

Aus dem Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. Rüdiger Eberhard Scharf

**Einfluss des HPA-1-Polymorphismus des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$   
auf die Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen  
unter arteriellen und venösen Blutflussbedingungen  
in einem In-vitro-Modell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

Sabine Opalka

2011

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

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

Referent: Univ.-Prof. Dr. Scharf

Korreferent: Prof. Dr. Hohlfeld

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Problemstellung	1
1.2 Hintergrund und Einordnung der Arbeit	3
1.2.1 Die Bedeutung der thrombozytären Membranproteine bei der arteriellen Thrombogenese	3
1.2.2 Integrine	5
1.2.3 Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$	7
1.2.4 Der HPA-1-Polymorphismus	8
1.3 Bisherige Studien	9
1.4 Zielsetzung der Arbeit	10
<b>2. Material und Methodik</b>	<b>11</b>
2.1 Material	11
2.1.1 Materialien und Geräte	11
2.1.2 Reagenzien	16
2.1.3 Probanden	17
2.2 Methodik	21
2.2.1 Versuchsvorbereitung	21
2.2.1.1 Vorbereitung und Beschichtung der Deckgläschen	21
2.2.1.2 Entnahme und Vorbehandlung des Blutes	22
2.2.1.3 Reinigung und Vorbereitung der Strömungskammer	22
2.2.1.4 Einstellungen des Laser-Scanning-Mikroskops	23
2.2.1.5 Fokussierung	23
2.2.2 Versuchsablauf	23
2.2.3 Messungsablauf	24
2.2.4 Auswertung der Messungen	25
2.2.5 Statistische Methoden	26
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1 Darstellung der Ergebnisse	29
3.2 Spezifität der Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen	31
3.3 Absolute Plättchenadhäsion	33
3.3.1 Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen bei ansteigender Scherrate	33
3.3.1.1 Graphische Darstellung der Ergebnisse	33
3.3.1.2 Lasermikroskopische Bilder	35
3.3.2 Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen im Zeitverlauf	38
3.3.2.1 Graphische Darstellung der Ergebnisse	38
3.3.2.2 Lasermikroskopische Bilder	39

---

3.3.3	Einfluss des HPA-1-Polymorphismus des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf die Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen bei ansteigender Scherrate	43
3.3.3.1	Plättchenadhäsion in Minute 0	43
3.3.3.2	Plättchenadhäsion nach Minute 1	45
3.3.3.3	Plättchenadhäsion nach Minute 5	47
3.3.4	Einfluss des HPA-1-Polymorphismus des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf die Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen im Zeitverlauf	49
3.3.4.1	Plättchenadhäsion bei geringer Scherrate ( $50 \text{ s}^{-1}$ )	49
3.3.4.2	Plättchenadhäsion bei mittlerer Scherrate ( $500 \text{ s}^{-1}$ )	51
3.3.4.3	Plättchenadhäsion bei hoher Scherrate ( $1.500 \text{ s}^{-1}$ )	53
3.4	Relative Plättchenadhäsion	55
3.4.1	Vergleich zwischen Minute 5 und Minute 1	56
3.4.2	Vergleich zwischen Minute 1 und Minute 0	58
3.4.3	Vergleich zwischen Minute 5 und Minute 0	59
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>61</b>
4.1	Hintergrund	61
4.2	Adhäsionsverhalten der Blutplättchen bei ansteigender Scherrate	64
4.3	Adhäsionsverhalten der Blutplättchen im Zeitverlauf	65
4.4	Einfluss des HPA-1-Polymorphismus des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$	66
4.5	Klinische Relevanz der Ergebnisse	70
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	<b>74</b>
6.1	Abkürzungsverzeichnis	74
6.2	Symbolverzeichnis	75
6.3	Abbildungsverzeichnis	76
6.4	Tabellenverzeichnis	78
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>80</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Problemstellung

Arterielle Thrombosen mit ihren Folgen, wie Myokardinfarkt und ischämischer zerebraler Insult, stellen wesentliche Komplikationen der Arteriosklerose dar und sind in den Westlichen Industrieländern die Hauptursache für Morbidität und Mortalität. In Deutschland werden gegenwärtig etwa 19 % der Todesfälle durch ischämische Herzerkrankungen und etwa 9 % durch zerebrovaskuläre Erkrankungen ausgelöst [1].

Während diese Todesursachen – weltweit gesehen – 1990 noch auf den Plätzen 5 und 6 rangierten, sieht eine Voraussage, die sich auf aktuelle Trends stützt, die ischämische Herzerkrankung im Jahr 2020 als weltweit führende Ursache für Mortalität [2].

Bereits im Jahr 1856 konnten diejenigen Determinanten benannt werden, die zur Entstehung der venösen Thrombose beitragen (Virchow-Trias der Thromboseentstehung) [3]. Pathogenetisch relevant sind Störungen der:

- 1) Gefäßwand
- 2) Komponenten des Blutes
- 3) Blutströmung

Die Interaktionen zwischen diesen drei Determinanten sind in ihren Grundzügen auch für die arterielle Thrombogenese zutreffend. Sie werden verstärkt durch weitere (klassische) Risikofaktoren, zu denen arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Adipositas, Immobilisation, Stress, Hyperfibrinogenämie, Hyperhomocysteinämie sowie auch Alter und Geschlecht gehören [4, 5].

Im Folgenden wird auf die Virchow-Trias der Thromboseentstehung näher eingegangen.

zu 1) Gefäßwand: Die Beschaffenheit der Gefäßwand ist die erste Einflussgröße für eine Thrombusbildung. So führt eine Gefäßwandschädigung, z.B. durch Läsionen des Endothels oder Ruptur arteriosklerotischer Plaques, zur Freilegung von Kollagen und Ablagerung von Fibrinogen mit anschließender Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten (Blutplättchen). Hieraus resultiert unter physiologischen Bedingungen eine Abdichtung und Wundheilung der Gefäßwandläsion, unter pathologischen Bedingungen hingegen ein okkludierender Thrombus [6].

zu 2) Komponenten des Blutes: Periphere Thrombozytenkonzentration und Hämatokrit sind weitere entscheidende Einflussgrößen der Thrombozytenadhäsion.

