.10).

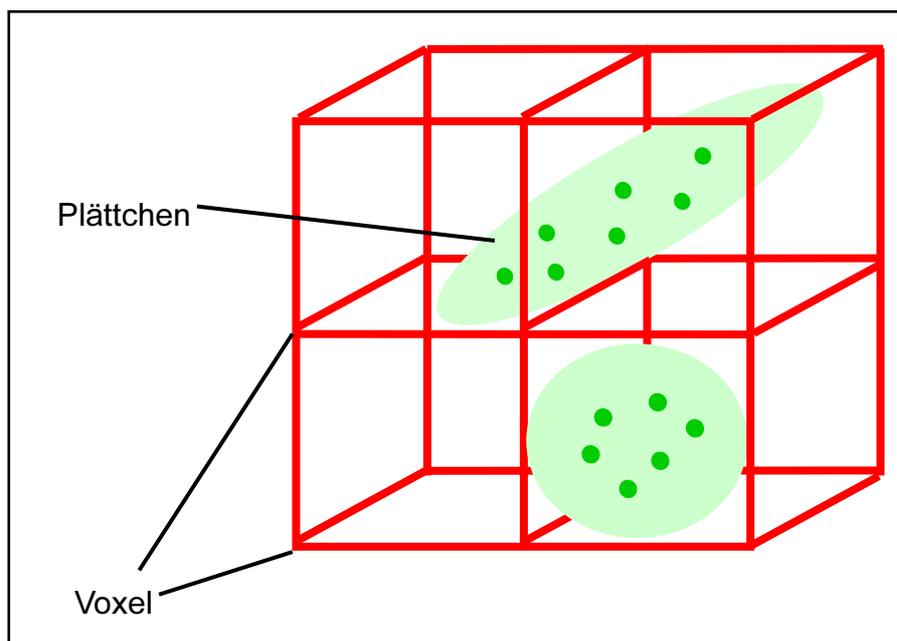


Abb.10: Schema von vier benachbarten Voxeln (rot) und zwei Thrombozyten (grün) (übernommen von V. Stoldt, Mitarbeiter des IHTM).

Jede der dreidimensional rekonstruierten Abbildungen kann folgende Bildelemente darstellen:

- „Grundrauschen“ des Fluoreszenzsignals
- Artefakte verursacht von Fluoreszenzsignalen aus nicht angesteuerten Ebenen
- Das Fluoreszenzsignal von Leukozyten, die wie Plättchen durch Mepacrin angefärbt wurden
- Das Fluoreszenzsignal von einzelnen Blutplättchen und Aggregaten von Thrombozyten unterschiedlicher Größe

Für die folgende Auswertung der Daten waren nur die letztgenannten Plättchen und Thromben relevant. Die Volumen wurden mit einem separierten linearen Gaußfilter mit Sigma = 2 in allen Achsen geglättet. Dieser Schritt sorgte für eine Bündelung (Clusterung) leicht unterbrochener Voxel, die von hinreichender Helligkeit waren. Alle Voxel, die nach dieser Operation noch einen Grauwert von über 10 hatten, wurden als Thromben markiert. Alle anderen Voxel, darunter auch das Grundrauschen und andere Fluoreszenzartefakte aus anderen Ebenen, wurden daher vom Programm unterdrückt.

Nun wurde ein „Cut-off“-Volumen gesetzt, das alle Volumina, die kleiner als 510 Voxel (ca. $100\mu\text{m}^3$) waren, unterdrückte und so nur noch Thromben anzeigte, die dieses Volumen überschritten. Somit konnten Artefakte durch einzelne Blutplättchen und Leukozyten vermieden werden. Ein Beispiel der dreidimensionalen Rekonstruktion ist in Abb.11 dargestellt.

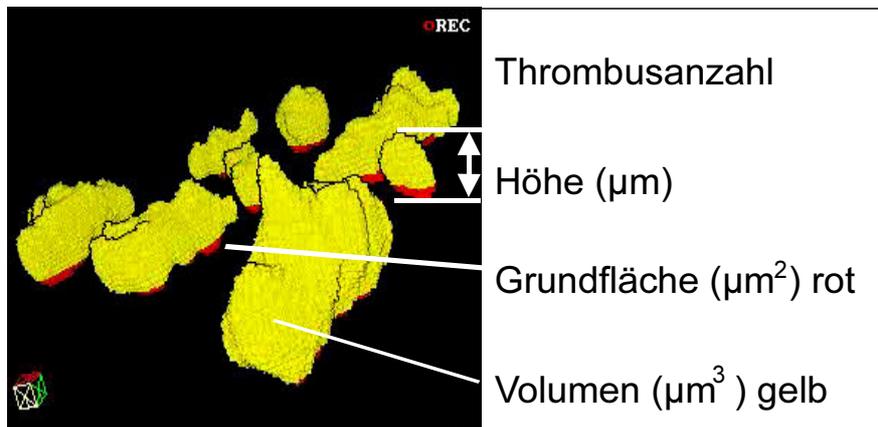


Abb.11: Dreidimensionale Rekonstruktion der Thrombogenese mit ECCET

2.2.3.2 Auswertung

Für jeden einzelnen Thrombus, der das Cut-off-Volumen überschreitet, wurden nun das Einzelvolumen (Anzahl der Voxel), die Thrombusgrundfläche (als Pixel) und die Thrombushöhe (als Pixel) ermittelt. Des Weiteren wurde zu jedem Messzeitpunkt die Anzahl der angezeigten Thromben bestimmt.

Um das Einzelthrombusvolumen zu berechnen, wurden für jeden Thrombus alle zusammenhängenden Voxel von der Software erfasst und gezählt. Die Zahl der Voxel ließ sich dann in

ein Volumen umrechnen. Die verschiedenen Einzelthrombusvolumina wurden nun für jeden Messzeitpunkt zu einem durchschnittlichen Einzelthrombusvolumen gemittelt.

Die Berechnung der Einzelthrombusgrundfläche, also die Kontaktfläche der Thromben mit der Kollagenmatrix, bereitete Schwierigkeiten, da die Kollagenmatrix auf den Aufnahmen nicht zu sehen ist und keine völlig plane Oberfläche darstellt. Somit musste für jeden Thrombus separat seine Anhaftungsfläche an eine virtuelle Bodenebene errechnet werden. Hierzu wurden jeweils die beiden untersten Voxelreihen von jedem Thrombus gemittelt und als Grundfläche ausgewiesen.

Die Einzelthrombushöhe ließ sich nach Ermittlung der Grundfläche der Thromben errechnen, indem die Software die Voxel zwischen Grundfläche und höchstem Punkt des Einzelthrombus bestimmte. Die Anzahl der Voxel wurde nun für jeden Messzeitpunkt in eine Thrombushöhe umgerechnet und zu einer durchschnittlichen Einzelthrombushöhe gemittelt.

Die ermittelten Daten wurden zur grafischen Auswertung in die Microsoftsoftware EXCEL importiert und dort als trigeometrische Maßeinheiten in Abhängigkeit von der Messzeit umgerechnet und als Diagramme dargestellt.

2.2.4 Statistische Auswertungen

Die Auswertung der Stichproben wurde mit dem Statistikprogramm „IntStat“ durchgeführt.

Für jede Stichprobe wurden aus den Ergebnissen der Strömungsversuche der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) ermittelt. Bei diesen Vergleichen wurde jeweils der Mittelwertdifferenztest des Student-t-Tests verwendet, da der Stichprobenumfang ($n < 30$) gering ist. Die Testgröße lautete jeweils

$$t = \frac{\text{Mittelwertdifferenz}}{\text{Standardfehler}}$$

Hier wurde der sog. Mittelwertdifferenztest (Hypothesentest) für unabhängige Stichproben gewählt, der normal verteilte Grundgesamtheiten und gleiche Grundgesamtheits-Standardabweichungen voraussetzt.

Die Formel lautet:

$$t = \frac{\bar{D}}{\hat{\sigma}_{\bar{D}}}$$

wobei $\bar{D} = \bar{x} - \bar{y}$

$$\text{und } \hat{\sigma}_{\bar{D}} = \sqrt{\frac{\hat{\sigma}_x^2}{n_x} + \frac{\hat{\sigma}_y^2}{n_y}} = \sqrt{\frac{n_x + n_y}{n_x \cdot n_y}} \cdot \hat{\sigma} = \sqrt{\frac{n_x + n_y}{n_x \cdot n_y}} \cdot \sqrt{\frac{n_x \cdot s_x^2 + n_y \cdot s_y^2}{n_x + n_y - 2}}$$

$$\text{sodass } t = \frac{\bar{D}}{\left(\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y}\right)^{1/2} \cdot \left(\frac{\sum x_i^2 - n_x \bar{x} + \sum y_i^2 - n_y \bar{y}}{n_x + n_y - 2}\right)^{1/2}}$$

Die Anzahl der Freiheitsgrade beträgt hier $n_x + n_y - 2$.

Im Vergleich der Thrombogenese der unterschiedlichen Genotypen von HPA-1 wurde der Hypothesentest teilweise mehrfach auf eine untersuchte Grundgesamtheit angewendet. Um eine Alphafehler-Kumulation zu vermeiden, wurde in diesen Fällen die Bonferroni-Korrektur verwendet, um das Signifikanzniveau anzupassen (Benjamini und Hochberg, 1995). Die Bonferroni-Methode ermöglicht die repetitive Anwendung eines statistischen Hypothesentestverfahrens auf eine Grundgesamtheit, also die Überprüfung multipler Hypothesen, ohne dabei das Risiko zu erhöhen einen Fehler 1. Art zu begehen. Dies wird realisiert, indem das Signifikanzniveau mit Hilfe der Bonferroni-Gleichung an die Zahl der auf dieselbe Grundgesamtheit angewandten Hypothesentestungen angepasst wird.

Das Signifikanzniveau α , welches zugrundegelegt wird für die Testung von nur einer Hypothese, wird geteilt durch die Anzahl der durchgeführten Hypothesentestungen n und es ergibt sich das Signifikanzniveau α' , welches für die Testung von multiplen Hypothesen mit dem verwendeten Testverfahren angelegt wird. Die Formel lautet daher: $\alpha' = \alpha/n$,

wobei α für die hier durchgeführten Experimente festgelegt wurde auf 0,05.

Eine Besonderheit in der Anwendung der Bonferroni-Korrektur ergibt sich, wenn die Reihenfolge der durchgeführten multiplen Hypothesentestungen nicht zufällig ist, sondern vorab festgelegt wird. Setzt man vor der Testanwendung eine verbindliche Reihenfolge der Testung der Hypothesen fest, kann der erste durchgeführte Test mit dem initialen Signifikanzniveau α

überprüft werden. Ergibt sich hier ein p-Wert $< \alpha$ so muss das Signifikanzniveau beim nächsten Hypothesentest nicht verändert werden. Nur wenn sich $p > \alpha$ ergibt, wird für den nächsten Test das Signifikanzniveau angepasst. α' ergibt sich hier also aus dem Ausgangssignifikanzniveau α geteilt durch die Zahl der vorangegangenen Testungen mit nicht signifikanten p-Werten (Salkind, 2006).

Bei den hier durchgeführten statistischen Überprüfungen wurde noch vor Versuchsbeginn festgelegt, in welcher Reihenfolge die statistische Testung erfolgt. Die Hypothesentestung erfolgte für die verschiedenen Auswertungsmodalitäten (mittleres Einzelthrombusvolumen, mittlere Einzelthrombushöhe, mittlere Thrombuszahl und mittlere Einzelthrombusgrundfläche) jeweils zu folgenden Versuchszeitpunkten in der angegebenen Reihenfolge: 600s, 475s, 350s, 250s sowie 150s nach Versuchsbeginn.

3 Ergebnisse

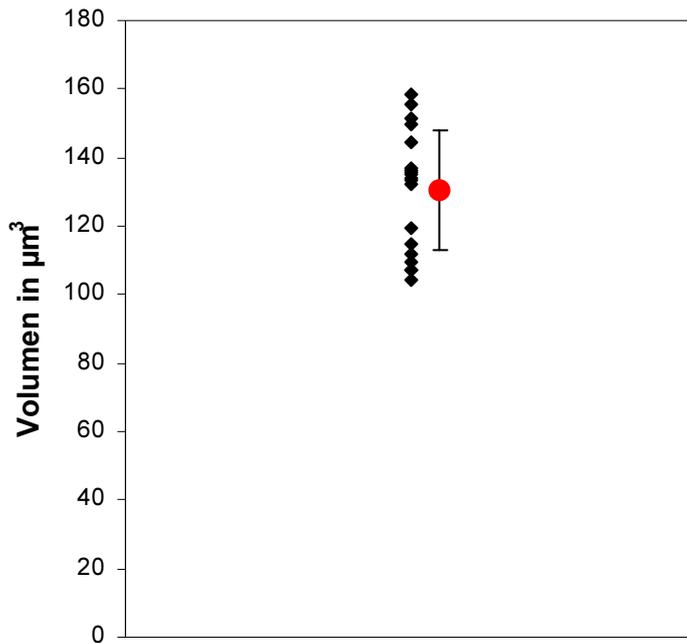
3.1 Darstellungsweise der Ergebnisse

Die Darstellung vierdimensionaler Daten auf dem zweidimensionalen Medium Papier wirft erhebliche Probleme auf. Videosequenzen sind wesentlich besser in der Lage, die zeitliche Dynamik der Thrombogenese und somit die vierte Auswertungsdimension darzustellen. Da jedoch auch diese Darstellungsweise Probleme hat, die dritte, räumliche Dimension darzustellen, wurden virtuelle Lichtquellen und Perspektivwechsel benutzt, um Dreidimensionalität zu simulieren und somit der Komplexität der Daten gerecht zu werden. Daher sind die hier gezeigten Bildabbildungen nur begrenzt imstande, die gesamten Rohdaten darzustellen. Eine Auswahl von zwei Videos, die die vierdimensionale Thrombogenese darstellen findet sich unter <http://bv.acs.uni-duesseldorf.de/projects/thrombo.html> .

3.2 Validierung des experimentellen Verfahrens

3.2.1 Experimentelle Varianz

Um methodenbedingte Messfehler unabhängig von der biologischen Variabilität zu bestimmen, wurde das Volumen von Mikrosphären mit dem Durchmesser von $6\mu\text{m}$ wiederholt (20-mal) bestimmt.



MW	130,42
SD	17,49
SEM	4,01
Min	104,29
Max	158,56
MED	134,06
U 95% CI	121,99
O 95% CI	138,85
# Beads	19

Abb.12: Erhebung der experimentellen Varianz des Messverfahrens durch wiederholte Volumenmessung an Mikrosphären mit einem definierten Durchmesser von $6\mu\text{m}$. • = MW; Fehlerbalken= SD

Tab.2: Statistische Daten zu Abb.12

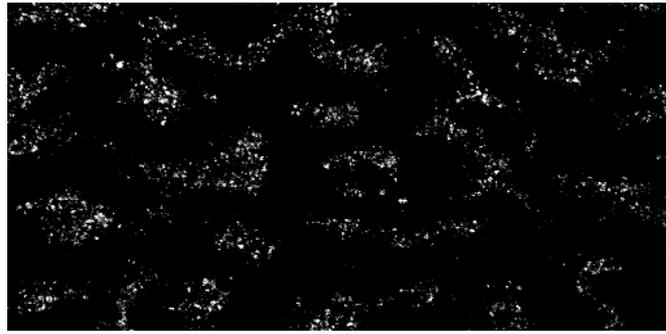
Das Volumen der Mikrosphären konnte mit einer SD von 13 Prozent bezogen auf den Mittelwert bestimmt werden. Der Standardmessfehler (SEM) betrug drei Prozent vom MW. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 und Tab.02 dargestellt.

3.2.2 Spezifität der Plättchenadhäsion

3.2.2.1 Spezifität zur Kollagenmatrix

Um zu zeigen, dass die Thrombozyten spezifisch an der Kollagenmatrix adhären und nicht unspezifisch auf dem Deckglas, wurden Kontrollexperimente ohne Kollagenmatrix durchgeführt. Im ersten Experiment wurde ein Strömungsexperiment mit Vollblut, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Im zweiten wurde sowohl die Beschichtung mit Kollagen als auch die Spülung mit 2%-BSA-Lösung (Bovines Serum Albumin) unterlassen. Im dritten Experiment befand sich ebenfalls keine Kollagenmatrix auf dem Deckglas, die BSA-Spülung wurde jedoch nach Versuchsprotokoll durchgeführt.

a)



b)



c)



Abb.13: Thrombozytenadhäsion unter flussdynamischen Bedingungen nach 10 Minuten an verschiedene Oberflächen. a) Kollagenmatrix und BSA-Spülung, b) ohne Kollagenmatrix und ohne BSA-Spülung, c) ohne Kollagenmatrix und mit BSA-Spülung.

Es zeigte sich ein normales Adhäsionsverhalten im Standardexperiment (Abb. 13a), hingegen adhärten erwartungsgemäß keine oder nur wenige Thrombozyten in den Kontrollexperimenten ohne spezifische Kollagenmatrix (Abb.13 b und c). Es wurde nur ein schwaches Fluoreszenzsignal detektiert. Dies ist auf unspezifische Adhäsion an den Glasobjektträger zurückzuführen. In Abb.13c ist fast kein Fluoreszenzsignal zu sehen, da hier die unspezifische Adhäsion an Glas durch BSA verhindert wird.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Adhäsion im Standard-Versuchsaufbau auf einer spezifischen Interaktion der Blutplättchen mit der Kollagenmatrix und nicht einer unspezifischen Wechselwirkung mit der Glasoberfläche beruht.

3.2.3 Spezifität des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors

Um die Spezifität von $\alpha_{IIb}\beta_3$ bei der Entstehung von Thromben im In-vitro-Flussmodell zu zeigen, wurden Kontrollexperimente mit Abciximab durchgeführt. Abciximab blockiert spezifisch das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in dessen Eigenschaft, Fibrinogen zu binden.

Zu diesem Zweck wurde das Spenderblut, wie im Standard-Versuchsaufbau beschrieben, vorbereitet und kurz vor dem Strömungsversuch mit Abciximab, in zwei verschiedenen Konzentrationen, versetzt (Konz. 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Inkubationszeit 10 min).

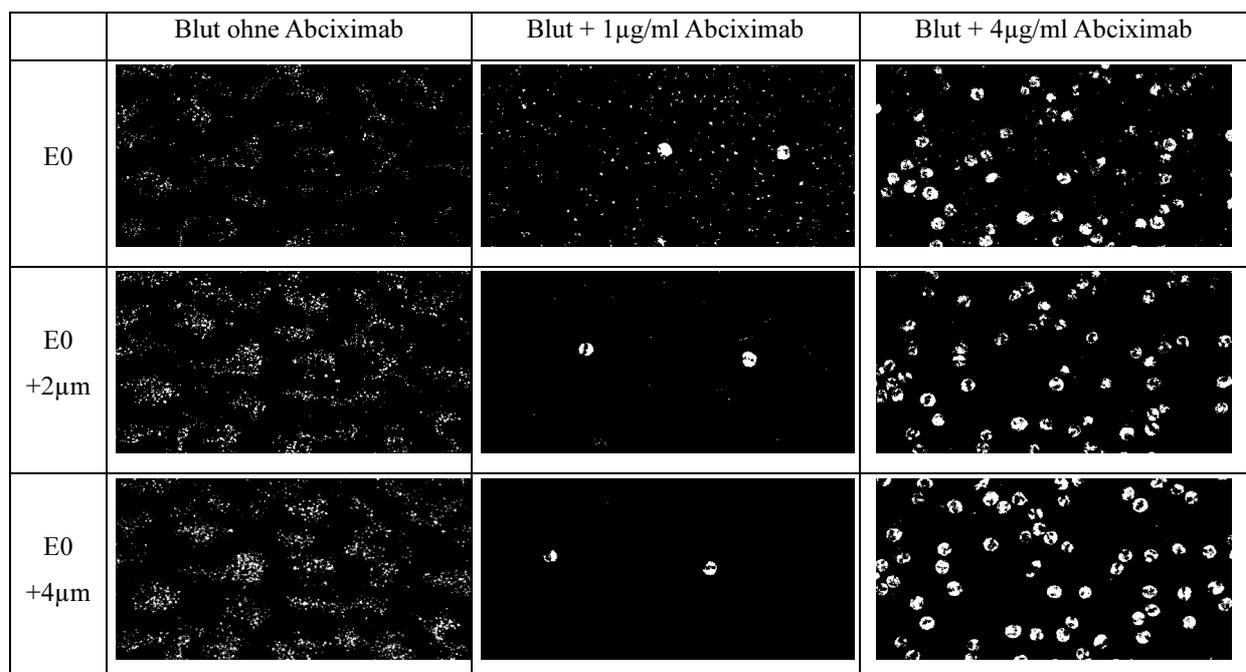


Abb.14: Thrombogenese unter flussdynamischen Bedingungen nach 10 min, nativ und unter Zugabe von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Abciximab (Inkubationszeit: 10 min). E0 entspricht der Höhe der Kollagen-Matrix in der Strömungskammer. Für jeden Versuch ist jeweils das Fluoreszenzsignal aus dieser Ebene und den jeweils 2 bzw. 4 μm darüber liegenden Ebenen abgebildet. Das Experiment ohne Abciximab zeigt eine normale Thrombusbildung. Unter Abciximab-Zugabe findet man eine Adhäsion ohne Thrombusbildung und vereinzelte bzw. bei höherer Abciximabkonzentration zahlreiche Leukozyten (große weiße Punkte). Vergrößerte durchlichtmikroskopische Darstellung in Abb.15.

Direkt auf der Kollagenoberfläche (Ebene 0) ist das Fluoreszenzsignal der Blutplättchen bei beiden Abciximabkonzentrationen deutlich zu sehen (kleine weiße Punkte). Oberhalb dieser Ebene wird kaum noch ein Signal der Thrombozyten detektiert.

Unter Zusatz von Abciximab bleibt die **Adhäsion** der Plättchen an Kollagen nahezu unbeeinflusst. Die Aggregatbildung und das Wachstum der Thromben in Z-Orientierung und somit ihre Höhe sind jedoch stark eingeschränkt. Es entsteht lediglich ein „Teppich“ von adhärenenten Plättchen.

Unter Anwendung von Abciximab wurde nach etwa 5-minütigem Blutfluss eine Zunahme an Leukozyten sichtbar. Diese rollten mit geringer Geschwindigkeit über die Oberfläche (große, kreisförmige, weiße Punkte in Abb.14). Die Zahl der zu beobachtenden Leukozyten stieg mit der Applikation höherer Abciximabmengen deutlich an.

Leukozyten werden ebenfalls durch den Farbstoff Mepacrin angefärbt. Sie werden in den Standard-Flusseexperimenten zur Erfassung der Thrombogenese nicht erfasst, da sie sich oberhalb der Fokusebene und mit sehr hoher Geschwindigkeit durch Laser- und Detektorstrahl bewegen.

Das Phänomen ließ sich auch in der Durchlichtmikroskopie darstellen. Die Leukozyten rollten auf der Thrombozytenschicht, die sich über der Kollagenmatrix gebildet hatte. Sie „rissen“ dabei Blutplättchen von der Kollagenoberfläche ab. Die Leukozyten zeigten eine veränderte Oberfläche. Hierbei könnte es sich um anhaftende Plättchen oder Thrombozytenbestandteile handeln. Abb.15a/b zeigen Standbilder aus einer Videosequenz des Phänomens.

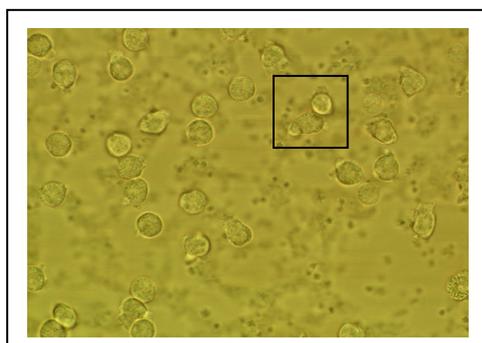


Abb.15a: Durchlichtmikroskopisches Bild von Leukozytenansammlungen, die unter Anwendung von Abciximab (1µg/ml) nach etwa 5-minütigem Blutfluss auftraten (350-fache Vergrößerung). Eine digitale Ausschnittsvergrößerung (Rechteck) ist in Abb.15b gezeigt.

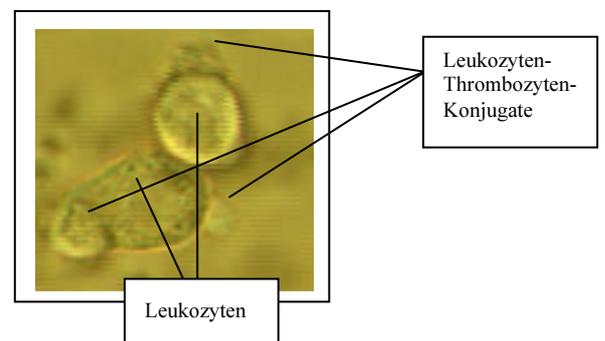


Abb.15b: Digitale Ausschnittsvergrößerung aus Abb.15a (Rechteck) zeigt zwei Leukozyten mit thrombozytären Konjugaten (1500-fache absolute Vergrößerung).

3.3 Intraindividuelle Varianz der Messmethode

Zur Bestimmung der intraindividuellen Varianz wurden Experimente mit dem Blut eines Probanden wiederholt durchgeführt. Das Blut wurde für jeden Versuch durch Venenpunktion entnommen und sofort, entsprechend den Standard-Versuchsbedingungen, dem Strömungsexperiment zugeführt. Es wurden insgesamt acht Versuche mit dem Blut eines gesunden, medikationsfreien, 24 Jahre alten Probanden durchgeführt. Sein Genotyp bezogen auf den HPA1-Polymorphismus ist HPA-1a/1a.

Alle folgenden Abbildungen zeigen verschiedene Messparameter desselben Datensatzes von acht identisch durchgeführten Experimenten mit dem Blut eines Probanden. Unter Zugabe von Abciximab ist die Thrombusbildung so stark inhibiert, dass die Thrombengröße zu keinem Messzeitpunkt das Cut-off-Volumen von $100\mu\text{m}^3$ überschreitet.

3.3.1 Gesamt-Thrombusvolumen

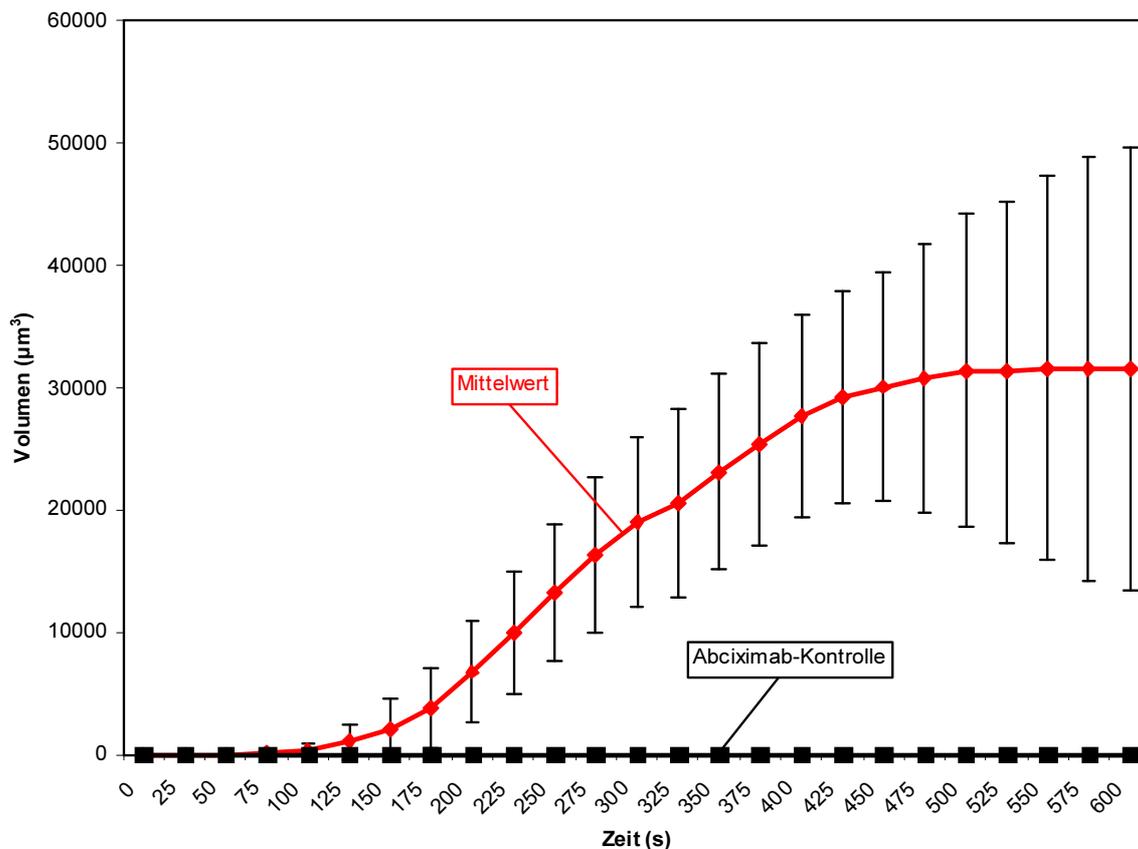


Abb.16: Mittleres Gesamt-Thrombusvolumen. 8 Experimente und Abciximab-Kontrolle. X-Achse: Zeit in Sekunden. Messpunkte (●) entsprechen dem arithmetischen Mittel der 8 Messungen und der Standardabweichung (Fehlerbalken). Weiter ist eine Kontrolle (■) unter Zugabe von Abciximab (1µg/ml) gezeigt.

Das Auswertungsverfahren Gesamt-Thrombusvolumen errechnet zu jedem Messzeitpunkt die Summe aller Voxel bzw. Volumina der Thromben, die in ihrer Größe das Cut-off-Volumen überschreiten.

Nach einer Latenzperiode von 75 Sekunden, in der die Thromben wachsen, bis sie das Cut-off-Volumen erreicht haben, folgt ein kontinuierlicher Anstieg des Gesamt-Thrombusvolumens bis zur achten Versuchsminute. Ab der achten Minute bleibt das mittlere Gesamtvolumen bis Versuchsende konstant.

Die Standardabweichung bzw. der Standardmessfehler lagen bei diesem Auswertungsverfahren mit 29 bis 85 Prozent bzw. 10 bis 51 Prozent des MW inakzeptabel hoch.

3.3.2 Mittlere Thrombenanzahl

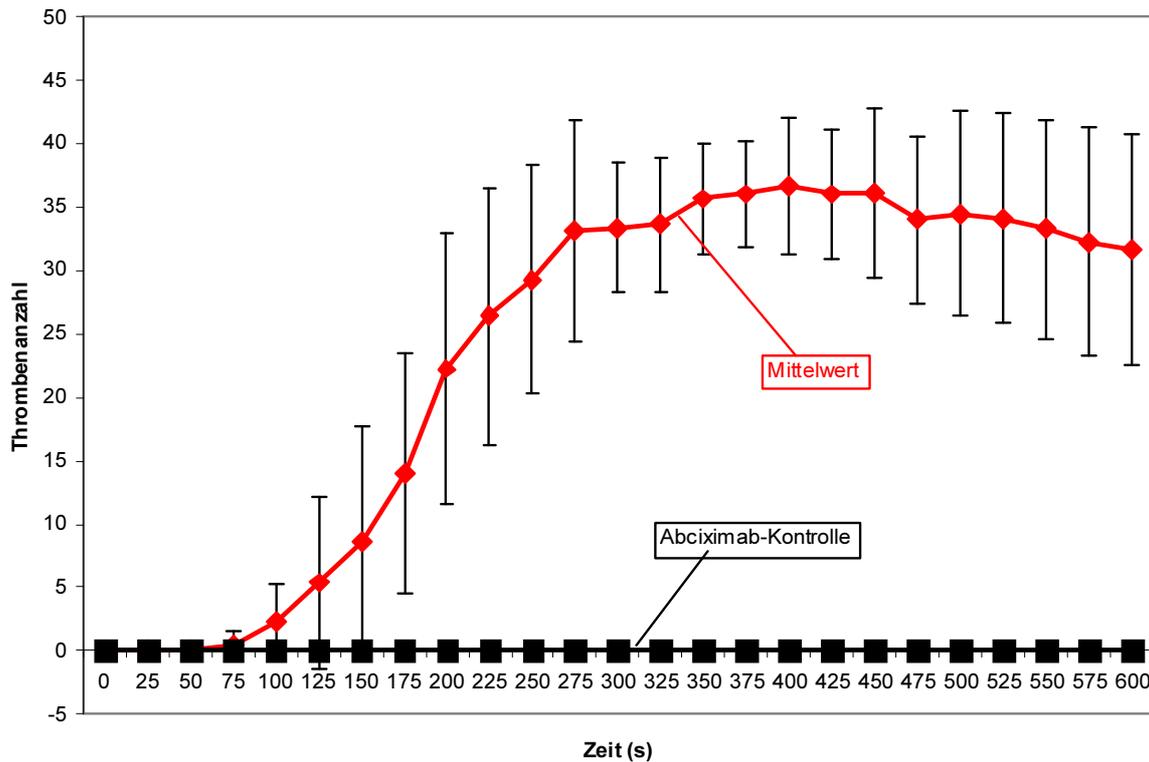


Abb.17: Mittlere Thrombenanzahl. 8 Experimente und Abciximab-Kontrolle. X-Achse: Zeit in Sekunden. Messpunkte (●) entsprechen dem arithmetischen Mittel der 8 Messungen und der Standardabweichung (Fehlerbalken). Weiter ist eine Kontrolle (■) unter Zugabe von Abciximab ($1\mu\text{g/ml}$) gezeigt.

Das Auswertungsverfahren zur Bestimmung der Thrombusanzahl errechnet zu jedem Messzeitpunkt die Summe aller Einzelthromben, die in ihrer Größe das Cut-off-Volumen überschreiten.

Die Thrombusanzahl stieg ab Erreichen des Cut-off-Volumens kontinuierlich und steil an. Ab 275s erreichte die Thrombusanzahl ein Plateau.

Die durchschnittliche SD der Thrombusanzahl lag, bezogen auf den Mittelwert, mit 39 Prozent sehr hoch.

Da das Gesamt-Thrombusvolumen direkt von der Anzahl der Thromben abhängt, steht ebenfalls dessen Messfehler im direkten Zusammenhang mit dem Messfehler der Thrombusanzahl. Daher wurde nun ein Messparameter ausgewählt, der die Darstellung des Thrombusvolumens unabhängig von der Messung der Thrombusanzahl erlaubt.

3.3.3 Mittleres Einzelthrombusvolumen

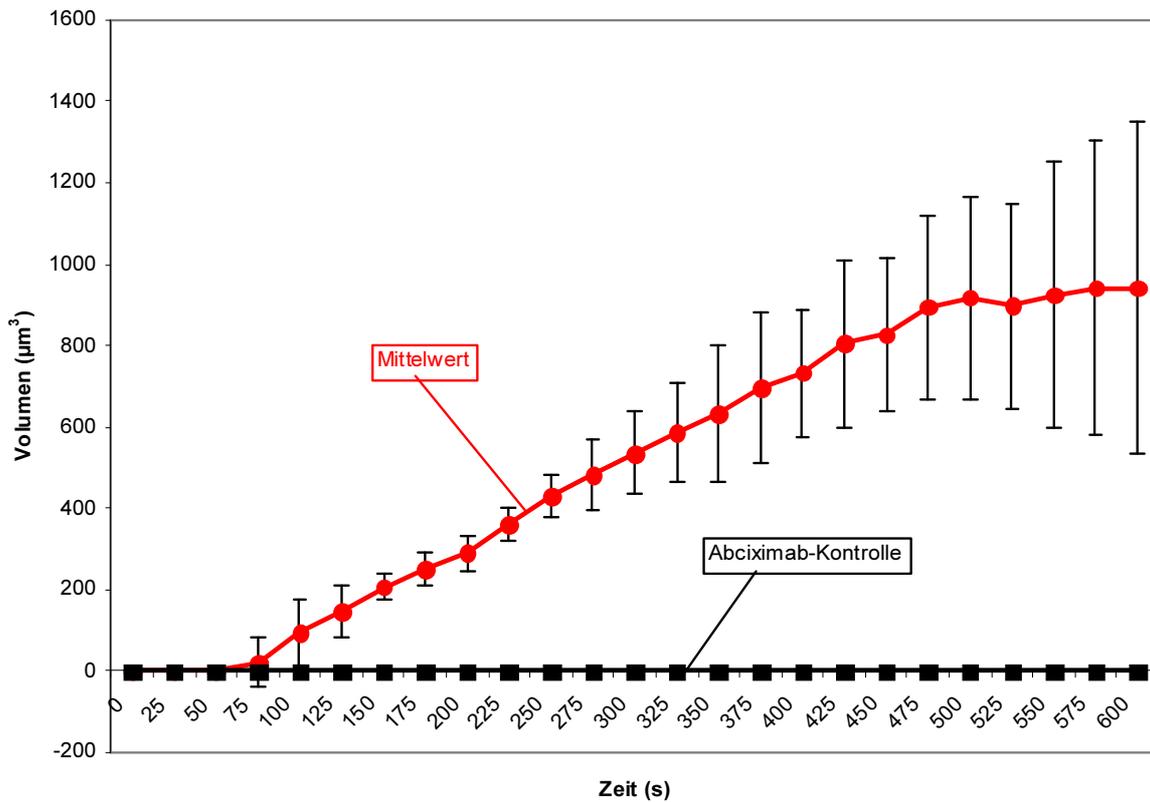


Abb.18: Mittleres Einzelthrombusvolumen. 8 Experimente und Abciximab-Kontrolle. X-Achse: Zeit in Sekunden. Messpunkte (●) entsprechen dem arithmetischen Mittel der 8 Messungen und der Standardabweichung (Fehlerbalken). Weiter ist eine Kontrolle (■) unter Zugabe von Abciximab ($1\mu\text{g/ml}$) gezeigt.

Das Auswertungsverfahren zur Bestimmung des Einzelthrombusvolumens errechnet zu jedem Messzeitpunkt für jeden Thrombus, der das Cut-off-Volumen überschreitet, das jeweilige Einzelvolumen und bildet den Mittelwert dieser Einzelthrombusvolumina.

Das durchschnittliche Einzelthrombusvolumen erreichte ab 75s das Cut-off-Volumen von $100\mu\text{m}^3$ und stieg bis 500s fast linear (Korrelationskoeffizient der linearen Regression $R^2 = 0,999$) mit einer Steigung von $2,16\mu\text{m}^3$ pro Sekunde an. Bei 500s erreichte das Einzelthrombusvolumen sein Maximum von durchschnittlich $850\mu\text{m}^3$ pro Thrombus und blieb bis zum Versuchsende fast konstant bei diesem Wert.

Der Verlauf des durchschnittlichen Einzelthrombusvolumens konnte daher in drei Phasen eingeteilt werden:

- 1) „Verzögerungsphase“, in der die Thromben unterhalb des Cut-off-Volumens heranwuchsen.
- 2) „Wachstumsphase“, in der die Thromben bis zum Erreichen des Maximums linear und nun messbar wuchsen.
- 3) „Plateauphase“, in der das Thrombusvolumen nahezu konstant blieb.

Die Standardabweichung lag mit 44 bis 86 Prozent des MW während der ersten drei Messzeitpunkte der Wachstumsphase relativ hoch, verursacht durch die Variation des Startpunktes der Wachstumsphase von Versuch zu Versuch. Ein Unterschied von nur einem Messzeitpunkt verursacht hier große Messfehler.

Im weiteren Verlauf der Wachstumsphase verringerte sich die SD auf 11 bis 25 Prozent (durchschnittlich 19 Prozent) des Mittelwertes. Der durchschnittliche Standardmessfehler in diesem Bereich betrug nur sieben Prozent vom MW.

In der Plateauphase erhöhte sich die durchschnittliche SD auf 32 Prozent vom Mittelwert.

Die Wachstumsphase abzüglich der ersten drei Messzeitpunkte schien der Bereich in der Messung des Einzelthrombusvolumens zu sein, der sich am besten für vergleichende Messungen eignete.