Die Verteilung dieser Blutkomponenten ist im strömenden Blut nicht homogen. Erythrozyten sind in der Mitte des Stromes konzentriert, wodurch die kleineren Thrombozyten an den Rand, also an die Gefäßwand, gedrängt werden [3, 7]. Die Konsequenz ist, dass die Konzentration der Plättchen nahe der Gefäßwand ansteigt [7]. Wie in mehreren Studien dargestellt, steht die Höhe des Hämokrits in einem proportionalen Verhältnis zur Thrombozytenadhäsion [7, 8, 9, 10].

zu 3) Blutströmung: Weitere Determinanten, die zur Entstehung einer Thrombose beitragen, sind u.a. die Viskosität des Blutes (z.B. bedingt durch Hämatokrit und Fibrinogenkonzentration) und die Flussgeschwindigkeit bzw. Scherrate. Die Plättchenadhäsion steigt mit zunehmender Flussgeschwindigkeit des Blutes signifikant an [11, 12]. In den letzten Jahren wurden Modellsysteme entwickelt, welche die Blutflussbedingungen in gesunden, aber auch in verletzten, verengten und verzweigten Gefäßen simulieren können. Dadurch können kontrollierte rheologische Bedingungen generiert werden, analog den hämodynamischen Verhältnissen in vivo [3].

Ein Flüssigkeitsstrom durch ein Blutgefäß ist – bei differenzierter Betrachtung – aus einzelnen angrenzenden Flüssigkeitsschichten aufgebaut, die sich parallel zueinander bewegen. Im Querschnitt durch ein Blutgefäß ist die Flussgeschwindigkeit dieser angrenzenden Blutschichten nicht einheitlich. So ist in der Mitte des Blutgefäßes die Geschwindigkeit höher als an den Randzonen [3]. Der Geschwindigkeitsunterschied zwischen diesen angrenzenden Blutschichten wird als lokale Scherrate („shear rate“) bezeichnet, diese hat die Dimension  $s^{-1}$  (reziproke Sekunde) [13]. Die Scherrate ist maximal an der Gefäßwand, und sie ist minimal, nämlich Null, im Gefäßzentrum [3, 14]. In großen Arterien beträgt sie  $300-800 s^{-1}$ , in Arteriolen  $500-1.600 s^{-1}$ , in Venen  $20-200 s^{-1}$ . In stenosierten Gefäßen kann die Scherrate bis zu  $10.000 s^{-1}$  betragen [3].

Zusätzlich zu diesen drei schon lange bekannten Determinanten wurden in den letzten Jahren auch genetisch bedingte prothrombotische Risikodeterminanten untersucht. Hierbei sind verschiedene thrombozytäre Membranproteine in Betracht zu ziehen.

Diese Membranproteine sind Rezeptoren verschiedener Liganden für die Plättchenadhäsion und -aggregation auf thrombogenen Oberflächen.

Besonderer Wert wurde bei diesen Untersuchungen auf das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  gelegt, welches eine zentrale Bedeutung bei der Plättchenaggregation hat [15]. Es wirkt als Rezeptor für Fibrinogen und für den von Willebrand-Faktor (vWF), außerdem für Vitronektin, Fibronektin und Thrombospondin [16]. Mittlerweile wird diesem Integrin eine zentrale Rolle bei der Entstehung arterieller Thrombosen zugeschrieben [15, 17].

## 1.2 Hintergrund und Einordnung der Arbeit

### 1.2.1 Die Bedeutung der thrombozytären Membranproteine bei der arteriellen Thrombogenese

Eine Endothelläsion oder Ruptur arteriosklerotischer Plaques führt im Bereich der Gefäßwand zur Freilegung subendothelialer Matrixproteine, u.a. von Kollagenfasern, an die sich Thrombozyten anheften. Bei diesem Prozess sind die thrombozytären Membranproteine entscheidend.

Moduliert und gesteuert wird die Anheftung durch Adhäsivproteine, vasoaktive Substanzen und Enzyme, wobei die Adhäsivproteine mit spezifischen thrombozytären Membranproteinen auf der Plättchenoberfläche interagieren. Diese Rezeptoren gehören im Wesentlichen zur Familie der Integrine, einige stellen Nichtintegrine dar [16].

Der Adhäsions- und Aggregationsprozess lässt sich in mehrere Phasen unterteilen, in denen jeweils das Glykoprotein (GP) VI eine zentrale Rolle spielt.

Der initiale Kontakt („tethering“) zwischen den Blutplättchen und der Gefäßwand erfolgt unter arteriellen Strömungsbedingungen zum einen über den vWF, welcher an die freigelegten Kollagenfasern bindet. Dadurch bildet sich eine molekulare Brücke zwischen immobilisiertem vWF und einem spezifischen Rezeptorkomplex (GP Ib-V-IX) auf der Plättchenmembran [18]. Diese Interaktion ist charakterisiert durch eine sehr hohe Affinität, welche besonders in Gefäßbereichen mit hoher Scherkraft (arterielles System) die Adhäsion der Blutplättchen an die Gefäßwand ermöglicht [18, 19, 20].

Ebenfalls kennzeichnend für diese Bindung ist eine schnelle Reversibilität, so dass es zu einer Rollbewegung der Plättchen über die Oberfläche der Gefäßwand kommt [21, 22]. Diese Rollbewegung führt zu einem Kontakt zwischen Kollagenrezeptoren auf der Plättchenmembran mit Kollagenfibrillen der Gefäßwand.