3.3.4 Mittlere Einzelthrombusgrundfläche

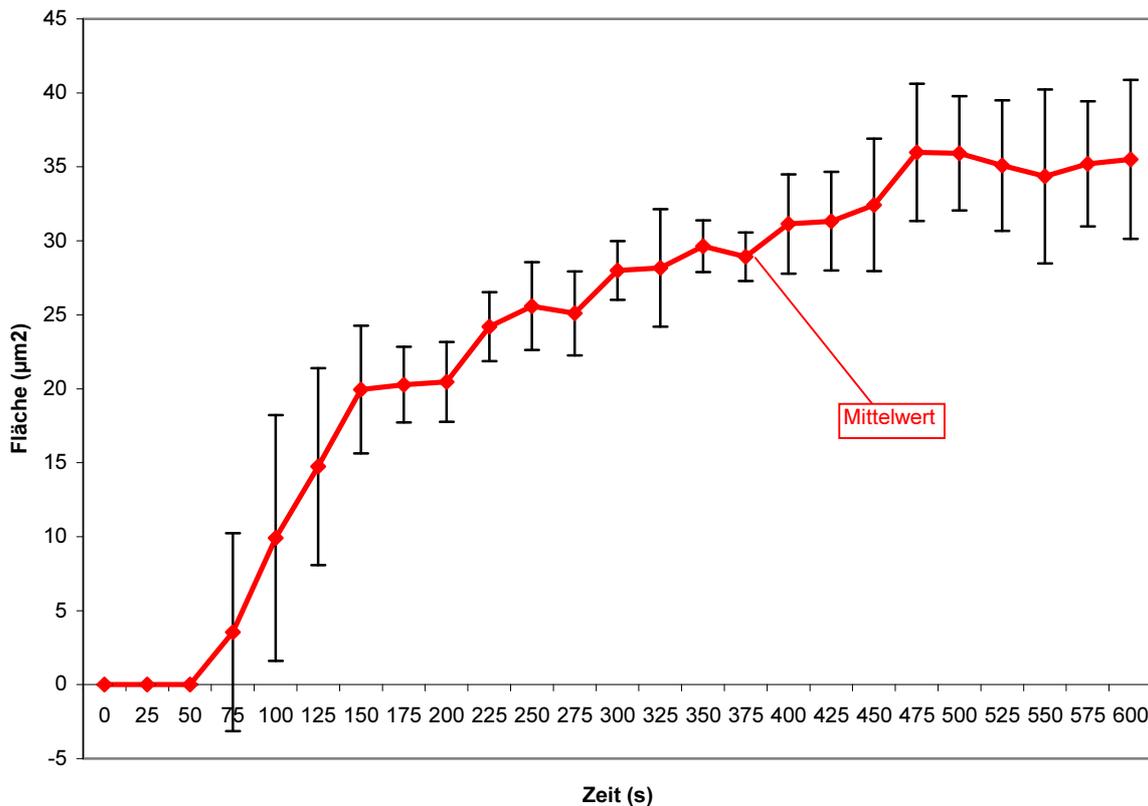


Abb.19: Mittlere Einzelthrombusgrundfläche. 8 Experimente. X-Achse: Zeit in Sekunden. Messpunkte (●) entsprechen dem arithmetischen Mittel der 8 Messungen und der Standardabweichung (Fehlerbalken).

Das Auswerteverfahren zur mittleren Einzelthrombusgrundfläche errechnet für jeden Thrombus, der das Cut-off-Volumen überschreitet, separat die jeweilige Adhäsionsfläche mit der Kollagenmatrix.

Ab Messzeitpunkt 50s stieg die durchschnittliche Einzelthrombusgrundfläche steil an, nach etwa 2,5 Minuten nur noch sehr langsam, erreichte bei Minute 8 ihr Maximum und blieb dann bis zum Versuchsende konstant.

Da die Grundfläche der Thromben bereits ab Zeitpunkt 0 kontinuierlich anwuchs, jedoch erst mit dem Erreichen des Cut-off-Volumens berechnet wurde, ergab sich im Zeitraum zwischen Messzeitpunkt 50 und 150s ein scheinbar sprunghafter Anstieg der Thrombusgrundfläche, da die Einzelthromben hier nach und nach das Cut-off-Volumen erreichten.

Die Tatsache, dass die Thromben das Cut-off-Volumen zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreichten, bedingt die zwischen 50 und 150s langen Standardabweichungen hinsichtlich der Versuchsdauer. Außerhalb dieses Zeitraums lag die SD bezogen auf den Mittelwert mit durchschnittlich zwölf Prozent auf einem niedrigen Niveau.

3.3.5 Mittlere Einzelthrombushöhe

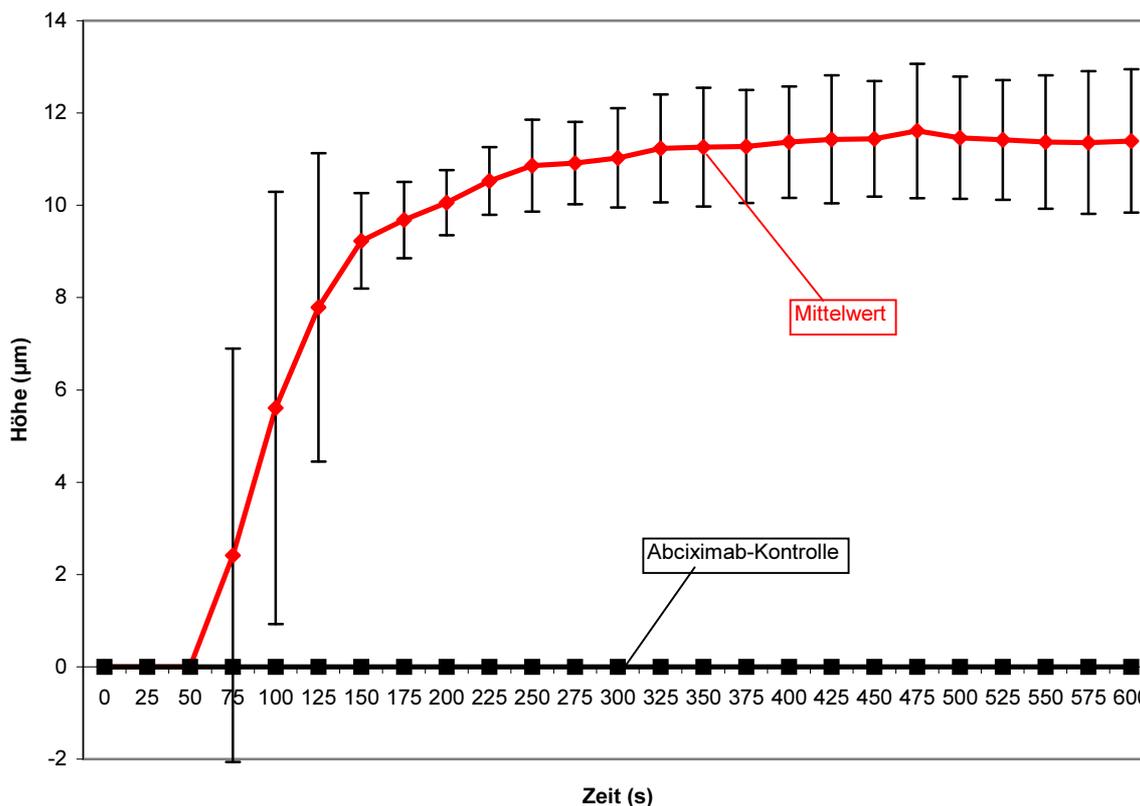


Abb.20: Mittlere Einzelthrombushöhe. 8 Experimente und Abciximab-Kontrolle. X-Achse: Zeit in Sekunden. Messpunkte (●) entsprechen dem arithmetischen Mittel der 8 Messungen und der Standardabweichung (Fehlerbalken). Weiter ist eine Kontrolle (■) unter Zugabe von Abciximab (1µg/ml) gezeigt.

Das Auswerteverfahren mittlere Einzelthrombushöhe errechnet für jeden Thrombus, der das Cut-off-Volumen überschreitet, separat den Abstand zwischen vorher berechneter Grundfläche und der Thrombusspitze.

Die Thrombushöhe stieg nach Erreichen des Cut-off-Volumens bei 75s steil an und erreichte bereits nach 225 Sekunden 90 Prozent der Maximalhöhe. Ab 325s blieb die Einzelthrombushöhe nahezu konstant bis zum Ende der Versuchszeit.

Analog zur Einzelthrombusvolumen- und Grundflächenberechnung entstanden auch bei der Berechnung der Thrombushöhe starke Schwankungen der Messwerte im Bereich zwischen den Messzeitpunkten 75 und 125s.

Die Standardabweichungen außerhalb dieses Bereiches waren mit sechs bis 13 Prozent und durchschnittlich elf Prozent vom MW relativ niedrig. Der Standardmessfehler lag zwischen zwei und fünf Prozent des Mittelwertes.

3.4 Thrombusbildung über die Zeit bei homozygoten HPA-1a- und HPA-1b-Blutspendern

Zur Klärung der Frage, ob es Unterschiede in der In-vitro-Thrombogenese zwischen Probanden mit dem Genotyp HPA-1a/1a und HPA-1b/1b gibt, wurde eine Serie von Experimenten nach Standard-Versuchsaufbau mit dem Blut von acht Blutspendern des HPA-1a/1a-Genotyps und sieben Blutspendern des HPA-1b/1b-Genotyps durchgeführt.

Die beiden Populationen von Spendern zeigten keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf das mittlere Lebensalter sowie die mittlere Thrombozytenkonzentration.

Die Thrombogenese der acht bzw. sieben Spender wurden im Hinblick auf die Parameter **mittlere Thrombusanzahl** (3.4.1), **mittleres Einzelthrombusvolumen** (3.4.2), **mittlere Einzelthrombusgrundfläche** (3.4.3) und **mittlere Einzelthrombushöhe** (3.4.4) hin untersucht und miteinander verglichen.

Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils den Mittelwert der verschiedenen Messparameter der jeweiligen Population von Blutspendern aufgetragen über die Versuchszeit. Im Gegensatz zu der Darstellung der Thrombogenese im vorangegangenen Abschnitt zeigen die Fehlerbalken in den folgenden Abbildungen nicht die SD der jeweiligen Messung sondern den SEM. Diese Darstellungsweise wurde gewählt, um die Übersichtlichkeit zu verbessern. Die Tatsache, dass in den Abbildungen SEM anstelle von SD verwendet wird, hat jedoch keine Auswirkung auf die statistische Testung, da hier die Rohdaten der Einzelmessungen zugrundeliegen.

3.4.1 Mittlere Thrombusanzahl

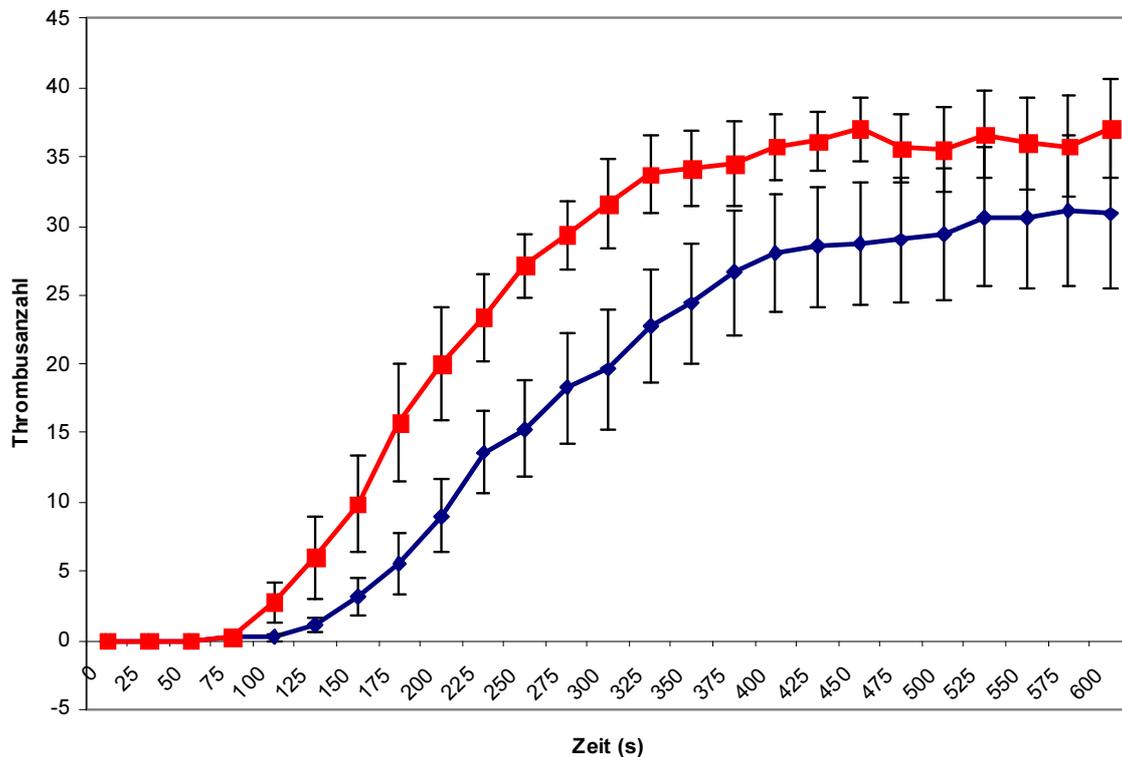


Abb.21: Mittlere Thrombusanzahl. X-Achse: Zeit in Sekunden. HPA-1a/1a \blacklozenge (n=8), HPA-1b/1b \blacksquare (n=7). Fehlerbalken zeigen den Standardmessfehler.

Die durchschnittliche Thrombusanzahl durchlief anfangs bei beiden Genotypen eine Latenzphase, in der noch keine Thromben gezählt werden konnten, da das Cut-off-Volumen noch nicht erreicht wurde. Dieses wurde von den Thromben der HPA-1b/1b-Gruppe nach 75 Sekunden erreicht. Die Thrombusanzahl stieg ab diesem Zeitpunkt steil an, und nach etwa 5 Minuten war schon fast die maximale durchschnittliche Thrombuszahl erreicht. Nach diesem Zeitpunkt blieb die Thrombuszahl nahezu konstant bis zum Versuchsende. Die Latenzphase zum Erreichen des Cut-off-Volumens dauerte bei der HPA-1a-Gruppe 25 Sekunden länger. Die ersten Thromben waren zum Zeitpunkt 100s messbar. Ab diesem Zeitpunkt stieg die durchschnittliche Thrombuszahl flacher an als die der HPA-1b-Gruppe, was sich in einem deutlichen Unterschied in der Thrombuszahl zwischen den beiden Gruppen zeigte. Da das Thrombusvolumen der HPA-1a-Gruppe jedoch länger anstieg und damit sein Maximum erst etwa eine Minute vor Versuchsende erreichte, glich sich die durchschnittliche Anzahl der Thromben von beiden Gruppen zum Versuchsende an.

Die mittlere Thrombusanzahl der beiden Genotypen wurde zu den Messzeitpunkten 600, 475, 350, 250 und 150 Sekunden statistisch auf einen Unterschied der jeweiligen Mittelwerte hin überprüft. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der mittleren Thrombusanzahl der beiden Genotypen.

3.4.2 Mittleres Einzelthrombusvolumen

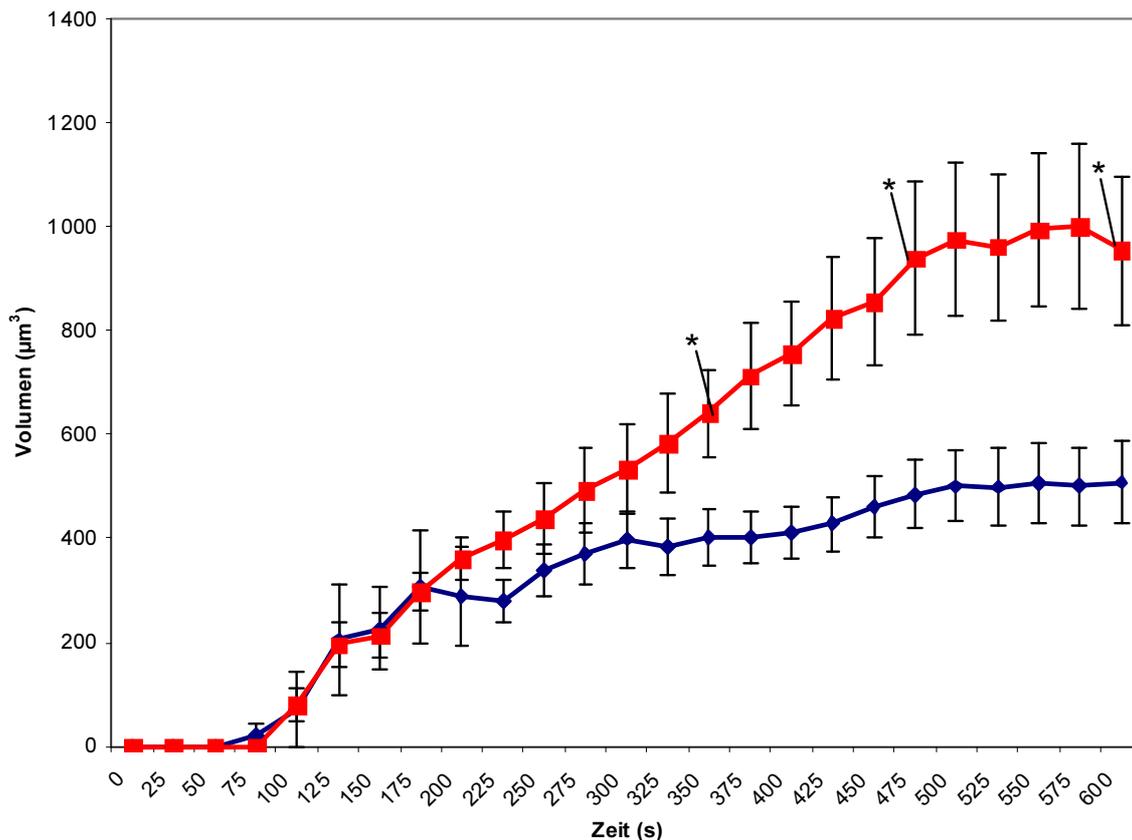


Abb.22: Mittleres Einzelthrombusvolumen. X-Achse: Zeit in Sekunden. HPA-1a/1a \blacklozenge (n=8), HPA-1b/1b \blacksquare (n=7). Fehlerbalken zeigen den Standardmessfehler. * $p < 0,05$ (Student-t-Test)

Nach der Latenzphase von 75 Sekunden, in der die Thromben zum Cut-off-Volumen heranwachsen, stieg das mittlere Einzelthrombusvolumen bei beiden Genotypen identisch an. Nach 175 Sekunden Versuchsdauer stagnierte das Wachstum der HPA-1a-Genotypen und wuchs bis zum Versuchsende nur noch sehr langsam an. Das Einzelthrombusvolumen der HPA-1b-Genotypen dagegen behielt die anfängliche Volumensteigerung bis etwa zwei Minuten vor Ende des Versuchs konstant bei. Danach blieb auch das mittlere Einzelthrombusvolumen der HPA1b-Genotypen konstant.

Somit unterschieden sich die durchschnittlichen Einzelthrombusvolumina der beiden Genotypen zu Versuchsbeginn (Versuchszeit 150 und 250s) nicht voneinander.

Sechs Minuten, acht Minuten nach Versuchsbeginn und zu Versuchsende bestanden jedoch signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen dem mittleren Einzelthrombusvolumen von HPA-1a- und HPA-1b-Genotyp.

3.4.3 Mittlere Einzelthrombusgrundfläche

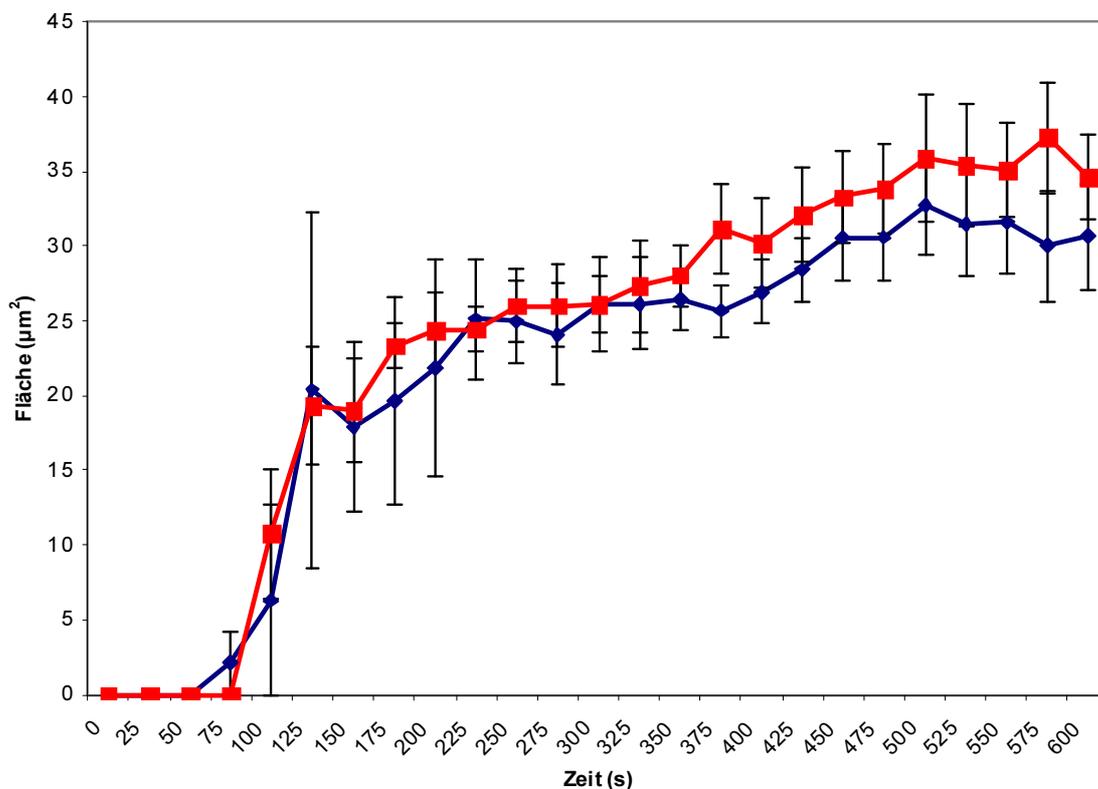


Abb.23: Mittlere Einzelthrombusgrundfläche. X-Achse: Zeit in Sekunden. HPA-1a/1a \blacklozenge ($n=8$), HPA-1b/1b \blacksquare ($n=7$). Fehlerbalken zeigen den Standardmessfehler.

Die durchschnittliche Einzelthrombusgrundfläche entwickelte sich von Beginn der Messung an bei beiden Genotypen sehr gleichförmig. Der Latenzzeit von 75s folgt ein scheinbar sprunghafter Anstieg der Grundfläche, der dadurch zustande kommt, dass die Thrombusgrundfläche schon ab Messbeginn stetig anwächst, jedoch erst ab Überschreiten des Cut-off-Volumens berechnet wird. Durch leichte Zeitunterschiede im Erreichen des Cut-off-Volumens zwischen den Blutspendern kommt es zu den anfangs starken Varianzen in der mittleren Ein-

zelthrombusgrundfläche. Diese wuchs bei beiden Genotypen im Versuchsverlauf langsam an und erreichte etwa zwei Minuten vor Versuchsende ihr Maximum.

Die mittlere Einzelthrombusgrundfläche der beiden Genotypen wurde zu den Messzeitpunkten 600, 475, 350, 250 und 150 Sekunden statistisch auf einen Unterschied der jeweiligen Mittelwerte hin überprüft. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der mittleren Thrombusanzahl zwischen den beiden Genotypen.

3.4.4 Mittlere Einzelthrombushöhe

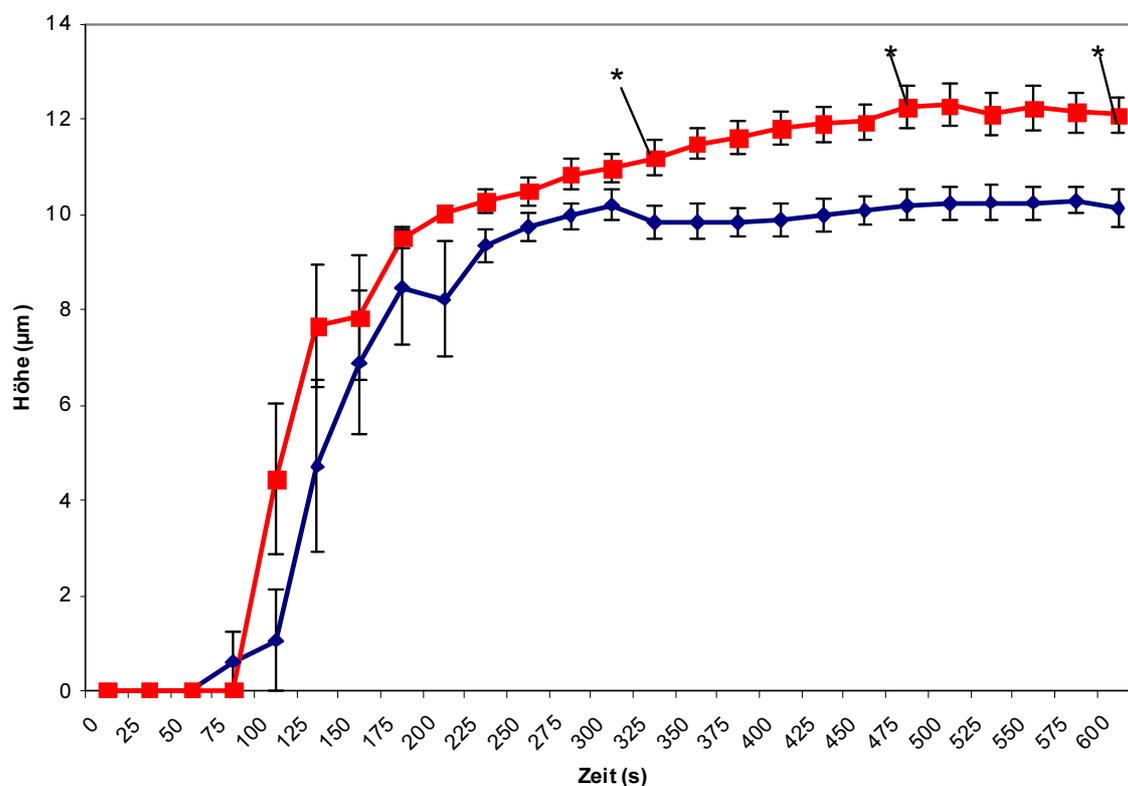


Abb.24: Mittlere Einzelthrombushöhe. X-Achse: Zeit in Sekunden. HPA-1a/1a \blacklozenge (n=8), HPA-1b/1b \blacksquare (n=7). Fehlerbalken zeigen den Standardmessfehler. * $p < 0,01$ (Student-t-Test)

Die durchschnittliche Einzelhöhe entwickelt sich zu Beginn der Messung bei beiden Genotypen sehr gleichförmig. Nach der Latenzzeit von 50 bis 75 Sekunden folgte ein scheinbar sprunghafter Anstieg der Thrombushöhe, der durch die schon vorhandene Höhe der Thromben bei Erreichen des Cut-off-Volumens zustande kam. Wie bei der Berechnung der Einzelthrom-

busgrundfläche kam es auch hier, durch leichte Zeitunterschiede im Erreichen des Cut-off-Volumens zwischen den Blutspendern, zu anfangs hohen Standardabweichungen.

Die mittleren Thrombushöhen der beiden Genotypen unterschieden sich bis zur fünften Versuchsminute kaum voneinander. Ab diesem Zeitpunkt jedoch stagnierte das durchschnittliche Höhenwachstum der HPA-1a-Genotypen, während das der HPA-1b-Genotypen weiter wuchs und erst etwa zwei Minuten vor Versuchsende ebenfalls sein Maximum erreichte.

Die mittleren Einzelthrombushöhen der beiden Genotypen unterschieden sich zu Versuchsanfang (Versuchszeit 150 und 250s) nicht voneinander. Sechs Minuten, acht Minuten nach Versuchsbeginn und zu Versuchsende bestanden jedoch signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) zwischen der mittleren Einzelthrombushöhe von HPA-1a- und HPA-1b-Genotyp.

4 Diskussion

4.1 Vierdimensionale Thrombogenese

In der experimentellen Hämostaseologie wurden Flusskammerexperimente schon über einen langen Zeitraum bis in die heutige Zeit eingesetzt, um den scherkraftabhängigen Prozess von Plättchenadhäsion und -aggregation zu untersuchen (Affeld et al., 1995; Badimon et al., 1987; Hafezi-Moghadam et al., 2004).

Die verwendeten rechteckigen Flusskammern unterschieden sich in ihrem prinzipiellen Aufbau nur wenig voneinander. Die Hauptunterschiede lagen darin, auf welche Weise die Thrombusbildung beobachtet wurde und wie die die entstandenen Daten ausgewertet wurden.

Während Thrombozyten anfangs mit Radioisotopen markiert wurden, um sie mikroskopisch und dosimetrisch erfassen zu können (Badimon et al., 1987), wurde bald dazu übergegangen, Fluoreszenzfarbstoffe wie Mepacrin (Quinacrin) zur Plättchenmarkierung zu verwenden (Grabowski, 1990). Dieser Farbstoff wird im von uns entwickelten Modell, jedoch auch in vielen anderen Flusskammermodellen, bis heute erfolgreich eingesetzt. Zur Auswertung der Flusseexperimente wurden meist Videomikroskopieverfahren verwendet, die das Fluoreszenzsignal der Thrombozyten in Echtzeit festhielten (Balasubramanian et al., 2002; Savage et al., 1998). Allerdings handelte es sich bei diesem Verfahren um eine rein zweidimensionale Darstellung, die meist benutzt wurde, um das Tethering der Plättchen und deren Adhäsion an verschiedene thrombogene Oberflächen zu visualisieren und die Bewegung und Adhäsionsfläche zu berechnen.

1998 wurde ein konfokales Laserscanningmikroskop zur dreidimensionalen Erfassung von Thromben in einem Flusskammerexperiment eingesetzt (Savage et al., 1998). Es gelang, das Gesamtvolumen der Thromben innerhalb des Messbereichs nach Abschluss des Flussexperiments zu messen. Dieses Verfahren wurde weiterentwickelt und ermöglichte dann auch die Akquisition von dreidimensionalen Bildern unter flussdynamischen Bedingungen, allerdings mit einem großen Zeitabstand zwischen den Messungen (ca. 5 min.) (Ruggeri et al., 1999). Bei diesen Verfahren wurden die Schnittbilder, die durch die konfokale Mikroskopie von den Thromben entstanden, nicht dreidimensional rekonstruiert, sondern es wurde lediglich die vom Fluoreszenzsignal belegte Fläche auf jedem Einzelbild über alle Schnittbilder gemittelt und so ein Gesamtvolumen berechnet.

Das von uns entwickelte System „vierdimensionale Thrombogenese“ ermöglicht nun die echte dreidimensionale Visualisierung der Thromben mit so geringen Zeitabständen zwischen den Messungen (25 Sekunden), dass auch die Dynamik der Thrombusbildung umfassend dargestellt wird. Auch das Auswertungsverfahren wurde maßgeblich weiterentwickelt. Es ist nun möglich, zu jedem Messzeitpunkt nicht nur das Gesamtvolumen der Thromben im Messbereich zu berechnen, sondern für jeden einzelnen Thrombus separat sein Volumen genau zu bestimmen. Für jeden einzelnen dieser Thromben werden auch Thrombushöhe und die Thrombusgrundfläche, also die Adhäsionsfläche an die Kollagenmatrix, bestimmt.

4.1.1 Validierung des Messverfahrens

4.1.1.1 Experimentelle Varianz der Methode

Für die Bestimmung der experimentellen Varianz eignen sich biologische Objekte wie Thromben sehr schlecht, da sie in ihrer Größe stark schwanken. Daher wurden Mikrosphären verwendet, fluoreszierende Kügelchen, die einen konstanten und vorher bekannten Durchmesser ($6\mu\text{m}$) aufweisen. Größere kalibrierte Mikrosphären standen nicht zur Verfügung.

Der Standardmessfehler bei der Volumenmessung der Mikrosphären liegt mit drei Prozent des Mittelwertes in einem akzeptablen Bereich. Allerdings scheint es drei „Populationen“ von Messwerten zu geben. Etwa ein Drittel der Messwerte gruppiert sich um den MW, und die weiteren Messwerte liegen zur Hälfte oberhalb und zur anderen Hälfte unterhalb des Mittelwertes jeweils in einer Gruppe vor.

Die Mikrosphären sind mit einem durchschnittlichen Volumen von $130\mu\text{m}^3$ mehr als fünfmal kleiner als die durchschnittlichen Thromben zu einem mittleren Messzeitpunkt. Das Auflö-

sungsvermögen des Messsystems ist für solch kleine Objekte nicht optimiert. Die flächige Auflösung (Messgenauigkeit) in der X/Y-Ebene ist mit $0,4\mu\text{m}$ zwar sehr hoch; jedoch bereitet die räumliche Auflösung in Z-Orientierung ($1\mu\text{m}$) bei der Volumenberechnung solch kleiner Objekte Schwierigkeiten. Die Abweichung um einen Voxel, der kleinsten räumlichen Auflösungseinheit (dreidimensionales Äquivalent zu Pixel), in Z-Orientierung kann eine sprunghafte Abweichung in der Volumenberechnung der Mikrosphären von ca. 15 Prozent bedeuten.

Somit könnte es sich bei den drei „Populationen“ um Messungen handeln, denen in Z-Orientierung entweder ein Voxel zu viel, zu wenig oder die genau richtige Voxelzahl zugerechnet wurde. Dieses Phänomen wird als Partialvolumeneffekt bezeichnet. Voxel werden bei der Digitalisierung der Daten entweder als komplett gefüllt oder leer deklariert, es gibt kein digitales Äquivalent zur partialen Belegung eines Voxels. Ein Körper, dessen Rand nicht genau mit den Voxelrändern übereinstimmt, kann somit sowohl falsch groß als auch falsch klein vermessen werden.

Der Partialvolumeneffekt ist ein streng unsystematischer Fehler und erlaubt daher eine sehr genaue Bestimmung des Mittelwertes. Ein solcher Fehler ist auch bei der Volumenberechnung der Thromben nicht auszuschließen, spielt jedoch wegen der größeren berechneten Volumina und der Mittelung der Einzelvolumen eine untergeordnete Rolle.

4.1.1.2 Spezifität der Plättchenadhäsion an die Kollagenmatrix

Die Versuche konnten darauf hinweisen, dass messbare Plättchenadhäsion nur an die Kollagenmatrix erfolgt, da sich nur im Bereich der Kollagenmatrix ein Fluoreszenzsignal zeigt und nicht auf der BSA-gesättigten Glasoberfläche.

4.1.1.3 Spezifität des $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Rezeptors

Die Versuche mit dem Rezeptorinhibitor Abciximab (ReoPro[®]) konnten zeigen, dass es unter Zugabe dieses $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Antagonisten nur zur Adhäsion der Plättchen auf der Kollagenoberfläche kam, nicht jedoch zum Thrombuswachstum.

Diese Beobachtung ist darauf zurückzuführen, dass die Ligation von Fibrinogen an $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ und damit die Plättchen-Plättchen-Interaktion durch Abciximab verhindert wird. Die Bindung der Thrombozyten an die Kollagenmatrix direkt über GPIV, das $\alpha_2\beta_1$ -Integrin oder über GPIb-IX-V, vermittelt über vWF, bleibt unbeeinflusst. Das Adhäsionsverhalten der Plättchen

wird also nicht oder allenfalls unwesentlich beeinflusst. Die Aggregation allerdings wird durch die Blockade von $\alpha_{IIb}\beta_3$ nahezu vollständig unterdrückt.

Das zu messende Thrombusvolumen ist somit direkt abhängig von der Funktionstüchtigkeit von $\alpha_{IIb}\beta_3$. Eine Änderung der Rezeptorfunktion könnte sich daher in einem veränderten Thrombusvolumen widerspiegeln.

4.1.1.4 „Leukozyten-Rolling“ unter Einfluss von Abciximab

Durch die Zugabe von Abciximab (1 μ g/ml) zum Vollblut kam es mit einer Zeitverzögerung von etwa fünf min nach Start des Blutflusses zu einer vermehrten Adhäsion von Leukozyten im Bereich der Kollagenoberfläche. Die Leukozyten interagierten dabei mit den auf der Kollagenoberfläche adhärenen Thrombozyten. Intakte Plättchen und thrombozytäre Fragmente blieben dabei an den rollenden Leukozyten haften. Dieser Effekt dürfte eine Konzentrationsabhängigkeit aufweisen. Unter Zugabe einer höheren Konzentration von Abciximab (4 μ g/ml) nahm die Zahl der Leukozyten um durchschnittlich das dreißigfache zu.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich in einer Studie (Fredrickson et al., 2000), in der ein ähnliches Strömungskammermodell (rechteckige Strömungskammer, Kollagenbeschichtung (Typ I), Mepacrin-Färbung der Plättchen, Antikoagulation des Blutes mit Citrat) verwendet wurde. Hierbei wurde Blut von Patienten nach PTCA (Perkutane transluminale Koronarangioplastie) gewonnen. Die Patienten erhielten entweder eine Therapie mit Ticlopidin, Abciximab oder beiden Medikamenten. Bei den Patientengruppen mit Abciximab und Ticlopidin oder nur Abciximab, nicht jedoch bei den Patienten, die nur Ticlopidin einnahmen, kam es ebenfalls zum Leukozyten-Rolling. Es wurde beobachtet, dass sich die Leukozytenzahl im Bereich der Kollagenoberfläche erst erhöhte, sobald sich ein „Rasen“ aus Thrombozyten gebildet hatte. So konnte die in dieser Studie ebenfalls vorhandene Zeitverzögerung des Leukozyten-Rollings erklärt werden. Weiter wurde die Theorie entwickelt, dass das Leukozyten-Rolling über eine Interaktion von P-Selektin auf den Thrombozyten mit PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand-1) auf der Leukozytenoberfläche vermittelt wird, da anti-P-Selektin und monoklonale Antikörper gegen PSGL-1 das Auftreten von Leukozyten im Bereich der Kollagenoberfläche nahezu komplett unterdrückten.

In einer anderen Arbeit (Shimazaki et al., 2000) wurden ebenfalls Versuche mit Abciximab versetztem Blut in einer Strömungskammer durchgeführt. Auch hier wurde die Thrombusbildung an einer Matrix aus Kollagen vom Typ I untersucht. Es wurde allerdings nicht über das

Auftreten von „Leukozyten-Rolling“ berichtet. Allerdings wurde ein anderes Antikoagulanz verwendet als in unserer und der oben genannten Studie. Das Blut wurde mit dem Thrombininhibitor Argatroban antikoaguliert.

Auch in Flusskammerstudien im IHTM wurde Abciximab in Flusskammerexperimenten mit Kollagen als thrombogener Matrix eingesetzt. Auch hier wurde kein „Leukozyten-Rolling“ beobachtet. Allerdings wurde in diesen Experimenten wiederum ein Thrombininhibitor, nämlich PPACK, eingesetzt (Loncar et al., 2006).

Es wäre daher möglich, dass das Vorhandensein von Thrombin essenziell für die Ausbildung von Leukozyten-Rolling unter Abciximabzugabe ist. Um genauere Aussagen zu diesem Phänomen zu machen, sind weitere Versuche notwendig.

4.1.1.5 Intraindividuelle Varianz der Methode

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Messverfahren „vierdimensionale Thrombogenese“ imstande ist, definierte dreidimensionale Körper wie Mikrosphären mit hoher Genauigkeit zu messen, sollte nun demonstriert werden, dass mit dem System auch eine exakte Messung von Thrombusdaten möglich ist.

4.1.1.5.1 Thrombusanzahl und Gesamt-Thrombusvolumen

Hierzu wurde die Thrombogenese eines Einzelspenders achtmal in voneinander unabhängigen Experimenten untersucht. Es wurden bei jedem Versuch Daten zum Gesamt-Thrombusvolumen, zur Thrombusanzahl, zum mittleren Einzelthrombusvolumen, zur mittleren Thrombusgrundfläche und zur mittleren Thrombushöhe erfasst.