Zum anderen wird der initiale Kontakt über GP VI hergestellt, welches direkt an Kollagen bindet. Diese Interaktion zwischen GP VI und den Kollagenfibrillen bewirkt eine Plättchenaktivierung mit nachfolgender Überführung des Integrins  $\alpha_2\beta_1$ , einem Rezeptor für Kollagen, von einem ruhenden in einen hochaffinen, aktivierten Funktionszustand. Dadurch ergibt sich die stabile Bindung des Integrins an das freigelegte Kollagen [20, 23].

Die Plättchenaktivierung führt außerdem zur Formveränderung („shape change“) der adhären Plättchen. Dabei bilden sich Pseudopodien aus, welche eine effektive Abdichtung der Endothelläsion begünstigen [18]. Weiterhin werden durch die Plättchenaktivierung Agonisten freigesetzt, zu denen v.a. Adenosindiphosphat (ADP) und Thromboxan  $A_2$  gehören [20].

Diese Agonisten verstärken einerseits den Aktivierungsvorgang, andererseits bewirken sie eine Rekrutierung ruhender Thrombozyten aus der Zirkulation und regen diese zur Aggregation mit schon adhären Thrombozyten an [18, 20]. Da der Plättchen-Plättchen-Kontakt reversibel ist, reißt er in vielen Fällen wieder ab, und es kommt entweder zur vollständigen Ablösung der Plättchen oder zu einer weiteren Rollbewegung auf den adhären Plättchen und nachfolgender erneuter interthrombozytärer Verbindung [24].

Die irreversible Aggregation ist abhängig von der Vernetzung aktivierter  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptoren auf der Oberfläche zirkulierender und adhären Blutplättchen mit vWF oder Fibrinogen im Plasma [24]. Auch hierbei erfolgt die Aktivierung der Rezeptoren unter anderem wieder über GP VI oder über Agonisten wie z.B. ADP und Thromboxan  $A_2$  [20].

Die verschiedenen Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche lassen sich untergliedern in leuzinreiche Glykoproteine (wie z.B. GP Ib-V-IX), Selektine, Immunglobulinfamilie, transmembrane Rezeptorfamilien und andere, wie z.B. GP IV oder GP VI, sowie in die Integrine (zu denen  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und  $\alpha_2\beta_1$  gehören) [16]. Diese Integrine werden nachfolgend näher erläutert.

### 1.2.2 Integrine

Integrine verbinden die Strukturen des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix und dienen als Adhäsionsrezeptoren. Sie finden sich auf nahezu allen Zellen. Integrine sind für mehrere Funktionen von Bedeutung (Gewebeentwicklung und -differenzierung, Tumorzellwachstum, Metastasierung, Zelladhäsion und -migration); insbesondere sind sie aber wichtig für die Thrombozytenadhäsion und -aggregation [25, 26].

Integrine sind aufgebaut als nichtkovalent verbundene Heterodimere, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Die  $\alpha$ -Untereinheit determiniert dabei die Spezifität. Die  $\beta$ -Untereinheit, die mit einer spezifischen  $\alpha$ -Untereinheit kombiniert ist, ermöglicht hingegen die Subklassifizierung der Integrine. Zusammen bilden die beiden Untereinheiten den funktionellen Rezeptor [25]. Die Aufrechterhaltung der heterodimeren Struktur wird u.a. durch Kalzium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) gewährleistet [27, 28].

Sowohl die  $\alpha$ -Untereinheit als auch die  $\beta$ -Untereinheit bestehen aus einer großen aminoterminalen extrazellulären Domäne, einem kleinen, die Zytoplasmamembran durchspannenden Teil und einem kurzen carboxyterminalen zytoplasmatischen Teil. Der zytoplasmatische Anteil verankert den Integrinrezeptor im Zytoskelett und reguliert die Rezeptorfunktion [25].

Integrine reagieren mit einer Vielzahl von Adhäsivproteinen (Fibrinogen, Kollagen, Fibronectin, Laminin, vWF, Vitronectin, Thrombospondin) [25, 29]. Diese sind Bestandteil der extrazellulären Matrix, kommen jedoch zum Teil auch in löslicher Form im Plasma vor [25].

Bisher wurden fünf verschiedene Integrine auf Thrombozyten beschrieben. Bei ihrer Subklassifizierung, die nach der  $\beta$ -Untereinheit erfolgt, werden hierbei die Integrine der  $\beta_1$ -Klasse und die Integrine der  $\beta_3$ -Klasse unterschieden.

Zu den Integrinen der  $\beta_1$ -Klasse gehören der Kollagenrezeptor  $\alpha_2\beta_1$ , der Fibronectinrezeptor  $\alpha_5\beta_1$  und der Lamininrezeptor  $\alpha_6\beta_1$ ; zu den Integrinen der  $\beta_3$ -Klasse gehören  $\alpha_{11b}\beta_3$  (ein Rezeptor für Fibrinogen, Fibronectin, Thrombospondin, Vitronectin und vWF) sowie  $\alpha_v\beta_3$  als Fibrinogen-, Fibronectin-, Vitronectin- und vWF-Rezeptor [16, 25].

In Tabelle 1 ist die unterschiedliche Klassifizierung und Nomenklatur der Integrine dargestellt.

<b>Integrin-Klassifizierung</b>	<b>Elektrophoretische Klassifizierung</b>	<b>CD-Nomenklatur</b>	<b>Rezeptor für</b>
$\alpha_2\beta_1$	GP Ia-IIa	CD49b	Kollagen
$\alpha_5\beta_1$	GP Ic-IIa	CD49c	Fibronektin
$\alpha_6\beta_1$	GP Ic'-IIa	CD49f	Laminin
$\alpha_{IIb}\beta_3$	GP IIb-IIIa	CD41-CD61	Fibrinogen Fibronektin Thrombospondin Vitronektin vWF
$\alpha_v\beta_3$	GP $\alpha_v$ -IIIa	CD51-CD61	Fibrinogen Fibronektin Vitronektin vWF

Tabelle 1: Klassifizierung und Nomenklatur der Integrine [16, 25, 30]

Als Adhäsionsrezeptoren sind Integrine in der Lage, mit reaktiven Oberflächen in Wechselwirkung zu treten und die Anlagerung von Plättchen an subendotheliale Strukturen zu vermitteln. Dazu ist eine schnelle Änderung des Funktionszustandes der Integrine nötig, die über die sogenannte Affinitätsmodulation ermöglicht wird.