Hierbei stellte sich heraus, dass die Zahl der Thromben, die auf der Kollagenmatrix entstanden, von Versuch zu Versuch eine hohe Variabilität aufwies.

Der primäre Kontakt mit der Kollagenoberfläche und somit die Adhäsion der Plättchen geschieht nach einem zufälligen Muster. Wie man in Abb.11 sieht, ist nicht die gesamte Kollagenoberfläche mit adhärennten Plättchen bedeckt, sondern es wechseln sich freie Kollagenflächen mit von Plättchen bedeckten Bereichen ab. Thromben von einer Größe, die das Cut-off-Volumen überschreitet, entstehen auf den Bereichen bereits adhärennter Plättchen. Somit variiert auch die Anzahl der entstehenden Thromben deutlich mit der zufälligen Verteilung der adhärennten Plättchen.

Die große Variabilität der Thrombusanzahl bietet somit auch eine Erklärung für die ebenfalls großen Unterschiede im Gesamt-Thrombusvolumen von Versuch zu Versuch, da hier das Volumen aller Einzelthromben summiert wird.

4.1.1.5.2 Mittleres Einzelthrombusvolumen und mittlere Einzelthrombushöhe

Um den Einfluss der variablen Thrombusanzahl auf die Volumenmessung zu minimieren, wurde ein Auswertungsverfahren entwickelt, das das Volumen von jedem einzelnen Thrombus berechnet.

Bei diesem Auswertungsmodul wird ein hoher Anspruch an die Software gestellt, die, nach der dreidimensionalen Rekonstruktion der Schnittbilder, einzelne Thromben als solche erkennen und in der Berechnung voneinander trennen muss. Hierbei war die Einführung des Cut-off-Volumens von besonderer Bedeutung, da so Artefakte unterdrückt werden konnten, die das Erkennen von kleinen Einzelthromben erschwerten.

Das mittlere Einzelthrombusvolumen weist eine deutlich geringere intraindividuelle Variabilität auf als das berechnete Gesamt-Thrombusvolumen und eignet sich daher besser zum Vergleich der Thrombusvolumina der beiden untersuchten Genotypen des HPA-1-Polymorphismus. Dieser Messparameter ist daher in der Lage, bei vergleichenden Messungen, z. B. beim Vergleich der beiden Genotypen, auch kleine Höhenunterschiede der Thromben zuverlässig zu erfassen. Weiterhin ist die Messgröße sehr eng mit der Funktion des $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Integrins verknüpft, da das Höhenwachstum der Thromben in das Kammerlumen hinein zwangsläufig auf die Interaktion der Plättchen untereinander angewiesen ist und dieser Prozess fast ausschließlich über $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ vermittelt wird (Savage et al., 1998).

Sowohl bei den Versuchen zur intraindividuellen Varianz als auch bei den vergleichenden Versuchen des HPA-1-Polymorphismus zeigten alle Probanden eine ähnliche Entwicklung des mittleren Einzelthrombusvolumens und der mittleren Thrombushöhe. Beide Parameter stiegen nach Erreichen des Cut-off-Volumens kontinuierlich und gleichförmig an und erreichten dann ein Plateau.

Eine denkbare Erklärung für die Stagnation des Thrombuswachstums bietet ein Blick auf die mögliche Entwicklung der Rheologie innerhalb der Strömungskammer im Verlauf des Fluss-experiments. Durch das Wachstum der Thromben während des Versuchs wird das Kammerlumen im Bereich der Kollagenmatrix immer weiter eingeengt. Die Wandscherraten steigen mit abnehmender Höhe des Flusskanals quadratisch an. Somit verändert sich die initiale

Scherrate von 500s^{-1} während des Versuchs. So steigen im Versuchsverlauf die Scherraten innerhalb der Strömungskammer genau wie in einem arteriellen Blutgefäß an, das zunehmend stenosierte (siehe Abb.25). Ein solches Phänomen wurde auch in anderen Studien beobachtet (Ruggeri et al., 1999).

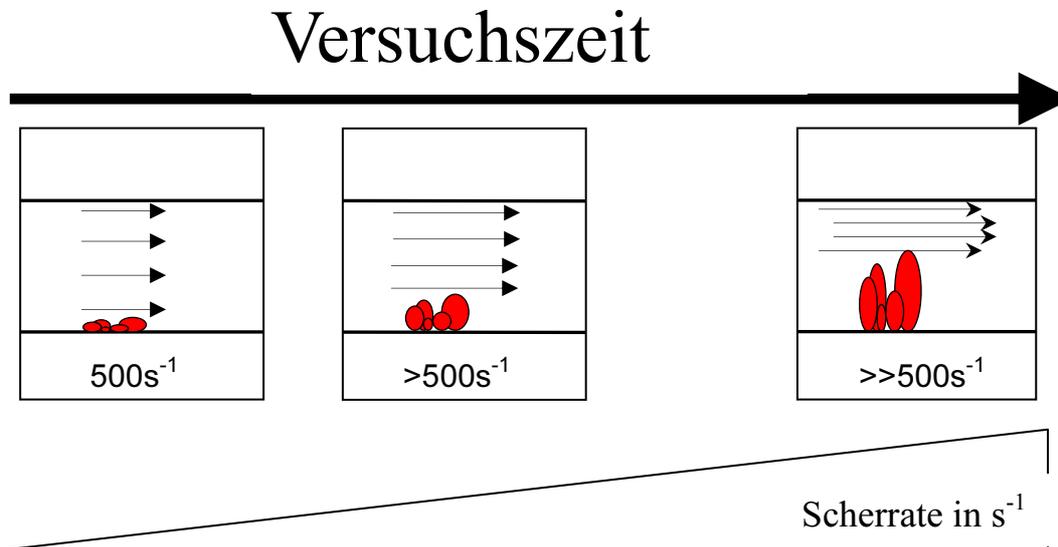


Abb.25: Schematische Darstellung der postulierten, über die Versuchsdauer ansteigenden Scherraten in der Flusskammer

Daher wurde die Hypothese entwickelt, dass sich die Scherrate im Versuchsverlauf durch das Thrombuswachstum stetig erhöht und somit ebenfalls die Scherkraft ansteigt, die auf die Thromben wirkt. Vor allem an der Spitze der Thromben ist diese Kraft besonders hoch. Ab einer gewissen Thrombushöhe wird ein Punkt erreicht, an dem entweder die Anlagerung von Plättchen an der Thrombusspitze durch die dort wirkenden Scherkräfte erschwert wird oder schon angelagerte Plättchen wieder abgerissen werden. Diese Annahme stellt eine mögliche Erklärung für die Stagnation von Thrombushöhe und -volumen dar.

4.1.1.5.3 Mittlere Einzelthrombusgrundfläche

Der Messwert Einzelthrombusgrundfläche quantifiziert die Interaktion der Thromben mit der Kollagenoberfläche unabhängig von der fibrinogenabhängigen Plättcheninteraktion, der Aggregation. Die Größe der Einzelthrombusgrundfläche wird folglich vor allem durch die Rezeptoren beeinflusst, die die Bindung von Plättchen an Kollagen und vWF vermitteln ($\alpha_2\beta_1$, GPIIb/IIIa, GPIb-IX-V) (Siljander et al., 2004).

Auch die Einzelthrombusgrundfläche weist eine geringe intraindividuelle Variabilität auf (durchschnittlicher Standardmessfehler < 5 %).

4.1.1.6 Thrombusannäherung und Verschmelzung

Ein weiterer interessanter Befund, der bei allen individuellen Experimenten zu beobachten war, ist die Tatsache, dass sich die Thromben ab etwa acht Minuten nach Versuchsbeginn aufeinander zubewegten und zum Teil miteinander verschmolzen. So ließ sich beobachten, dass die Thromben ihre Position veränderten, bevor sie miteinander verschmolzen, und sich nicht nur der Zwischenraum zwischen zwei Thromben durch zusätzliche Plättchenaggregation füllte. Dieses Phänomen ist deutlich zu beobachten (z. B. rechtes Video auf <http://bv.acs.uni-duesseldorf.de/projects/thrombo.html>), kann aber aktuell nicht quantifiziert werden. Es kommt allerdings in der Verminderung der Thrombusanzahl bei konstantem oder steigendem Thrombusgesamtvolumen indirekt zum Ausdruck.

Es bleibt unklar, ob es sich bei der Bewegung der Thromben um eine aktive Bewegung handelt, oder ob die Blutströmung die Aggregate morphologisch verändert. Gegen die letztgenannte Annahme spricht, dass die Thromben sich in alle Richtungen bewegen, auch entgegen der Strömungsrichtung. Für die Retraktion von Fibrinogen-/Fibrinbrücken zwischen den Thromben als Erklärung für die Bewegung besteht zwischen den Plättchen von zwei Aggregaten eine zu große Entfernung. Auch in der Literatur existieren keine Hinweise, die imstande wären, die beschriebenen Thrombusbewegungen zu erklären. Allerdings setzt die Beobachtung eines solchen Phänomens auch eine vierdimensionale Darstellung der Thromben voraus.

4.2 Der HPA-1(PIA)-Genpolymorphismus von $\alpha_{IIb}\beta_3$

4.2.1 Statistik

Eine geeignete statistische Überprüfungsmethode für das Verfahren der vierdimensionalen Thrombogenese im Zusammenhang mit dem Vergleich der untersuchten Genotypen von HPA-1 zu finden, stellte eine große Herausforderung dar.

Der Zugriff insbesondere auf die Population der Personen mit homozygotem HPA-1b-Genotyp, ist aufgrund des seltenen Vorkommens in der Bevölkerung extrem begrenzt. Daher

sollte der Informationsgewinn aus den durchgeführten Untersuchungen auch hinsichtlich einer Vielzahl verschiedener untersuchbarer Messparameter möglichst groß sein. Das Messverfahren wurde dahingehend optimiert, aus einem Experiment sehr viele auswertbare Informationen über die Thrombogenese zu sammeln. Dies stellt einen der großen Vorteile des hier entwickelten Messverfahrens dar. Allerdings besteht bei der statistischen Prüfung von mehreren Hypothesen an derselben Grundgesamtheit das Risiko einer sog. „Alphafehler-Kumulierung“, also einer globalen Erhöhung der Wahrscheinlichkeit durch multiple Testung einen Fehler erster Art (Alphafehler) zu begehen. Dies erklärt sich daraus, dass wenn ein Test mit einem festgelegten Signifikanzniveau α sehr häufig auf die gleiche Grundgesamtheit angewendet wird, sich die Wahrscheinlichkeit erhöht, einen p-Wert $< \alpha$ zu erhalten und somit einen Fehler 1. Art zu begehen. Für diese Art der Problematik gibt es die Möglichkeit das Signifikanzniveau entsprechend der Anzahl der überprüften Hypothesen so anzugleichen, dass das erhöhte Risiko einen Alphafehler zu begehen neutralisiert wird. Die sogenannte Bonferroni-Gleichung stellt ein solches Verfahren dar, allerdings wird hier durch eine sehr konservative Einschränkung des Signifikanzniveaus die Test-Power zeitgleich eingeschränkt. Sie ermittelt die kumulative Wahrscheinlichkeit in einer Reihe (sog. Familie) von Hypothesentests einen Alphafehler zu begehen, vorausgesetzt alle Tests werden unabhängig vom Ausgang in beliebiger Reihenfolge durchgeführt, und passt entsprechend die Höhe des Signifikanzniveaus an.

Es ist möglich die Bonferroni-Methode abzuwandeln, insofern man die Reihenfolge der Hypothesentests vorab festlegt; stößt man in der Überprüfung der Hypothese in einer solchen seriellen Untersuchung auf einen p-Wert, der größer ist als das festgelegte Signifikanzniveau, wird dieses für den nächsten Test entsprechend der Bonferroni-Formel angepasst. Ermittelte p-Werte, die sich entsprechend des initial angelegten oder im Verlauf angepassten Signifikanzniveaus als statistisch signifikant erweisen, führen jedoch nicht zu dessen Veränderung.

Zum Beispiel ergibt sich bei der vergleichenden Untersuchung der mittleren Einzelthrombusvolumen der beiden untersuchten Populationen in der Testung der Mittelwertdifferenz zum Zeitpunkt 600s ein p-Wert von 0,024. Dieser Wert entspricht bei dem für die initiale Testung festgelegten Signifikanzniveau von 0,05 einem statistisch signifikanten Ergebnis.

Für den nächsten Test zum Vergleich der Einzelthrombusvolumen zum Zeitpunkt 475s wurde daher das gleiche Signifikanzniveau von 0,05 angelegt. In der vergleichenden Untersuchung der mittleren Thrombusanzahl der beiden Populationen jedoch ergibt sich, auch wenn sich zum Messzeitpunkt 250s formal ein p-Wert von 0,038 errechnet, unter Anwendung der ange-

passten Bonferroni-Korrektur mit einer p-Wert-Vorgabe von 0,0125 für eine signifikante Mittelwertdifferenz, kein statistisch signifikanter Unterschied der Messwerte.

In der hier durchgeführten seriellen Ermittlung von Mittelwertdifferenzen mit Hilfe des Student-t-Tests wurde die Reihenfolge der statistischen Überprüfung noch vor der Durchführung der Experimente festgelegt.

Zu jenem Zeitpunkt erfolgte die Festlegung der Reihenfolge anhand der hypothetischen Annahme, dass zum Versuchsende die Plättchenthromben am größten sind und somit der größte Unterschied zwischen den beiden untersuchten Populationen bestehen könnte. Andererseits trug zur Entscheidung über die Festlegung der Testungsreihenfolge die Tatsache bei, dass aus den Validierungsuntersuchungen bekannt war, dass zu Beginn der Versuchszeit sehr hohe Standardabweichungen vorlagen. Vom letzten Messzeitpunkt wurde in der Versuchszeit rückwärts an den angegebenen Zeitpunkten jeweils eine Mittelwertdifferenz bestimmt. Die Test-Power nimmt durch die Anwendung der Bonferroni-Methode mit jeder Testung an derselben Grundgesamtheit ab, die einen p-Wert größer als das Signifikanzniveau ergibt. Daher wurde nicht an jedem Messzeitpunkt auch ein t-Test durchgeführt, sondern nur zu den angegebenen Zeitpunkten, um die Test-power zu den frühen Meßzeitpunkten nicht zu stark einzuschränken.

Dennoch ergibt sich hierdurch eine Ungleichheit der Test-Power zugunsten der späteren Messzeitpunkte, mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eigentlich signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen in der frühen Messperiode übersehen zu haben.

Dem gegenüber bestand jedoch das Risiko durch eine zu konservative globale Anpassung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni, soviel Test-Power einzubüßen, dass jegliche Unterschiede zwischen den Populationen unentdeckt blieben. Die gewählte statistische Vorgehensweise ist daher als eine Art Focus auf die späte experimentelle Phase zu verstehen, mit nachlassender Trennschärfe in Richtung der frühen Versuchszeitpunkte.

Kritisch ist hier allerdings anzumerken, dass sich in der Untersuchung der intraindividuellen Varianz der Methode darstellte, dass sich generell in der Wachstumsphase zwischen Sekunde 125 und 325 die geringsten Standardabweichungen zeigten, so dass möglicherweise eine Beschränkung der statistischen Auswertung auf diesen Zeitraum eine potentiell überlegene Alternative zur gewählten Methodik darstellt. Gegebenenfalls sollte dies in Folgeexperimenten untersucht werden.

Es war vor der Anwendung der statistischen Tests diskutiert worden, die gemessenen Thrombusparameter der beiden Populationen an die jeweilig vorab gemessenen Thrombozytenkon-

zentrationen anzugleichen, also durch eine Multiplikation der Messwerte mit der Thrombozytenkonzentration eine Normierung zu erreichen.

Es wurde sich aus verschiedenen Gründen gegen diesen Ansatz entschieden. Ein solcher Rechenvorgang wäre nicht auf die Rohdaten anwendbar gewesen, da nicht zu jedem Blutspender auch eine Thrombozytenkonzentration gemessen wurde. Es wäre daher notwendig gewesen, die Mittelwerte der gemessenen Parameter der Blutspenderpopulationen mit den Mittelwerten der Thrombozytenkonzentration der beiden Populationen zu verrechnen, mit dem damit verbundenen Risiko einer erhöhten Ungenauigkeit. Da sich keine signifikanten Unterschiede in der mittleren Thrombozytenkonzentration zwischen den beiden Spenderpopulationen ergeben, ist eine Auswirkung der Normierung der Daten hinsichtlich dieses Parameters auf die statistische Testung der unterschiedlichen Messdaten der beiden Populationen unwahrscheinlich.

Obwohl die Messdaten der 4-dimensionalen Thrombogenese mit einer komplexen computer-gestützten Analyse berechnet werden, liegt ein besonderer Vorzug in der hier etablierten Methode in der Generierung intuitiv nachvollziehbarer Messgrößen deren räumliche und zeitliche Dimensionen für den Betrachter gut vorstellbar sind. Es ist daher von Vorteil, unnötige zusätzliche Berechnungen zu vermeiden, um sich den Vorzug einer einfachen Nachvollziehbarkeit der Daten zu erhalten.

4.2.2 Mittlere Thrombusanzahl

Die untersuchten Spender wiesen keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl ihrer Thromben auf. Zu Versuchsbeginn war die Anzahl der Thromben, die das Cut-off-Volumen überschritten, in der HPA-1b/1b-Gruppe tendenziell erhöht. Dieser Unterschied glich sich allerdings im Versuchsverlauf aus.

Es wäre möglich, dass die Wachstumsgeschwindigkeit zu Beginn der Thrombusbildung, besonders noch vor Erreichen des Cut-off-Volumens, beim HPA-1b/1b-Genotyp leicht erhöht ist. Allerdings müssten noch weitere Versuche durchgeführt werden, um die beschriebene Tendenz zu bestätigen oder zu widerlegen.

4.2.3 Mittleres Einzelthrombusvolumen

Das durchschnittliche Volumen der Thromben von Blutspendern mit den Genotypen HPA-1a/1a bzw. HPA-1b/1b zeigte im verwendeten Flusskammermodell vom Start der Blutströ-

mung bis zu einem Zeitpunkt etwa drei Minuten nach Strömungsbeginn keinen Unterschied. Im zweiten und dritten Drittel der Versuchszeit zeigte sich ein signifikanter Volumenunterschied, die Einzelthromben von Spendern mit dem Genotyp HPA-1b/1b wiesen zu Versuchsende ein mehr als doppelt so großes Volumen auf als die Thromben der Spender mit dem HPA-1a/1a-Genotyp.

Die Ergebnisse sprechen gegen eine prinzipiell erhöhte Thrombogenität von Blutplättchen mit dem HPA-1b-Genotyp von $\alpha_{IIb}\beta_3$, z. B. im Sinne einer erhöhten Rezeptoraffinität zu seinem Liganden, da sich in diesem Fall das Thrombusvolumen im gesamten Versuchsverlauf unterschiedlich verhalten würde. Der signifikante Volumenunterschied stellt sich allerdings erst im Verlauf des Strömungsexperiments ein.

Die Einzelthrombusvolumen der beiden Genotypen unterscheiden sich darin, ab welchem Zeitpunkt das Volumenwachstum stagniert. Geht man nun von der Theorie aus, dass die Stagnation des Thrombuswachstums beider Genotypen durch die kontinuierliche Steigerung der Scherraten innerhalb der Flusskammer verursacht wird, lässt sich schlussfolgern, dass die Thromben des HPA-1b/1b-Genotyps besser imstande sind, diesen ansteigenden Scherkräften standzuhalten, als die des HPA-1a/1a-Genotyps. Während das Wachstum der Thromben mit der HPA-1a/1a-Variante von $\alpha_{IIb}\beta_3$ ab einer gewissen Scherrate stagniert, können die Thromben mit der HPA-1b-Variante weiter wachsen und zeigen somit zu Ende des Versuchs ein größeres Thrombusvolumen.

4.2.4 Mittlere Einzelthrombushöhe

Die Thromben der Blutspender der beiden untersuchten Genotypen unterschieden sich auch im Hinblick auf ihre mittlere Höhe. Analog zur Entwicklung des Einzelthrombusvolumens verhält sich auch die Höhe der Thromben bei beiden Genotypen anfangs gleich. Wiederum ergibt sich erst im zweiten und dritten Drittel des Strömungsexperiments ein signifikanter Unterschied. Die Thromben der Spender mit dem HPA-1b/1b-Genotyp wachsen ca. 20 Prozent weiter in das Kammerlumen hinein als die der Spender mit dem HPA-1a/1a-Genotyp.

Besonders der Unterschied der beiden Genotypen in ihrer Thrombushöhe, also der Thrombusausdehnung in das Kammerlumen hinein, legt die Vermutung nahe, dass die Thromben der HPA-1b/1b-Variante besser imstande sind, den höheren Scherkräften im Kammerlumen zu widerstehen.

Der zwanzigprozentige Unterschied in der Thrombushöhe ist nicht in der Lage, vollständig zu erklären, dass das Thrombusvolumen der HPA-1b/1b-Genotypen doppelt so groß ist wie das der HPA-1a/1a-Genotypen. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass ein Höhenunterschied eines dreidimensionalen Körpers in der Z-Achse sich in der dritten Potenz auf dessen Volumen auswirkt und somit ein zwanzigprozentiger Höhenunterschied über sechzigprozentige Differenzen in der Volumenberechnung zur Folge haben kann.

Andererseits führt auch ein Wachstum der Thromben in der X- und Y-Dimension durch eine Verminderung des Blutflusses zwischen den Thromben zu einer Steigerung der Scherrate während des Versuchs und kann somit ebenfalls Ausdruck einer erhöhten Thrombusstabilität gegenüber ansteigenden Scherkräften sein.

An diesem Beispiel wird deutlich, dass die wandnahe Scherrate innerhalb der rechteckigen Flusskammer vor Beginn der Thrombogenese relativ einfach zu berechnen ist, mit dem Wachstum der Thromben in das Kammerlumen hinein ändert sich jedoch die Rheologie in der Kammer. Die Kräfte, die zum Ende des Flussexperiments innerhalb der Kammer wirken, ließen sich daher nur mit einem Computermodell simulieren, das die Größe der Thromben und ihre Verteilung im Kammerlumen mit in die Kalkulation einbezieht.

4.2.5 Einzelthrombusgrundfläche

Die Einzelthromben der beiden untersuchten Genotypen zeigten im Mittel keinen Unterschied in ihrer Grundfläche, ihrer Adhäsionsfläche an die Kollagenmatrix. Die Größe der Grundfläche eines Körpers kann einen großen Einfluss auf dessen Volumen haben. Die Tatsache, dass die Grundflächen der Thromben der beiden Genotypen sich nicht unterscheiden, erlaubt die Schlussfolgerung, dass ihre große Volumendifferenz nur auf ihre Querschnittsfläche oberhalb der Kollagenoberfläche und ihre Einzelthrombushöhe zurückzuführen ist.

4.2.6 Schlussfolgerungen

Es besteht bei den untersuchten Probanden kein Unterschied in der Plättchen-Kollagen-Interaktion zwischen HPA-1a/1a- und HPA-1b/1b-Genotypen.

Sowohl die Höhe der Thromben als auch ihre Querschnittsfläche oberhalb der Kollagenoberfläche resultieren exklusiv aus Plättchen-Plättchen-Verbindungen. Somit muss der große und signifikante Volumen- und Höhenunterschied zwischen Thromben mit dem HPA-1a/1a- und

HPA-1b/1b-Genotyp von $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf einen Unterschied in der Plättchen-Plättchen-Interaktion zurückzuführen sein.

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ vermittelt Plättchen-Plättchen-Kontakt im Aggregationsprozess (Savage et al., 1998). In den Kontrollexperimenten mit Abciximab konnte gezeigt werden, dass die Funktionstüchtigkeit von $\alpha_{IIb}\beta_3$ von zwingender Notwendigkeit für die Entstehung dreidimensionaler Thromben ist. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die beobachteten Unterschiede zwischen den Spendern mit dem HPA-1a/1a- und dem HPA-1b/1b-Genotyp des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ durch Variationen in Funktionalität oder in der Oberflächenkonzentration von eben diesem Integrin erklärt werden können.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass aktivierte Thrombozyten mit dem HPA-1b-Genotyp von $\alpha_{IIb}\beta_3$ eine erhöhte Expression von $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf ihrer Oberfläche zeigten (Michelson et al., 2000), allerdings konnte diese Erhöhung der Oberflächenexpression am IHTM nicht beobachtet werden. Würden sich die beiden untersuchten Genotypen in Bezug auf die Oberflächenkonzentration von $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf den Plättchen unterscheiden, müsste man einen Volumenunterschied schon zu Beginn des Aggregationsprozesses erwarten. Ein solcher Unterschied würde sich in der kontinuierlichen Messung des Thrombusvolumens wahrscheinlich als eine Volumendifferenz über den gesamten Messzeitraum ausdrücken. Auch eine erhöhte Affinität von $\alpha_{IIb}\beta_3$ zu seinem Liganden Fibrinogen, wie sie in manchen Studien gezeigt werden konnte (Goodall et al., 1999), würde die Entwicklung des Thrombusvolumens höchstwahrscheinlich über den ganzen Messzeitraum beeinflussen.

Die Beobachtung, dass sich das Einzelthrombusvolumen der Probanden beider Experimentalgruppen im ersten Drittel des Versuchs jeweils gleich verhält, spricht dafür, dass keine Unterschiede in der initialen Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand bzw. in der Interaktion der Plättchen untereinander bestehen. Die Thrombogenese der beiden Genotypen verhält sich unter den anfänglichen Strömungsbedingungen mit einer Scherrate von 500s^{-1} gleich. Die Thromben engen mit ihrem fortschreitenden Wachstum das Kammerlumen ein, und während sich dadurch die Scherrate im Versuchsverlauf erhöht, zeigt sich ein Unterschied im Thrombusvolumen und in der Thrombushöhe der beiden Genotypen. Das Thrombuswachstum der HPA-1a/1a-Genotypen stagniert, während das Volumen der Thromben vom HPA-1b/1b-Genotyp weiter wächst und erst zu einem späteren Zeitpunkt stagniert. Es wäre daher wahrscheinlich, dass sich die beiden Genotypen in unserem Flussmodell in ihrer Thrombusstabilität, der Widerstandsfähigkeit ihrer Thromben gegenüber steigenden Scherraten, unterscheiden. Bezogen auf das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ könnte dies bedeuten, dass die

Ligand-Rezeptor-Zytoskelett-Interaktion bei dem HPA-1b/1b-Genotyp größeren Kräften ausgesetzt werden muss, damit sie dissoziiert, als die der HPA-1a/1a-Genotypen.

In Untersuchungen an $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten CHO-Zellen, die entweder den HPA-1a- oder den HPA-1b-Genotyp von $\alpha_{IIb}\beta_3$ exprimierten, konnten übereinstimmende Ergebnisse gezeigt werden. Es wurde unter statischen Bedingungen eine leicht erhöhte Bindung (ca. 20 Prozent) HPA-1b-exprimierender CHO-Zellen an immobilisiertes Fibrinogen im Vergleich zur HPA-1a-Variante beobachtet. Unter Flussbedingungen in einem Flusskammermodell zeigte sich ein wesentlich größerer Unterschied zwischen den beiden Genotypen. Unter Anlage von Scherkräften wiesen die mit der HPA-1b-Variante von $\alpha_{IIb}\beta_3$ transfektierten CHO-Zellen eine Adhäsionsrate an Fibrinogen auf, die um das Zwei- bis Vierfache erhöht war im Vergleich zur HPA-1a Variante (Vijayan et al., 2003a).

Auch in diesen Experimenten zeigt also der Unterschied zwischen den beiden Genotypen eine Abhängigkeit von der applizierten Scherrate.

Um der Assoziation zwischen HPA-1b-Genotyp und erhöhter Bindungsstabilität weiter nachzugehen, wurde das oben genannte Experiment mit CHO-Zellen modifiziert. Die CHO-Zellen wurden hier unter statischen Bedingungen zur Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen gebracht und dann innerhalb einer Strömungskammer immer größeren Scherraten ausgesetzt. Es zeigte sich, dass bei der Erhöhung der Scherraten die CHO-Zellen mit dem HPA-1b-Isotyp länger und in größerer Anzahl adhärent verblieben, während die HPA-1a Varianten durch die steigenden Scherkräfte früher von ihrer Fibrinogenunterlage abgelöst wurden (Berendes, Doktorarbeit "in progress"). Auch diese Ergebnisse stützen die Theorie, dass die erhöhte Stabilität der Verbindung zwischen $\alpha_{IIb}\beta_3$ und Fibrinogen bzw. der Plättchenverbindung untereinander über Fibrinogen einen Phänotypen des HPA-1b-Genotyps darstellt.

Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der Bindungsstabilität liefert die biochemische Untersuchung der Signaltransduktion in CHO-Zellen. Es zeigte sich, dass CHO-Zellen, die den HPA-1b-Genotyp von $\alpha_{IIb}\beta_3$ tragen, eine erhöhte Aktivität von ERK2 (extracellular signal-regulated kinase 2) und MLCK (myosin light-chain kinase) vorwiesen als die CHO-Zellen vom HPA-1a-Isotyp (Vijayan et al., 2003b). Diese beiden Proteine sind Teile der Signalkaskade, die das „Outside-in-signaling“ der Plättchen beeinflusst. Diese Signale, die nach der Besetzung der extrazellulären Domäne des Rezeptors durch seinen Liganden in das Zellinnere fortgeleitet werden, fördern verschiedene Prozesse im Thrombozyten. Die Signale beeinflussen die Sekretion von α - und δ -Granula, die Actinpolymerisation, die Reorganisation des Zytoskeletts und die Bildung von Membranvesikeln mit prokoagulatorischer Aktivität

(Phillips et al., 2001). Ein starker Hinweis auf die erhöhte Aktivität von ERK2 und MLCK als Ursache der Unterschiede in der Bindungsstabilität zwischen den beiden HPA-1-Varianten ist die Tatsache, dass durch Hemmung von MLCK und ERK2 die erhöhte Fibrinogenbindung von CHO-Zellen vom HPA-1b-Isotyp aufgehoben wurde (Vijayan et al., 2003b).

Es bleibt jedoch zu klären, ob, und falls ja wie die Abweichungen in der Signaltransduktion die Unterschiede in der Bindungsstabilität von $\alpha_{IIb}\beta_3$ kausal erklären können.

4.3 Einordnung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Gesamtkontext und klinische Konsequenzen

4.3.1 Stand der wissenschaftlichen Forschung

Die koronare Herzerkrankung und ihre Komplikation – der akute Myokardinfarkt – stellen die Haupttodesursache in Deutschland und der westlichen Welt dar. Hierbei spielt die Thrombusbildung, vermittelt über das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb-IIIa), eine zentrale Rolle (Lefkovits et al., 1995). Das Integrin mit dem HPA-1-Polymorphismus wurde von einigen (Carter et al., 1997; Garcia-Ribes et al., 1998; Pastinen et al., 1998; Weiss et al., 1996), aber nicht allen (Corral et al., 1997; Herrmann et al., 1997; Ridker et al., 1997; Scaglione et al., 1998) Autoren als genetischer Risikofaktor der ischämischen Gefäßerkrankung bezeichnet. Metaanalysen ergaben eine leichte, aber signifikante Assoziation von HPA-1b mit der koronaren Herzkrankheit (Di Castelnuovo et al., 2001; Meisel et al., 2004; Wu und Tsongalis, 2001). Studien, die die Assoziation zwischen HPA-1b-Genotyp und erhöhter Reoklusionsrate koronarer Bypass-Gefäße und Stents (Kastrati et al., 1999; Walter et al., 1997; Zotz et al., 2000) und ein verfrühtes Auftreten eines Myokardinfarktes bei KHK-Patienten mit dem HPA-1b-Genotyp zeigen konnten (Loncar et al., 2005), gaben Hinweise für den HPA-1b-Genotyp als Risikodeterminante erhöhter Plättchenthrombogenität.

Um den Phänotyp dieses klinisch relevanten Genotyps näher zu charakterisieren, wurden In-vitro-experimentelle Studien durchgeführt.

Auch diese Untersuchungen unter statischen Bedingungen lieferten uneinheitliche Ergebnisse. In einer Studie konnte eine erhöhte Plättchenaktivität und eine erhöhte Oberflächenexpression von $\alpha_{IIb}\beta_3$ bei mit ADP stimulierten Plättchen gezeigt werden (Michelson et al., 2000). In einer anderen Studie konnte nur eine Stimulation mit Tromboxan A₂ oder Arachidonsäure ein ähnliches Ergebnis erzielen (Andrioli et al., 2000). Auch zur Fibrinogenbindung der Plättchen

der beiden Genotypen in Lösung wurden unterschiedliche Ergebnisse veröffentlicht (Bennett et al., 2001; Goodall et al., 1999; Meiklejohn et al., 2001). An einem Modell mit $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten CHO-Zellen konnte gezeigt werden, dass sich beim HPA-1b-Isotyp, besonders unter Anlage von Scherkräften, eine höhere Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen beobachten lässt als beim HPA-1a-Isotyp (Vijayan et al., 2003a). Weiterhin zeigten Zellen, die rekombinant das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ exprimieren, bei der HPA-1b Variante eine erhöhte Resistenz gegenüber der kontinuierlichen Steigerung von Scherraten im In-vitro-Flussmodell (Berendes, Doktorarbeit "in progress").

In einer weiteren Studie am IHTM wurde bei Versuchen mit einer rechteckigen Strömungskammer die Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen im Vollblut untersucht (Loncar et al., 2007). Das Adhäsionsverhalten der Plättchen von Blutspendern mit den Genotypen HPA-1a/1a, HPA-1a/1b und HPA-1b/1b wurde bei verschiedenen Scherraten ($50s^{-1}$, $500s^{-1}$, $1500s^{-1}$) miteinander verglichen. Beim Vergleich der absoluten Adhäsionsraten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen HPA-1a und HPA-1b. Es zeigte sich jedoch ein erhöhter Anstieg der Plättchenadhäsion der HPA-1b-Genotypen über die Versuchszeit.

4.3.2 Einordnung der eigenen Arbeiten

In den von uns durchgeführten Experimenten konnten wir sowohl Teile der genannten epidemiologischen Studien als auch die Ergebnisse von einigen In-vitro-Studien bestätigen.

Wir konnten beobachten, dass sich die Adhäsion der beiden untersuchten Genotypen nicht unterscheidet, jedoch bereits entstehende Thromben bei den HPA-1b/1b-Genotypen zu einem höheren Volumen und einer größeren Höhe heranwachsen als die der Probanden mit dem HPA-1a/1a-Genotyp. Diese Befunde könnten das Phänomen des früheren Auftretens von Myokardinfarkten in KHK-Patienten und die erhöhte Reoklusion koronarer Stents bei Patienten mit dem HPA-1b-Genotyp erklären, da hier die Prädisposition für die Entstehung von Thromben bereits vorliegt und ein erhöhtes Thrombusvolumen zu einem vorzeitigen Verschluss der Gefäße führen kann.

Die These einer Erhöhung der Plättchenthrombogenität durch das Vorliegen eines HPA-1b-Allels kann nur teilweise bestätigt werden, da sich die Plättchenadhäsion und die Häufigkeit der Thrombusentstehung nicht erhöht zeigte, jedoch das Thrombusvolumen als Ausdruck ei-

ner erhöhten Intensität der Thrombogenese bei Probanden mit dem HPA-1b/1b-Genotyp signifikant erhöht war.

Der HPA-1b-Genotyp von $\alpha_{IIb}\beta_3$ als eigenständiger Risikofaktor für die KHK- bzw. Arteriosklerosentstehung kann nicht hinreichend durch die Ergebnisse in unserem In-vitro-Experiment erklärt werden, da sich Unterschiede zwischen den Genotypen erst zeigen konnten, nachdem es bereits zur Plättchenadhäsion an Kollagen gekommen war. Ein Freiliegen von Kollagenfasern, zum Beispiel durch einen Endotheldefekt durch die Ruptur eines artherosklerotischen Plaques, müsste daher bereits vorangehen, damit sich ein Unterschied zwischen den beiden Genotypen von HPA-1 zeigen kann.

Die Hypothese einer erhöhten Plättchenaktivierung oder einer quantitativ erhöhten Fibrinogenbindung durch die Plättchen konnte durch unsere Versuche weder gestützt noch verworfen werden.

Die Strömungsversuche mit Vollblut an immobilisiertem Fibrinogen konnten keinen Unterschied in der absoluten Adhäsion zwischen HPA-1a/1a- und HPA-1b/1b-Genotyp zeigen (Loncar et al., 2007). Eine mögliche Erklärung dafür könnte folgende Tatsache darstellen: Es bedarf keiner Aktivierung des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptors, um an immobilisiertes Fibrinogen zu binden (Ruggeri et al., 1999). Eine Plättchenaktivierung ist jedoch möglicherweise notwendig, damit sich ein phänotypischer Unterschied zwischen den beiden Genotypen zeigen kann. Eine weitere mögliche Erklärung könnten die rheologischen Bedingungen in der Kammer liefern. Sowohl in den eigenen Versuchen als auch in den Untersuchungen mit CHO-Zellen zeigte sich die Abhängigkeit des phänotypischen Unterschiedes zwischen den beiden Genotypen von den Scherkräften, die auf die Zellen wirken. Obwohl in den Adhäsionsexperimenten an Fibrinogen unterschiedliche und auch hohe Scherraten (bis zu 1500s^{-1}) verwendet wurden, ist die Kraft, die auf eine einzelne Schicht adhärenter Plättchen wirkt, kaum vergleichbar mit den Kräften an der Spitze eines Thrombus, der über $15\mu\text{m}$ in das Kammerlumen hineinragt. Weiter entsprach bei den Adhäsionsversuchen an immobilisiertem Fibrinogen die initiale Scherrate auch annähernd der Scherrate zum Ende des Versuchs, während sich die Scherraten bei der Thrombusentstehung an Kollagen durch die Verengung des Kammerlumens stetig erhöhten. Die Tatsache, dass bei den Flusskammeruntersuchungen mit immobilisiertem Fibrinogen als thrombogene Matrix ein signifikanter Unterschied in der relativen Adhäsion (Steigerung der Adhäsion von der 0. zur 5. Versuchsminute) der HPA-1a/1a- und HPA-1b/1b-Genotypen bei der höchsten angelegten Scherrate (1500s^{-1}) vorhanden war, deutet darauf hin, dass die Scher-

rate einen elementaren Faktor für die phänotypische Auswirkung des HPA-1b-Genotyps darstellt.

Die In-vitro-Daten, die unter Verwendung von mit $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten CHO-Zellen generiert wurden, weisen deutliche Parallelen zu unseren Befunden auf. Die CHO-Zellen mit dem HPA-1b-Genotyp binden stabiler an immobilisiertes Fibrinogen als ihr HPA-1a-Isotyp. Ein solcher Stabilitätsunterschied in der Fibrinogenbindung von $\alpha_{IIb}\beta_3$ könnte auch den von uns gezeigten Unterschieden zwischen Blutspendern mit dem Genotyp HPA-1a/1a und HPA-1b/1b zugrunde liegen.

Die Verwendung von $\alpha_{IIb}\beta_3$ -transfektierten CHO-Zellen ist ein eleganter Weg, um die Unterschiede zwischen den beiden Genotypen des HPA-1 Polymorphismus zu untersuchen, da Unwegsamkeiten durch die Verwendung von Spenderthrombozyten umgangen werden können. Alter, Geschlecht, Medikamenteneinnahme, Zigarettenrauchen und andere unbekannte Variablen können die Ergebnisse beeinflussen und, bei Ihrer Verwendung als Ausschlusskriterien, den Pool an Spendern verkleinern, der durch das seltene Vorkommen des HPA-1b/1b-Genotyps (zwei Prozent der Bevölkerung) schon sehr begrenzt ist.