Hierbei verändert der Rezeptor durch extrazelluläre Einflüsse seine Konformation und wird von einem niedrigaffinen (ruhenden) in einen hochaffinen (aktivierten) Funktionszustand überführt. Durch rezeptorvermittelte Zellaktivierung kommt es zu einer intrazellulären Signalübertragung, die zur Aktivierung des Integrins über zytoplasmatische Anteile des Rezeptors führt („inside out signaling“). Eine Bindung von Liganden oder von monoklonalen Antikörpern bewirkt ebenfalls eine Konformationsänderung des Integrins mit nachfolgender Aktivierung intrazellulärer Signalvorgänge („outside in signaling“) [25].

Auf das für diese Arbeit grundlegende Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  wird nachfolgend näher eingegangen.

### 1.2.3 Das Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$

In verschiedenen, größtenteils klinischen Studien [15, 17, 31, 32, 33] konnte bisher gezeigt werden, dass das Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  eine wichtige Rolle bei der Entstehung arterieller Thrombosen spielt. Dieser Rezeptor ist das am häufigsten vorkommende Membranglykoprotein der Blutplättchen (1-2 % des Gesamtproteingehaltes); jedes Plättchen hat eine durchschnittliche Oberflächenbesetzung von 60.000 - 100.000 Rezeptorkopien [25]. 70 % davon liegen konstitutiv auf der Oberfläche exprimiert vor, die restlichen 30 % werden erst nach Thrombozytenaktivierung aus den intrazellulären Speichern, also aus dem offenen kanalikulären System und den  $\alpha$ -Granula, an die Plättchenoberfläche transloziert [25, 34, 35].

Die  $\beta$ -Untereinheit des Integrins  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  besitzt ein Molekulargewicht von etwa 115 kDa (Kilodalton), die  $\alpha$ -Untereinheit ein Molekulargewicht von etwa 140 kDa [36]. Letztere besteht wie die meisten der  $\alpha$ -Untereinheiten aus einer niedermolekularen Kette („light chain“; 137 Aminosäuren) und einer höhermolekularen Kette („heavy chain“; 871 Aminosäuren) [37], welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind [25].

Zentrale Aufgabe des Integrins  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  ist die Bindung von löslichem Fibrinogen an die Thrombozytenoberfläche [25]. Dies ist erst nach einer Plättchenaktivierung und nachfolgender Konformationsänderung des Rezeptors von einem niedrigaffinen in einen (aktivierten) hochaffinen Funktionszustand möglich [25, 38].

Bei der Bindung von Fibrinogen erkennt das Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  spezifisch drei Peptidsequenzen:

1. Arginin-Glycin-Aspartat-Sequenz (RGD-Sequenz)

Die RGD-Sequenz ist Bestandteil der Liganden Fibrinogen, Kollagen, Fibronectin, Thrombospondin, vWF und Vitronectin [39]. RGD ist die zentrale Aminosäuresequenz, welche die Ligandenbindung an  $\beta_3$ -Integrine vermittelt [25].

2. Lysin-Glutamin-Alanin-Glycin-Aspartat-Valin-Sequenz (KQAGDV-Sequenz)

Diese Sequenz befindet sich am Carboxy-Terminus des Fibrinogenmoleküls und wird als die vorherrschende Bindungsstelle zwischen dem Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  und Fibrinogen bezeichnet. Im Gegensatz zur RGD-Sequenz existiert diese Aminosäurekette nur bei Fibrinogen, nicht aber bei den anderen Liganden [40, 41].

### 3. Lysin-Glycin-Aspartat-Sequenz (KGD-Sequenz)

Die KGD-Sequenz befindet sich im löslichen  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Liganden CD40L. Die Bindung dieser Sequenz an  $\alpha_{IIb}\beta_3$  induziert eine Plättchenstimulierung über „outside in signaling“. Durch die Rezeptoraktivierung ist das Integrin in der Lage, Fibrinogen zu binden [42].

#### 1.2.4 Der HPA-1-Polymorphismus

In der  $\beta_3$ -Untereinheit bzw. in dem  $\beta_3$ -Gen des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  liegt ein Polymorphismus vor, der als „human platelet antigen-1“ (HPA-1) bekannt ist. Hierbei lassen sich drei Genotypen unterscheiden, nämlich HPA-1a/1a, HPA-1a/1b und HPA-1b/1b. Mit etwa 73 % ist der (homozygote) Genotyp HPA-1a/1a in der europäischen Bevölkerung am häufigsten vertreten. Die Häufigkeit (heterozygoter) HPA-1a/1b-Träger liegt etwa bei 25 %, die der (homozygoten) HPA-1b/1b-Träger bei lediglich 2 % [43, 44].

Die Ursache für diesen Polymorphismus konnte bereits im Jahre 1989 identifiziert werden [45]. Der Polymorphismus beruht auf einem Basenaustausch, nämlich einer Substitution von Thymin durch Cytosin an der Position 1565 im Exon 2 des  $\beta_3$ -Gens. Dieser Austausch führt zum Ersatz von Leucin durch Prolin in Position 33 der Aminosäuren-Sequenz.

Ursprünglich entdeckt wurde der  $\beta_3$ -Polymorphismus als Ursache der neonatalen Alloimmunthrombozytopenie. Hierbei kommt es während der Schwangerschaft zu einer Immunisierung gegen das Alloantigen HPA-1a, wenn die fetalen Blutplättchen HPA-1a-positiv sind, während die mütterlichen Plättchen dieses Antigen nicht tragen [46].