Andererseits stellt die starke Abstraktion des In-vitro-Modells mit CHO-Zellen auch einen Nachteil dieses Ansatzes dar. Die CHO-Zellen sind um ein Vielfaches größer als Thrombozyten und weisen eine wesentlich geringere Rezeptordichte auf ihrer Oberfläche auf. Aus diesem Grund ist die Verbindung zur Fibrinogenmatrix wesentlich schwächer ausgeprägt als bei Plättchen und es kann, ebenfalls bedingt durch die größere Angriffsfläche der Zellen, in Flussexperimenten nur mit sehr niedrigen Scherraten gearbeitet werden ($25-100 \text{ s}^{-1}$). Diese Scherraten entsprechen nicht den Verhältnissen im arteriellen Gefäßsystem. Des Weiteren ist die Thrombogenese in vivo ein komplexer Vorgang der sich aus Adhäsion, Aktivierungsprozessen und Aggregation und dem damit verbundenen Zusammenspiel vieler unterschiedlicher Rezeptoren zusammensetzt. Die verwendeten CHO-Zellen stellen eine starke Vereinfachung dieses Vorgangs dar.

Das von uns entwickelte System „vierdimensionale Thrombogenese“ soll ein In-vitro-Modell mit möglichst großer Nähe zur Situation in vivo darstellen. Es soll bei arteriellen Scherraten sowohl die Adhäsion als auch die Aggregation mit all ihren Rezeptorinteraktionen und Aktivierungsvorgängen in ihrer natürlichen Umgebung, Vollblut, beobachtet werden. Es besteht erstmals die Möglichkeit, zusätzlich zur dreidimensionalen Darstellung der Thrombogenese auch ihre zeitliche Dynamik zu betrachten. Von besonderer Bedeutung ist die Verwendung von Kollagen als thrombogener Matrix, da somit die Thrombozytenadhäsion und, durch die

dreidimensionale Auswertung, in der Folge auch die Plättchenaggregation beobachtet werden kann. Die Computerauswertung erlaubt uns dann im Nachhinein, die beiden Prozesse virtuell wieder getrennt voneinander zu betrachten, indem die Thrombusgrundfläche separat von der Thrombushöhe und dem Thrombusvolumen berechnet wird. Die hohe Messgenauigkeit des Systems erlaubt die Detektion der Auswirkung selbst kleiner phänotypischer Differenzen unterschiedlicher Genotypen. Trotzdem ist die Effizienz des Systems auf die sorgfältige Auswahl von Blutspendern angewiesen, da starke Unterschiede in den Probandengruppen, zum Beispiel durch die Einnahme thrombozytenaggregationshemmender Medikamente, eine vergleichende Messung deutlich erschweren können.

Die verschiedenen In-vitro-Messmethoden sollten jedoch nicht als konkurrierende Verfahren, sondern als wichtige Ergänzung zueinander betrachtet werden. Das Verfahren der vierdimensionalen Thrombogenese ist imstande, in diesem Zusammenspiel der In-vitro-Verfahren eine Brücke zwischen den stark vereinfachenden Modellen der Thrombogenese und der komplexen Situation in vivo zu bilden.

Analog zu den Ergebnissen, die unter Verwendung von CHO-Zellen entstanden, konnte in den Experimenten mit dem Blut von 15 menschlichen Spendern gezeigt werden, dass sich in Flussexperimenten mit Blut von Spendern mit den HPA-1b/1b-Genotyp Thromben von größerer Höhe und größerem Thrombusvolumen bildeten als mit dem Blut von Spendern mit dem HPA-1a/1a-Genotyp.

4.3.3 Mögliche Weiterentwicklung der Experimente und der Messmethode

Bezogen auf den Vergleich der verschiedenen Genotypen von $\alpha_{IIb}\beta_3$ wurden bisher mit dem Verfahren der vierdimensionalen Thrombogenese nur Spender mit den Genotypen HPA-1a/1a und HPA-1b/1b miteinander verglichen. Die Auswirkungen des heterozygoten HPA-1a/1b-Genotyps auf die Thrombogenese sollten ebenfalls noch untersucht werden.

In den bereits durchgeführten Versuchen gab es klare Hinweise darauf, dass eine erhöhte Bindungsstabilität von $\alpha_{IIb}\beta_3$ zu seinem Liganden Fibrinogen und über $\alpha_{IIb}\beta_3$ und Fibrinogen auch eine erhöhte Stabilität der Verbindung zwischen Plättchen untereinander die Ursachen für den Unterschied im Thrombusvolumen und in der Thrombushöhe zwischen den untersuchten Genotypen darstellen. Allerdings muss diese These durch weitere Versuche und eine Weiterentwicklung des Messverfahrens erhärtet werden.

Einerseits sollten weitere Versuche durchgeführt werden, die in weiten Teilen den schon durchgeführten Versuchen entsprechen, die jedoch initiale Scherrate von 500s^{-1} modifizieren. Eine frühere Stagnation des Thrombuswachstums bei Anlage von höheren initialen Scherraten könnte den Verdacht erhärten, dass das Thrombuswachstum sich selbst limitiert, indem es das Kammerlumen mit fortschreitendem Wachstum einengt und die initiale Scherrate soweit erhöht, dass ein Anwachsen des Thrombusvolumens und der Thrombushöhe nicht weiter möglich ist.

Allerdings würden solche Versuche wiederum nur einen indirekten Beweis der Theorie erbringen. Daher wäre es zweckmäßig, wenn das Messverfahren so modifiziert werden könnte, dass während der Beobachtung der Thrombogenese im selben Flussexperiment zeitgleich rheologische Daten erfasst werden könnten, die in der Auswertung eine direkte Korrelation von Thrombusdaten und Strömungsdaten ermöglichen. Ein möglicher Ansatz hierzu wäre die Zugabe von fluoreszierenden Mikrosphären zum Vollblut, deren Signal in einem separaten Detektionskanal des Mikroskops erfasst wird. Die Bewegungsgeschwindigkeit und -richtung dieser Mikrosphären in allen Ebenen der Kammer könnte nun vom Computer berechnet werden und sowohl optisch (als Profil von Strömungsvektoren) als auch rechnerisch in die Auswertung der Thrombogenese miteinbezogen werden.

Es wäre wünschenswert, das räumliche und zeitliche Auflösungsvermögen der Methode weiter zu verbessern, damit einerseits sehr kleine Objekte als auch sehr kurzweilige/schnelle Vorgänge erfasst und dargestellt werden können. Dies würde zum Beispiel die Beobachtung der entstandenen Thromben als Quelle arterieller Emboli ermöglichen, indem man das Abreißen kleiner Thrombusteile während des Versuchs detektiert. Andererseits könnte möglicherweise die Neigung der Thromben in Strömungsrichtung bestimmt werden, um Aufschluss über die Thrombuselastizität zu geben.

Auch die Implementierung einer sogenannten „Tracking“-Funktion in die Auswertung, die Möglichkeit, die Position der einzelnen Thromben im Raum genau zu bestimmen und zu verfolgen, könnte nützliche Informationen erfassen. Die Beobachtung, dass sich die Einzelthromben im Versuchsverlauf aufeinander zu bewegen, könnte so quantifiziert und genauer untersucht werden.

Die Forschung am HPA-1-Polymorphismus des $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ sollte einerseits wegen der klinischen Relevanz des Polymorphismus selbst weitergeführt werden, jedoch auch, weil die phänotypisch unterschiedlichen genetischen Varianten des Rezeptors einen Ansatzpunkt bieten, um den Mechanismus der Rezeptorfunktion und seiner Ligandenbindung effektiv zu untersuchen.

Besonders das intrazelluläre Signaling rückt hier in den Mittelpunkt des Interesses. Auch bei diesem Forschungsschwerpunkt könnte das Verfahren der vierdimensionalen Thrombogenese Befunde, wie sie zum Beispiel im Bereich der CHO-Zellen schon gezeigt wurden, auf ihre Übertragbarkeit auf die Situation in vivo hin überprüfen.

5 Literaturverzeichnis

- Affeld, K., Reininger, A.J., Gadischke, J., Grunert, K., Schmidt, S., and Thiele, F. (1995). Fluid mechanics of the stagnation point flow chamber and its platelet deposition. *Artif Organs* 19, 597-602.
- Alevriadou, B.R., Moake, J.L., Turner, N.A., Ruggeri, Z.M., Folie, B.J., Phillips, M.D., Schreiber, A.B., Hrinca, M.E., and McIntire, L.V. (1993). Real-time analysis of shear-dependent thrombus formation and its blockade by inhibitors of von Willebrand factor binding to platelets. *Blood* 81, 1263-1276.
- Andrioli, G., Minuz, P., Solero, P., Pincelli, S., Ortolani, R., Lussignoli, S., and Bellavite, P. (2000). Defective platelet response to arachidonic acid and thromboxane A(2) in subjects with PI(A2) polymorphism of beta(3) subunit (glycoprotein IIIa). *Br J Haematol* 110, 911-918.
- Badimon, L., Turitto, V., Rosemark, J.A., Badimon, J.J., and Fuster, V. (1987). Characterization of a tubular flow chamber for studying platelet interaction with biologic and prosthetic materials: deposition of indium 111-labeled platelets on collagen, subendothelium, and expanded polytetrafluoroethylene. *J Lab Clin Med* 110, 706-718.
- Balasubramanian, V., Grabowski, E., Bini, A., and Nemerson, Y. (2002). Platelets, circulating tissue factor, and fibrin colocalize in ex vivo thrombi: real-time fluorescence images of thrombus formation and propagation under defined flow conditions. *Blood* 100, 2787-2792.
- Barnes, M.J. (1985). Collagens in atherosclerosis. *Coll Relat Res* 5, 65-97.
- Baskurt, O.K., Yalcin, O., and Meiselman, H.J. (2004). Hemorheology and vascular control mechanisms. *Clin Hemorheol Microcirc* 30, 169-178.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* 57, 289-300.
- Bennett, J.S., Catella-Lawson, F., Rut, A.R., Vilaire, G., Qi, W., Kapoor, S.C., Murphy, S., and FitzGerald, G.A. (2001). Effect of the PI(A2) alloantigen on the function of beta(3)-integrins in platelets. *Blood* 97, 3093-3099.
- Berendes, S. Medizinische Doktorarbeit am Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin -"in progress".
- Berg, K. (1982). The genetics of the hyperlipidemias and coronary artery disease. *Prog Clin Biol Res* 103 Pt B, 111-125.
- Born, G.V. (1962). Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194, 927-929.
- Bray, P.F. (2000). Platelet glycoprotein polymorphisms as risk factors for thrombosis. *Curr Opin Hematol* 7, 284-289.
- Carter, A.M., Ossei-Gerning, N., Wilson, I.J., and Grant, P.J. (1997). Association of the platelet PI(A) polymorphism of glycoprotein IIb/IIIa and the fibrinogen Bbeta 448 polymorphism with myocardial infarction and extent of coronary artery disease. *Circulation* 96, 1424-1431.
- Corral, J., Gonzalez-Conejero, R., Rivera, J., Iniesta, J.A., Lozano, M.L., and Vicente, V. (1997). HPA-1 genotype in arterial thrombosis--role of HPA-1b polymorphism in platelet function. *Blood Coagul Fibrinolysis* 8, 284-290.
- DeWood, M.A., Stifter, W.F., Simpson, C.S., Spores, J., Eugster, G.S., Judge, T.P., and Hinnen, M.L. (1986). Coronary arteriographic findings soon after non-Q-wave myocardial infarction. *N Engl J Med* 315, 417-423.
- Di Castelnuovo, A., de Gaetano, G., Donati, M.B., and Iacoviello, L. (2001). Platelet glycoprotein receptor IIIa polymorphism PLA1/PLA2 and coronary risk: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 85, 626-633.
- Dise, C.A., Burch, J.W., and Goodman, D.B. (1982). Direct interaction of mepacrine with erythrocyte and platelet membrane phospholipid. *J Biol Chem* 257, 4701-4704.
- Farrell, D.H., Thiagarajan, P., Chung, D.W., and Davie, E.W. (1992). Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10729-10732.
- Feng, D., Lindpaintner, K., Larson, M.G., Rao, V.S., O'Donnell, C.J., Lipinska, I., Schmitz, C., Sutherland, P.A., Silbershatz, H., D'Agostino, R.B., et al. (1999). Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa PLA2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 1142-1147.
- Fitzgerald, D.J., Roy, L., Catella, F., and FitzGerald, G.A. (1986). Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med* 315, 983-989.
- Fredrickson, B.J., Turner, N.A., Kleiman, N.S., Graziadei, N., Maresh, K., Mascelli, M.A., Effron, M.B., and McIntire, L.V. (2000). Effects of abciximab, ticlopidine, and combined Abciximab/Ticlopidine therapy on platelet and leukocyte function in patients undergoing coronary angioplasty. *Circulation* 101, 1122-1129.

- Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J.J., and Chesebro, J.H. (1992). The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 326, 242-250.
- Garcia-Ribes, M., Gonzalez-Lamuno, D., Hernandez-Estefania, R., Colman, T., Pocovi, M., Delgado-Rodriguez, M., Garcia-Fuentes, M., and Revuelta, J.M. (1998). Polymorphism of the platelet glycoprotein IIIa gene in patients with coronary stenosis. *Thromb Haemost* 79, 1126-1129.
- Gawaz, M. (1999). *Das Blutplättchen* (Georg Thieme Verlag Stuttgart - NewYork, ISBN-10: 3131182210).
- Goldsmith, H.L., and Turitto, V.T. (1986). Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-Report--Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 55, 415-435.
- Goodall, A.H., Curzen, N., Panesar, M., Hurd, C., Knight, C.J., Ouwehand, W.H., and Fox, K.M. (1999). Increased binding of fibrinogen to glycoprotein IIIa-proline33 (HPA-1b, PIA2, ZwB) positive platelets in patients with cardiovascular disease. *Eur Heart J* 20, 742-747.
- Grabowski, E.F. (1990). Platelet aggregation in flowing blood at a site of injury to an endothelial cell monolayer: quantitation and real-time imaging with the TAB monoclonal antibody. *Blood* 75, 390-398.
- Hafezi-Moghadam, A., Thomas, K.L., and Cornelissen, C. (2004). A novel mouse-driven ex vivo flow chamber for the study of leukocyte and platelet function. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C876-892.
- Herrmann, S.M., Poirier, O., Marques-Vidal, P., Evans, A., Arveiler, D., Luc, G., Emmerich, J., and Cambien, F. (1997). The Leu33/Pro polymorphism (PIA1/PIA2) of the glycoprotein IIIa (GPIIIa) receptor is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study. *Etude Cas-Temoins de l'Infarctus du Myocarde*. *Thromb Haemost* 77, 1179-1181.
- Jang, Y., Lincoff, A.M., Plow, E.F., and Topol, E.J. (1994). Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 24, 1591-1601.
- Kastrati, A., Schomig, A., Seyfarth, M., Koch, W., Elezi, S., Bottiger, C., Mehilli, J., Schomig, K., and von Beckerath, N. (1999). PIA polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of restenosis after coronary stent placement. *Circulation* 99, 1005-1010.
- Kroll, M.H., Hellums, J.D., McIntire, L.V., Schafer, A.I., and Moake, J.L. (1996). Platelets and shear stress. *Blood* 88, 1525-1541.
- Lam, J.Y., Chesebro, J.H., Steele, P.M., Dewanjee, M.K., Badimon, L., and Fuster, V. (1986). Deep arterial injury during experimental angioplasty: relation to a positive indium-111-labeled platelet scintigram, quantitative platelet deposition and mural thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 8, 1380-1386.
- Lefkovits, J., Plow, E.F., and Topol, E.J. (1995). Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 332, 1553-1559.
- Loncar, R., Kalina, U., Stoldt, V., Thomas, V., Scharf, R.E., and Vodovnik, A. (2006). Antithrombin significantly influences platelet adhesion onto immobilized fibrinogen in an in-vitro system simulating low flow. *Thromb J* 4, 19.
- Loncar, R., Stoldt, V., Hellmig, S., Zotz, R.B., Mihalj, M., and Scharf, R.E. (2007). HPA-1 polymorphism of alphaIIb beta3 modulates platelet adhesion onto immobilized fibrinogen in an in-vitro flow system. *Thromb J* 5, 2.
- Loncar, R., Stoldt, V., Thomas, V., Zotz, R.B., and Scharf, R.E. (2005). Modulation of platelet adhesion by antithrombin. *Blood* 106, 3954.
- Meiklejohn, D.J., Vickers, M.A., Morrison, E.R., Dijkhuisen, R., Moore, I., Urbaniak, S.J., and Greaves, M. (2001). In vivo platelet activation in atherothrombotic stroke is not determined by polymorphisms of human platelet glycoprotein IIIa or Ib. *Br J Haematol* 112, 621-631.
- Meisel, C., Lopez, J.A., and Stangl, K. (2004). Role of platelet glycoprotein polymorphisms in cardiovascular diseases. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369, 38-54.
- Michelson, A.D., Furman, M.I., Goldschmidt-Clermont, P., Mascelli, M.A., Hendrix, C., Coleman, L., Hamlington, J., Barnard, M.R., Kickler, T., Christie, D.J., et al. (2000). Platelet GP IIIa PI(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation* 101, 1013-1018.
- Mikkelsson, J., Perola, M., Laippala, P., Penttila, A., and Karhunen, P.J. (2000). Glycoprotein IIIa PI(A1/A2) polymorphism and sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol* 36, 1317-1323.
- Mikkelsson, J., Perola, M., Laippala, P., Savolainen, V., Pajarinen, J., Lalu, K., Penttila, A., and Karhunen, P.J. (1999). Glycoprotein IIIa PI(A) polymorphism associates with progression of coronary artery disease and with myocardial infarction in an autopsy series of middle-aged men who died suddenly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 2573-2578.

- Moroi, M., Onitsuka, I., Imaizumi, T., and Jung, S.M. (2000). Involvement of activated integrin alpha2beta1 in the firm adhesion of platelets onto a surface of immobilized collagen under flow conditions. *Thromb Haemost* 83, 769-776.
- Müller-Berghaus G., P.B. (1999). *Hämostaseologie, Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik*, ISBN-10: 3540600914 (Springer Berlin Heidelberg).
- Murata, K., Motayama, T., and Kotake, C. (1986). Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis* 60, 251-262.
- Newman, P.J. (1997). Platelet alloantigens: cardiovascular as well as immunological risk factors? *Lancet* 349, 370-371.
- Nieswandt, B., and Watson, S.P. (2003). Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 102, 449-461.
- Nivelstein, P.F., de Groot, P.G., D'Alessio, P., Heijnen, H.F., Orlando, E., and Sixma, J.J. (1990). Platelet adhesion to vascular cells. The role of exogenous von Willebrand factor in platelet adhesion. *Arteriosclerosis* 10, 462-469.
- Niiya, K., Hodson, E., Bader, R., Byers-Ward, V., Koziol, J.A., Plow, E.F., and Ruggeri, Z.M. (1987). Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood* 70, 475-483.
- Pastinen, T., Perola, M., Niini, P., Terwilliger, J., Salomaa, V., Vartiainen, E., Peltonen, L., and Syvanen, A. (1998). Array-based multiplex analysis of candidate genes reveals two independent and additive genetic risk factors for myocardial infarction in the Finnish population. *Hum Mol Genet* 7, 1453-1462.
- Patel, D., Vaananen, H., Jirouskova, M., Hoffmann, T., Bodian, C., and Collier, B.S. (2003). Dynamics of GPIIb/IIIa-mediated platelet-platelet interactions in platelet adhesion/thrombus formation on collagen in vitro as revealed by videomicroscopy. *Blood* 101, 929-936.
- Phillips, D.R., and Agin, P.P. (1977). Platelet membrane defects in Glanzmann's thrombasthenia. Evidence for decreased amounts of two major glycoproteins. *J Clin Invest* 60, 535-545.
- Phillips, D.R., Nannizzi-Alaimo, L., and Prasad, K.S. (2001). Beta3 tyrosine phosphorylation in alphaIIb beta3 (platelet membrane GP IIb-IIIa) outside-in integrin signaling. *Thromb Haemost* 86, 246-258.
- Plow, E.F., Haas, T.A., Zhang, L., Loftus, J., and Smith, J.W. (2000). Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 275, 21785-21788.
- Poncz, M., Eisman, R., Heidenreich, R., Silver, S.M., Vilaire, G., Surrey, S., Schwartz, E., and Bennett, J.S. (1987). Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb. Homology to the alpha subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors. *J Biol Chem* 262, 8476-8482.
- Pries, A.R., and Secomb, T.W. (2003). Rheology of the microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc* 29, 143-148.
- Quinn, M.J., Byzova, T.V., Qin, J., Topol, E.J., and Plow, E.F. (2003). Integrin alphaIIb beta3 and its antagonism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 945-952.
- Read, N.G., and Trist, D.G. (1982). The uptake of mepacrine by horse polymorphonuclear leucocytes in vitro. *J Pharm Pharmacol* 34, 711-714.
- Ridker, P.M., Hennekens, C.H., Schmitz, C., Stampfer, M.J., and Lindpaintner, K. (1997). PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet* 349, 385-388.
- Rosenberg, R.D., and Aird, W.C. (1999). Vascular-bed--specific hemostasis and hypercoagulable states. *N Engl J Med* 340, 1555-1564.
- Ruggeri, Z.M. (2003). Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 1, 1335-1342.
- Ruggeri, Z.M., Dent, J.A., and Saldívar, E. (1999). Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood* 94, 172-178.
- Ruoslahti, E., and Pierschbacher, M.D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238, 491-497.
- Salkind, N. (2006). *Encyclopedia of Measurement and Statistics*, ISBN-10 1412916119, 1st edition edn (Sage Publications, Inc).
- Sarratt, K.L., Chen, H., Zutter, M.M., Santoro, S.A., Hammer, D.A., and Kahn, M.L. (2005). GPVI and alpha2beta1 play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow. *Blood* 106, 1268-1277.
- Savage, B., Almus-Jacobs, F., and Ruggeri, Z.M. (1998). Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 94, 657-666.

- Savage, B., Saldivar, E., and Ruggeri, Z.M. (1996). Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 84, 289-297.
- Savage, B., Shattil, S.J., and Ruggeri, Z.M. (1992). Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J Biol Chem* 267, 11300-11306.
- Scaglione, L., Bergerone, S., Gaschino, G., Imazio, M., Maccagnani, A., Gambino, R., Cassader, M., Di Leo, M., Macchia, G., Brusca, A., *et al.* (1998). Lack of relationship between the P1A1/P1A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and premature myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 28, 385-388.
- Scharf, R.E., and Harker, L.A. (1987). Thrombosis and atherosclerosis: regulatory role of interactions among blood components and endothelium. *Blut* 55, 131-144.
- Shimazaki, T., Goto, S., Sakakibara, M., Eto, K., Kim, J.Y., Ichikawa, N., Yoshida, M., Nagaoka, Y., Isshiki, T., and Handa, S. (2000). [Different inhibiting effects of abciximab and tirofiban on platelet thrombus formation on a collagen surface under flow conditions]. *J Cardiol* 36, 113-121.
- Siljander, P.R., Munnix, I.C., Smethurst, P.A., Deckmyn, H., Lindhout, T., Ouwehand, W.H., Farndale, R.W., and Heemskerk, J.W. (2004). Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. *Blood* 103, 1333-1341.
- Skaer, R.J., Flemans, R.J., and McQuilkan, S. (1981). Mepacrine stains the dense bodies of human platelets and not platelet lysosomes. *Br J Haematol* 49, 435-438.
- Sorensen, T.I., Nielsen, G.G., Andersen, P.K., and Teasdale, T.W. (1988). Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 318, 727-732.
- Statistisches-Bundesamt (2010). Todesursachen in Deutschland 2008. *Publikationsservice des Statistischen Bundesamtes Fachserie 12, Reihe 4*. Hg.: Statistisches Bundesamt, Wiesbaden
- Thomas, S. (2002). Platelet membrane glycoproteins in haemostasis. *Clin Lab* 48, 247-262.
- Trikha, M., Timar, J., Lundy, S.K., Szekeres, K., Tang, K., Grignon, D., Porter, A.T., and Honn, K.V. (1996). Human prostate carcinoma cells express functional alphaIIb(beta)3 integrin. *Cancer Res* 56, 5071-5078.
- Valentin, N., and Newman, P.J. (1994). Human platelet alloantigens. *Curr Opin Hematol* 1, 381-387.
- Vijayan, K.V., Goldschmidt-Clermont, P.J., Roos, C., and Bray, P.F. (2000). The PI(A2) polymorphism of integrin beta(3) enhances outside-in signaling and adhesive functions. *J Clin Invest* 105, 793-802.
- Vijayan, K.V., Huang, T.C., Liu, Y., Bernardo, A., Dong, J.F., Goldschmidt-Clermont, P.J., Alevriadou, B.R., and Bray, P.F. (2003a). Shear stress augments the enhanced adhesive phenotype of cells expressing the Pro33 isoform of integrin beta3. *FEBS Lett* 540, 41-46.
- Vijayan, K.V., Liu, Y., Dong, J.F., and Bray, P.F. (2003b). Enhanced activation of mitogen-activated protein kinase and myosin light chain kinase by the Pro33 polymorphism of integrin beta 3. *J Biol Chem* 278, 3860-3867.
- Vijayan, K.V., Liu, Y., Sun, W., Ito, M., and Bray, P.F. (2005). The Pro33 isoform of integrin beta3 enhances outside-in signaling in human platelets by regulating the activation of serine/threonine phosphatases. *J Biol Chem* 280, 21756-21762.
- Voetsch, B., and Loscalzo, J. (2004). Genetic determinants of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 216-229.
- Wagner, C.L., Mascelli, M.A., Neblock, D.S., Weisman, H.F., Collier, B.S., and Jordan, R.E. (1996). Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 88, 907-914.
- Walter, D.H., Schachinger, V., Elsner, M., Dimmeler, S., and Zeiher, A.M. (1997). Platelet glycoprotein IIIa polymorphisms and risk of coronary stent thrombosis. *Lancet* 350, 1217-1219.
- Weiss, E.J., Bray, P.F., Tayback, M., Schulman, S.P., Kickler, T.S., Becker, L.C., Weiss, J.L., Gerstenblith, G., and Goldschmidt-Clermont, P.J. (1996). A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 334, 1090-1094.
- Williams, M.S., and Bray, P.F. (2001). Genetics of arterial prothrombotic risk states. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 409-419.
- Wu, A.H., and Tsongalis, G.J. (2001). Correlation of polymorphisms to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular diseases. *Am J Cardiol* 87, 1361-1366.
- Xiong, J.P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D.L., Joachimiak, A., Goodman, S.L., and Arnaout, M.A. (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* 294, 339-345.
- Yee, D.L., Sun, C.W., Bergeron, A.L., Dong, J.F., and Bray, P.F. (2005). Aggregometry detects platelet hyper-reactivity in healthy individuals. *Blood* 106, 2723-2729.
- Zimrin, A.B., Eisman, R., Vilaire, G., Schwartz, E., Bennett, J.S., and Poncz, M. (1988). Structure of platelet glycoprotein IIIa. A common subunit for two different membrane receptors. *J Clin Invest* 81, 1470-1475.

Zotz, R.B., Klein, M., Dauben, H.P., Moser, C., Gams, E., and Scharf, R.E. (2000). Prospective analysis after coronary-artery bypass grafting: platelet GP IIIa polymorphism (HPA-1b/PIA2) is a risk factor for bypass occlusion, myocardial infarction, and death. *Thromb Haemost* 83, 404-407.

Zotz, R.B., Winkelmann, B.R., Nauck, M., Giers, G., Maruhn-Debowski, B., Marz, W., and Scharf, R.E. (1998). Polymorphism of platelet membrane glycoprotein IIIa: human platelet antigen 1b (HPA-1b/PIA2) is an inherited risk factor for premature myocardial infarction in coronary artery disease. *Thromb Haemost* 79, 731-735.

6 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

6.1 Verzeichnis der Abbildungen

		Seite
Abb.1 a & b	Vereinfachtes Schema (a) und Kristallstruktur (b) von $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$	12
Abb.2	Schematischer Aufbau der rechteckigen Strömungskammer	23
Abb.3	Strömungskammer (Einzelteile)	23
Abb.4	Zusammengesetzte Strömungskammer	24
Abb.5	Vereinfachte Darstellung des Strahlenganges im LSM	26
Abb.6	Versuchsaufbau, Aufbau des Laser-Scanning-Mikroskops	27
Abb.7	Versuchsaufbau, die Strömungskammer im LSM	27
Abb.8 a & b	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Kollagentropfens	31
Abb.9	Darstellung der Bildakquisition durch den Computer	34
Abb.10	Schema von vier benachbarte Voxeln und zwei Thrombozyten	35
Abb.11	Dreidimensionale Rekonstruktion der Thrombogenese	36
Abb.12	Volumen von Mikrosphären $\varnothing 6\mu\text{m}$	40
Abb.13 a-c	Thrombozytenadhäsion unter flussdynamischen Bedingungen nach 10 Minuten an verschiedene Oberflächen	41
Abb.14	Thrombogenese unter flussdynamischen Bedingungen, nativ und unter Zugabe Abciximab	42
Abb.15 a & b	Leukozytenrolling in der Durchlichtmikroskopie	43
Abb.16	Mittleres Gesamt-Thrombusvolumen	45
Abb.17	Mittlere Thrombenanzahl	46
Abb.18	Mittleres Einzelthrombusvolumen	47
Abb.19	Mittlere Einzelthrombusgrundfläche	49

Abb.20	Mittlere Einzelthrombushöhe	50
Abb.21	Mittlere Thrombusanzahl. HPA-1a/1a und HPA-1b/1b	52
Abb.22	Mittleres Thrombuseinzelvolumen. HPA-1a/1a und HPA-1b/1b	53
Abb.23	Mittlere Einzelthrombusgrundfläche. HPA-1a/1a und HPA-1b/1b	54
Abb.24	Mittlere Einzelthrombushöhe. HPA-1a/1a und HPA-1b/1b	55
Abb.25	Schematische Darstellung der postulierten, über die Versuchsdauer ansteigenden Scherraten in der Flusskammer	62

6.2 Verzeichnis der Tabellen

		Seite
Tab.1	Probandenkollektiv und Untersuchungszeitpunkt	29
Tab.2	Statistische Daten zu Abb.12	40

7 Zusammenfassung

„Dynamik des Thrombuswachstums in vitro. Validierung digitaler Imaging-Techniken zur exakten Bestimmung der Thrombusvolumina.“

Die Visualisierung und Quantifizierung von Plättchenthromben unter arteriellen Flussbedingungen bei hohen Scherraten, entsprechend denen in Arteriolen, stellt eine große Herausforderung dar. Messung der Thrombusstabilität in Abhängigkeit der Blutrheologie bietet grundsätzlich die Möglichkeit, wichtige Informationen zu einer Vielzahl klinischer Fragestellungen bei Krankheitsbildern mit thrombembolischer Genese zu liefern. Molekular-epidemiologische Studien haben gezeigt, dass Thrombozytenfunktion und arterielle Thrombogenese durch Polymorphismen von Plättchenmembranrezeptoren moduliert werden können. Hierbei wurde die Rezeptorvariante HPA-1b des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ als Risikofaktor für eine erhöhte Plättchenthrombogenität identifiziert. Die konfokale Lasermikroskopie ermöglicht, durch die Generierung von hochauflösenden Bildstapeln, die dreidimensionale Darstellung untersuchter Objekte. Durch die räumliche Rekonstruktion von in regelmäßigen Zeitintervallen akquirierten Bildstapeln gelingt die 4-dimensionale Messung von dynamischen Prozessen.

Plättchen im Zitrat-antikoagulierten Vollblut, fluoreszenzgefärbt mit Mepacrin ($10\mu\text{M}$), wurden mittels einer Perfusorpumpe durch eine rechteckige Flusskammer mit einer initialen Scherrate von 500s^{-1} aspiriert. Der Boden der Kammer wurde vorher mit Kollagen vom Typ 1 beschichtet und anschließend mit bovinem Serumalbumin (2%) geblockt. Die Flusskammer unter einem konfokalen Lasermikroskop (Axiovert 100M) befestigt. Während der Blutaspiration durch die Kammer wurde eine Serie von Bildstapeln, bestehend aus jeweils 30 optischen Schnittbildern, gemessen alle 25s, auf einer Untersuchungsfläche von $260\mu\text{m}^2$ akquiriert. Die generierten Daten wurden mit einer Voxel-basierten Software ausgewertet, wobei ein Voxel definiert ist durch ein Volumen von $2,025 \times 10^{-10} \text{mm}^3$.

Zu Validierungszwecken wurden definierte Mikrosphären mit einem Durchmesser von $6\mu\text{m}$ untersucht. Ihr Volumen konnte mit hoher Genauigkeit bestimmt werden (MW \pm SD: $130,42\pm 17,49\mu\text{m}^3$). Repetitive Messungen mit dem Blut eines Individuums zeigten ein einheitliches Verlaufsmuster der bestimmten Thrombusparameter (Volumen, Höhe, Grundfläche und Anzahl). Bei einer initialen Scherrate von 500s^{-1} begann das Thrombuswachstum nach einer Verzögerungsphase von 225s. Nach 420s erreichte der Zuwachs im Thrombusvolumen eine Plateauphase (MW \pm SD: $9,9 \times 10^{-6}\pm 8,9 \times 10^{-7}\text{mm}^3$). Die Thrombusbildung wurde bei spezifischer Blockade von $\alpha_{IIb}\beta_3$ durch Zugabe des chimären Antikörpers Abciximab ($4\mu\text{g/ml}$) komplett unterdrückt. Der HPA-1 Polymorphismus von $\alpha_{IIb}\beta_3$ zeigte einen signifikanten Einfluss auf das Thrombuswachstum. Im Vergleich der In-vitro-Thrombogenese von homozygoten Trägern von HPA-1b (n=7) mit Trägern von HPA-1a (n=8) zeigte sich bei Blutspendern mit dem HPA-1a-Genotyp ein vorzeitiges Erreichen der Plateauphase im Gegensatz zur HPA-1b-Gruppe, welche konsekutiv höhere Thrombusvolumina bzw. Thrombushöhen aufwies (p<0,05 bzw. p<0,01).

Die hier etablierte Voxel-basierte Methode zur dynamischen Quantifizierung von Thrombusbildung und Thrombusprogression in vitro stellt eine valide Technik dar, um Thrombusvolumen, -anzahl, -höhe und -grundfläche zu vermessen und die spezifischen Charakteristika und die Dynamik der Thrombogenese quantitativ darzustellen. Bei den untersuchten Genotypen des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ konnte eine statistisch signifikante Steigerung von Volumen und Höhe der untersuchten Thromben in der HPA-1b Population nachgewiesen werden. Da das Thrombuswachstum den Flusskanal innerhalb der Flusskammer sukzessive einengt, müssen die Thromben steigenden Scherraten widerstehen. Dieses Phänomen kann als indirekter Hinweis der Thrombusstabilität verwendet werden, so dass sich die Hypothese einer gesteigerten Thrombusstabilität beim HPA-1b Genotyps ergibt.

8 Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger E. Scharf für die freundliche Überlassung des Themas. Meine Entscheidung eine wissenschaftliche Karriere anzustreben wurde maßgeblich durch Ihn und die Arbeit im IHTM beeinflusst.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Volker Stoldt, der mir und allen anderen Doktoranden wirklich allzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Insbesondere in den wissenschaftlichen Durststrecken wäre ich ohne seine Hilfe verloren gewesen.

Danke an Bianka Weingart-Maaßen für die Unterstützung und Anleitung in den großen aber vor allem vielen kleinen Problemen im Laboralltag.

Meinem Bruder Robert Peveling-Oberhag, den ich mit zunehmendem Alter immer mehr liebe.

Meiner Großmutter, Margret Beisemann, die mich zu einem sehr frühen Zeitpunkt in meinem Leben mit Erdbeeren vor dem Verhungern gerettet hat und mich stets durch ihre endlose Herzlichkeit beeindruckt.

Vielen Dank an meinen Vater, Dr. med. Franz-Josef Peveling-Oberhag, der mich in vielerlei Hinsicht stetig auf dem Weg zum Doktorhut unterstützt hat. Ich habe von ihm unermesslich viel gelernt und genieße jede Minute, die ich mit ihm verbringen darf.

Endlosen Dank an meine Mutter, Dr. med. Sabine Peveling-Oberhag. Auch nur einen Bruchteil der Dinge hier schriftlich festzuhalten, wegen derer ich Dir zu Dank verpflichtet bin, würde bei Weitem den Rahmen meiner sowieso schon viel zu langen Dissertationsschrift sprengen. Danke, danke, danke für alles!

Adriane Groffik, auch wenn ich mittlerweile feststellen durfte, dass mir der Arztberuf sehr viel Freude bereitet, so würde ich, auch wenn dies nicht so wäre, jederzeit wieder diesen Weg einschlagen, nur um Dich im Studium kennenzulernen. Du bist das Beste was mir je passiert ist. Ich liebe Dich.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Jan Franz-Josef Peveling-Oberhag

Geboren am 11.12.1979 in Lübbecke

Schul- und Hochschul- bildung

08/1986 – 06/1990

Grundschule GGS Düsseldorf

08/1990 – 05/1999

Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium, Düsseldorf

Abschluss: Abitur - Note: 1,5

10/2000 – 06/2007

Studium der Humanmedizin

Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Abschluss: Staatsexamen – Note: Sehr Gut

06/2007

Approbation als Arzt

Berufsausbildung

09/2007 – heute

Assistenzarzt, Medizinischen Klinik 1 des Klinikums der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main,
Fachbereich Gastroenterologie und Hepatologie,
Direktor Prof. Dr. S. Zeuzem

Forschung

2003 – heute

Dissertation, Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

09/2008

Forschungsstipendium der August Scheidel-Stiftung

Projekt: *„Dynamik der Hepatitis B Virus-Quasispeziesheterogenität für das virologische Ansprechen auf eine Nukleosid-basierte antivirale Therapie.“*

05/2009

Förderung und Dienstbefreiung durch das Programm: „Förderung durch das Patenschaftsmodell (Tandemstellen)“ der Medizinischen Fakultät der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Projekt: *„Untersuchung von Ätiologie und Pathogenese der Lymphomentstehung bei Patienten mit chronischer Hepatitis C mittels globaler Microarray-basierter Genexpressionsanalyse und Analyse tumorspezifischer Polymorphismen durch genomweite SNP-Chip-Analyse.“*

Publikationen/Vorträge zur Dissertation

Veröffentlichungen in Abstract- und Posterform

- V.R. Stoldt, **J. Peveling**, R. Loncar, A. Beck, V. Aurich, and R.E. Scharf. *Evaluation of platelet thrombus formation under flow*. Blood, 2005; 106: 70B-71B.
- V.R. Stoldt, **J. Peveling**, R. Loncar, A. Beck, V. Aurich, R.E. Scharf. *Imaging of platelet thrombus formation under experimental flow conditions*. Poster P220, Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose und Hämostaseforschung, Basel, 2006.
- **J. Peveling**, V.R. Stoldt, V. Aurich, A. Beck, R.E. Scharf. *Dynamics of Thrombogenesis in vitro: Evaluation of a New Four-Dimensional Imaging Readout System*. Transfus Med Hemother, 2008; 35(suppl 1): 1-96.

Vorträge

- Kolloquium des SFB 612 2003
- Kolloquium des SFB 512 2005
- Kongress der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Düsseldorf 2008, Scientific Session: O5

Frankfurt am Main, den

Jan Franz-Josef Peveling-Oberhag

10 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
CD40L	CD40 Ligand
CHO-Zellen	Chinesische Hamsterovarienzellen
CI	Konfidenzintervall
Cys	Cystein
EGF	Endothelial Growth Factor
ERK2	Extracellular Signal-regulated Kinase 2
GP	Glykoprotein
HPA-1	Human Platelet Antigen-1
IHTM	Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin
ITGB3	Integrin Beta 3 Gen
KHK	Koronare Herzkrankheit
LIBS	Ligand Induced Binding Sites
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
Max	Maximum
MED	Median
MIDAS	Metal-Ion-Dependent-Adhesion-Site
Min	Minimum
MLCK	Myosin Light-Chain Kinase
MW	Mittelwert
PBS	Phosphate Buffer Solution
PLT	Plättchen
PNG	Portable Network Graphics

pp125 ^{FAK}	pp125 Focal Adhesion Kinase
PPACK	D-Phenylalanyl-L-Prolyl-L-Arginin Chloromethyl Keton
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
PTCA	Perkutane Transluminale Koronarangioplastie
RGD-Sequenz	Arginin-Glycin-Aspartat-Sequenz
SD	Standardabweichung
SEM	Standardmessfehler
Voxel	Dreidimensionales Äquivalent eines Pixels
vWF	Von-Willebrand-Faktor