In den letzten Jahren ist dieser Polymorphismus, insbesondere im Zusammenhang mit einer erhöhten Inzidenz arterieller Thrombosen, verstärkt in den Mittelpunkt des Interesses gerückt.

### 1.3 Bisherige Studien

1996 wurde erstmals über eine signifikante Assoziation zwischen bestimmten Varianten des Integrins  $\alpha_{11b}\beta_3$  und einer erhöhten Inzidenz der koronaren Herzkrankheit berichtet [15]. Seitdem ist der HPA-1-Polymorphismus Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.

Allerdings haben diese Studien zu unterschiedlichen, z.T. widersprüchlichen Ergebnissen geführt. So wird in mehreren, zumeist Fall-Kontroll-Studien ein Zusammenhang zwischen dem Rezeptorpolymorphismus und dem Auftreten arterieller Thrombosen aufgezeigt [17, 31, 32, 47, 48, 49], in einer Reihe anderer Veröffentlichungen findet sich im Gegensatz dazu kein Zusammenhang [50, 51, 52, 53, 54, 55].

Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz besteht darin, dass der Rezeptorpolymorphismus nicht als eigener (ursächlicher) Risikofaktor, sondern als (zusätzliche) Risikodeterminante für eine gesteigerte Plättchenthrombogenität einzustufen ist, welche dann bei bereits bestehender koronarer Herzkrankheit zur vorzeitigen Manifestation eines Myokardinfarktes beiträgt [17, 31, 56].

Unterstützt wird diese Aussage durch die Ergebnisse einer anderen Studie, die darstellen konnte, dass der HPA-1-Polymorphismus das Migrationsverhalten von Zellen beeinflusst, und zwar in Form einer erhöhten Migration HPA-1b-positiver Zellen auf Fibrinogen und vWF [57]. Interessanterweise hatte sich zudem in einer weiteren Studie gezeigt, dass der HPA-1-Polymorphismus einen bedeutenden Einfluss auf das Thrombuswachstum hat. So zeigte sich nämlich bei HPA-1b-positiven Plättchen sowohl eine deutlich schnellere Thrombusbildung als auch ein schnelleres Thrombuswachstum als bei HPA-1b-negativen Plättchen. Dies ist somit ebenfalls ein Hinweis für eine gesteigerte Thrombogenität HPA-1b-positiver Plättchen [58].

Eine zusätzliche Bestätigung wird darin gesehen, dass das Risiko für akute Koronarereignisse, wie die instabile Angina pectoris oder der Myokardinfarkt, auch bei heterozygoten HPA-1b-Trägern schon in einem jüngeren Lebensalter (unter 60 Jahre) signifikant erhöht ist [15, 59].

Um die Hypothese der gesteigerten Plättchenthrombogenität und die klinischen Ergebnisse zu prüfen, wurden in der Vergangenheit weitere experimentelle Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurde (hauptsächlich unter statischen Bedingungen) geprüft, ob Blutplättchen mit der HPA-1b-Variante des Integrins  $\alpha_{11b}\beta_3$  eine signifikant erhöhte Bindung an Fibrinogen zeigen.

Hierbei ergaben sich ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse. In einem Teil der Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen dem HPA-1-Polymorphismus und der Bindung an Fibrinogen gezeigt werden [33, 60], in einem anderen Teil konnte dagegen keine veränderte (erhöhte) Plättchenthrombogenität festgestellt werden [61, 62].

#### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, auf der Basis bisheriger Studien die Hypothese einer erhöhten Thrombogenität HPA-1b-positiver Plättchen im Vergleich zu HPA-1b-negativen Plättchen zu überprüfen. Dabei soll die bisherige Vorgehensweise, bei welcher die  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -vermittelte Thrombozytenadhäsion an bestimmte thrombogene Oberflächen vorwiegend unter statischen Bedingungen untersucht wurde [33, 60, 61, 62], nicht weiter verfolgt werden. Vielmehr sollen hier flussdynamische Bedingungen im Vordergrund stehen.

In dieser Arbeit wird speziell der Einfluss des HPA-1-Polymorphismus genauer überprüft, unter der Hypothese, dass thrombozytäre Rezeptorpolymorphismen das Funktionsverhalten zirkulierender Blutplättchen in einer Weise modulieren können, dass eine gesteigerte Reagibilität und Thrombogenität entsteht [63, 64].

Hierzu werden flussdynamische Experimente in einem In-vitro-Modellsystem durchgeführt, welches physiologische und pathologische Strömungsverhältnisse simuliert und Untersuchungen zur scherkraftabhängigen Plättchenadhäsion an thrombogene Oberflächen erlaubt. Diese Plättchenadhäsion wird visualisiert und quantifiziert.

Durch eine solche Vorgehensweise sollen die bisherigen Ergebnisse der klinischen und experimentellen Studien überprüft und gegebenenfalls bestätigt oder widerlegt werden.

## 2. Material und Methodik

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Materialien und Geräte

Die folgenden Materialien und Geräte wurden für die Studie eingesetzt:

- Deckgläser für Mikroskopie (24x50 mm; Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde)
- Kolbenhub-Pipette (Eppendorf reference 10-100 µl; Eppendorf AG, Hamburg)
- Pipettenspitzen (100 µl; Eppendorf AG, Hamburg)
- Zellschaber mit weicher Lippe (Disposable Cell Scraper; Sarstedt Inc., Newton, N.C. / USA)
- Petrischalen (No. 639102, 145/20 mm; Greiner-Bio One GmbH, Frickenhausen)
- Inkubator (CO<sub>2</sub>-AUTO-ZERO, Heraeus, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>)
- Wasserfester schwarzer Stift (edding 3000, permanent marker)
- Perfusor (PERFUSOR segura; B. BRAUN Melsungen AG, Melsungen)
- 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)
- Taumelschüttler (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
- Combi Stopper (B. BRAUN Melsungen AG, Melsungen)
- Rechteckige Strömungskammer mit Dichtung (50 µm) sowie zu- und abführende Schläuche mit Luer Drei-Wege-Hahn
- Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Carl Zeiss Axiovert 100 M mit zugehöriger Software; Carl Zeiss AG, Oberkochen)
- Computer (Scenic Pro M7, Siemens AG)
- Bildverarbeitungsprogramm „Image J“ (Version 1.26t, Wayne Rasband; National Institutes of Health, USA)
- Statistikprogramm „Sigma Plot“ (Version 1.02, Jandel Corporation)
- Edisonite Schnellreiniger (Art.-Nr. 60129, UBA-Nr. 05860001; Merz Pharma GmbH & Co. KGaA, Frankfurt/Main)

Nachfolgend werden einzelne verwendete Materialien und Geräte näher erläutert:

### Rechteckige Strömungskammer

Die Abbildungen 1, 2a und 2b zeigen den Aufbau der rechteckigen Strömungskammer. Diese besteht aus einem Metallrahmen, in den ein beschichtetes Deckgläschen eingefügt wird, einer Dichtung und einem Acrylblock – mit zugehörigen Schläuchen und Luer Drei-Wege-Hahn – sowie 6 Schrauben, die zum Zusammenbau der Kammer notwendig sind.

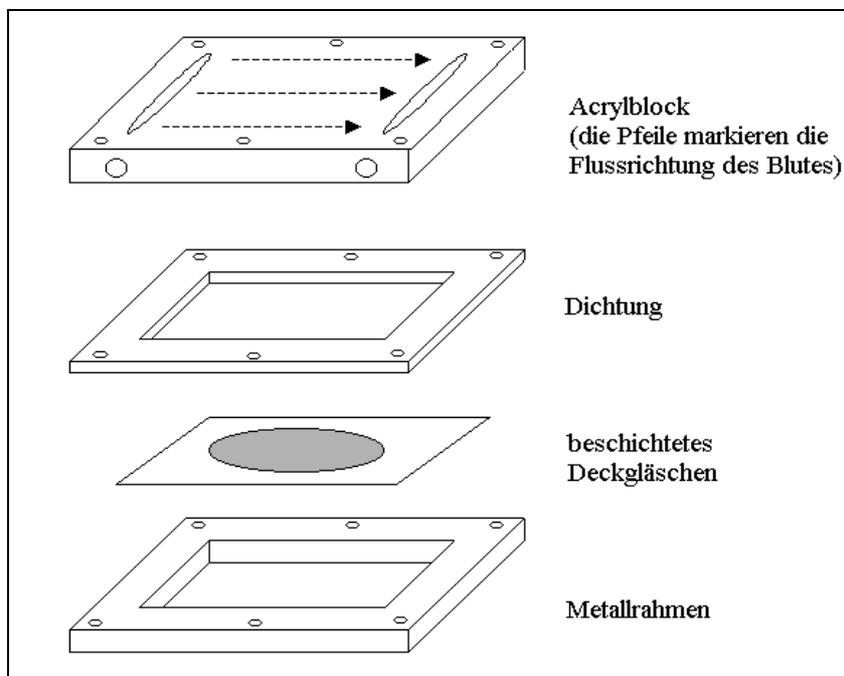


Abb. 1: Schematischer Aufbau der rechteckigen Strömungskammer

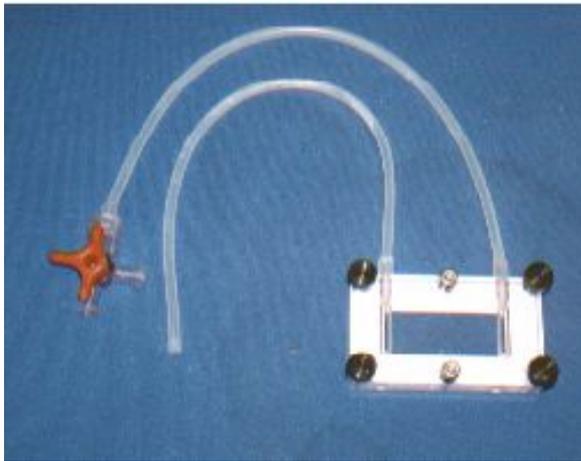


Abb. 2a: Rechteckige Strömungskammer  
(zusammengesetzt)

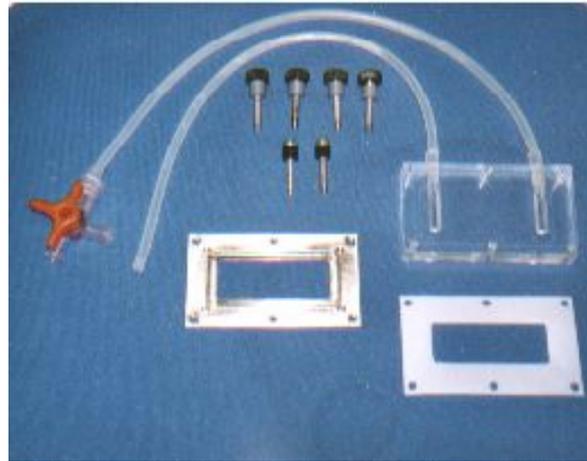


Abb. 2b: Rechteckige Strömungskammer  
(Einzelteile)

Zur Berechnung der Scherrate  $\gamma$  [ $\text{s}^{-1}$ ] in der rechteckigen Strömungskammer wird folgende Formel verwendet:

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

wobei  $\dot{Q}$  = Strömungsrate in ml/s

$w$  = Länge des Feldes der Strömungskammer (15 mm)

$h$  = Höhe des Feldes der Strömungskammer (entspricht der Dicke der Dichtung, 50  $\mu\text{m}$ )

Durch Umformung lässt sich aus der Scherrate die Formel für die zu wählende Strömungsrate bestimmen:

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

Die in dieser Studie gewählten Scherraten  $50 \text{ s}^{-1}$ ,  $500 \text{ s}^{-1}$  und  $1.500 \text{ s}^{-1}$  entsprechen somit etwa den Strömungsraten 1,2 ml/h, 11,5 ml/h und 34 ml/h. Die Strömungsrate ist der Strömungsgeschwindigkeit proportional.

### Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop

Das verwendete konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) ist ein inverses Lichtmikroskop, an das eine LSM-Einheit (bestehend aus einem Laser- und einem Scanning-Modul) gekoppelt ist. Bei biologischen Objekten ermöglicht das konfokale LSM in erster Linie die dreidimensionale Untersuchung von anatomischen bzw. physiologischen Fragestellungen auf subzellulärer, zellulärer und histologischer Ebene unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen.

Im Gegensatz zu einem herkömmlichen Mikroskop, das stets auch störendes Licht von Bereichen außerhalb der Fokusebene aufnimmt, werden bei einem konfokalen Mikroskop dagegen nur Licht bzw. Fluoreszenzen aus genau der Fokusebene detektiert, auf welche auch das Anregungslicht fokussiert ist. Es ist somit möglich, eine definierte Schicht einer Zelle zu betrachten. Aufgrund der spezifischen optischen Konfiguration können zusätzlich mehrere dünne optische Schnitte durch ein biologisches Objekt gelegt und anhand digitaler Aufbereitung zu einer dreidimensionalen Struktur rekonstruiert werden.

Abbildung 3 zeigt schematisch den Strahlengang im LSM, wobei das einfallende Licht (Laser), das auf die Strömungskammer trifft, mit blauen Pfeilen dargestellt ist. Die daraus entstehende Fluoreszenz ist mit einem grünen Pfeil dargestellt. Die roten Pfeile markieren die Flussrichtung des Blutes durch die Strömungskammer.

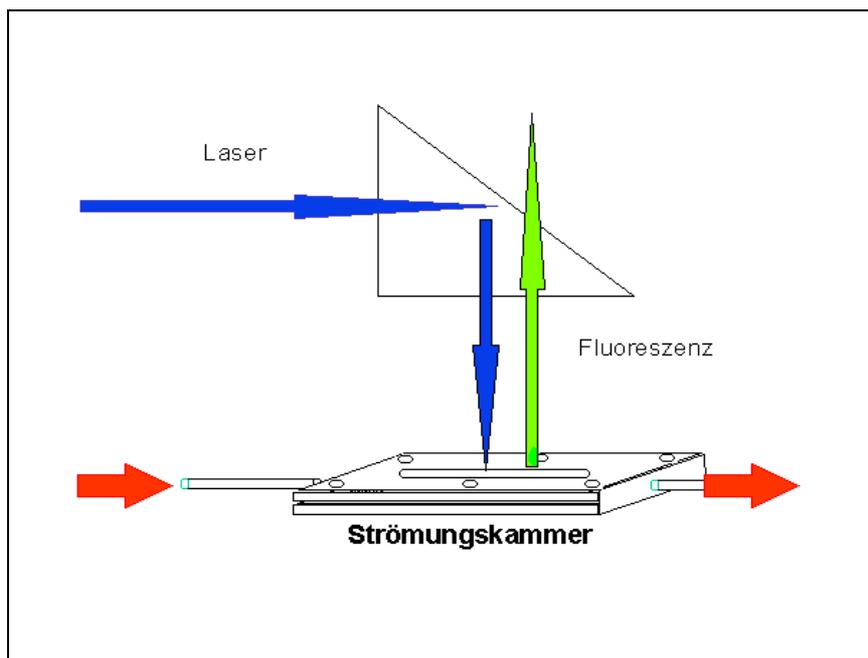


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung des Strahlengangs im Laser-Scanning-Mikroskop

Abbildungen 4 und 5 zeigen den Versuchsaufbau. Dazu ist in Abbildung 4 der Aufbau des LSM dargestellt. Abbildung 5 zeigt die in das Mikroskop eingebrachte Strömungskammer während des Versuchs.



Abb. 4: Versuchsaufbau, Aufbau des Laser-Scanning-Mikroskops

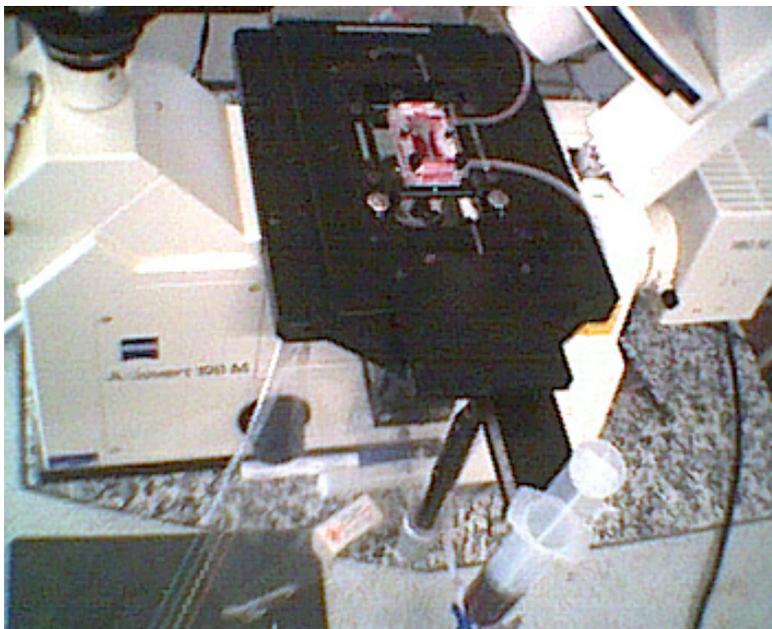


Abb. 5: Versuchsaufbau, Strömungskammer im Laser-Scanning-Mikroskop

### 2.1.2 Reagenzien

Die folgenden Reagenzien wurden für die Versuche eingesetzt:

- PBS (Phosphate Buffer Solution)-Puffer (pH 7,3; Serag-Wiessner GmbH & Co. KG, Naila)
- Mepacrin (gelöst in PBS-Puffer, Stocklösung 10 mM (Millimol), Endkonzentration 10  $\mu$ M; Sigma GmbH, Taufkirchen)
- HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonicacid], pH 7,3; Sigma GmbH, Taufkirchen)
- PPACK (H-D-Phenylalanin-Prolin-Arginin-Chloromethylketone, Trifluoroacetate salt (LOT 0542723), gelöst in HEPES (20 mM), Konzentration 1 mM; Bachem Distribution Services GmbH, Weil am Rhein)
- Fibrinogen (Human Plasma, Plasminogen-Depletet (LOT B23486), Konzentration 2,5 mg/ml, gelöst in PBS-Puffer; Merck KGaA, Darmstadt)

Im Folgenden werden einzelne verwendete Reagenzien näher erläutert:

#### Mepacrin

Mepacrin oder auch Quinacrin (6-Chloro-9-[(4-diethylamino)-1-methyl-butyl]amino-2-methoxyacridine) [65] ist ein trizyklisches und basisches Amin [66]. Es besitzt eine intrinsische, gelb-grüne Fluoreszenz [67, 68] bei Anregung durch einfallendes Licht der Wellenlänge 440 nm. Die Emissionswellenlänge beträgt 505 nm [67].

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Inkubation von Vollblut mit Mepacrin ergibt sich aufgrund seiner hohen Affinität zu dem in den dichten Granula der Plättchen gespeicherten Adenosintriphosphat (ATP) eine schnelle und selektive Akkumulation von Mepacrin in diesen Organellen [66, 69, 70, 71, 72], außerdem auch in den Granula von Leukozyten [73].

In der hier verwendeten Endkonzentration von 10  $\mu$ M hat Mepacrin keinen Einfluss auf die normale Plättchenfunktion [74].

## PPACK

PPACK (H-D-Phenylalanin-Prolin-Arginin-Chloromethylketon) [75, 76] ist ein Tripeptid, das in vitro innerhalb weniger Minuten irreversibel und spezifisch die enzymatische Aktivität von Thrombin hemmt. Somit wird der letzte Schritt der plasmatischen Hämostase, die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin, verhindert [76].

Bei Antikoagulation mit PPACK finden sich außerdem unveränderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im Blut (im Gegensatz zur Antikoagulation mit Natrium-Citrat oder Ethylendiamintetraacetat (EDTA)) [77, 78]. Dies führt zu einer unbeeinflussten Thrombozytenfunktion.

## Fibrinogen

Das Fibrinogenmolekül besteht aus drei unterschiedlichen Polypeptidketten. Diese Ketten, die jeweils zweifach angelegt sind, haben innerhalb des Moleküls eine antiparallele Anordnung und sind durch Disulfidbrücken in der Weise miteinander verknüpft, dass eine spiralförmige räumliche Struktur erreicht wird. Plasmafibrinogen wird durch Thrombin in Fibrinmonomere gespalten, die zunächst durch Polymerisation unlöslich und anschließend durch Faktor XIII vernetzt werden [79].

### **2.1.3 Probanden**

In der Zeit von Mai 2002 bis Dezember 2002 wurden von insgesamt 45 gesunden männlichen und weiblichen Blutspendern, die in den vorangegangenen zwei Wochen keine Medikamente eingenommen hatten, Daten für diese Studie gewonnen. Alle Probanden waren regelmäßige Blutspender der Blutspendenzentrale der Universität Düsseldorf. Sie hatten nach ausführlicher Aufklärung gemäß den Empfehlungen der Helsinki-Erklärung und durch Unterschrift ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie erklärt (Abbildung 6).



**Heinrich Heine  
UNIVERSITÄT  
DÜSSELDORF**

Universitätsklinikum Düsseldorf  
Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. R. E. Scharf

□ Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin Postfach 10 10 07, D-40225 Düsseldorf

Hausanschrift:  
Moorenstraße 5, D-40225 Düsseldorf

Hämatologische und Immunologische Ambulanz	Mo - Fr 8:00 - 11:00
Hämostaseologische Ambulanz	Mo - Fr 8:00 - 11:00
Gefäß- und Thrombose-Ambulanz	Di - Do 8:00 - 10:00
Hämophilie-Ambulanz	Mo - Fr 14:00 - 16:00

Telefon: (02 11) 81 - 00  
Durchwahl: (02 11) 81 - 1 73 44 / 1 73 45  
Ambulanz: (02 11) 81 - 1 71 05  
Telefax: (02 11) 81 - 1 62 21  
e-mail: Sekretariat-IHTM@med.uni-duesseldorf.de

### EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis zur Teilnahme an dem Forschungsvorhaben „Plättchenadhäsion und Thrombusbildung“ (Projektleiter: Prof. Dr. Scharf, Dr. Stoldt, Dr. Zotz). Ziel des Forschungsvorhabens ist, Vorgänge zu charakterisieren, die in unserem arteriellen Gefäßsystem zur Thromboseentstehung beitragen. Hierzu wird das Ihnen entnommene Blut in einem Modellsystem getestet, das die Strömungsverhältnisse im Kreislauf nachahmt. Speziell wird in diesem System geprüft, wie sich die Blutplättchen gegenüber reaktiven, thrombosefördernden Oberflächen verhalten. Diese Untersuchungen sind grundlagenwissenschaftlicher Art und haben keine Konsequenzen für Sie als Blutspender.

Ich bin damit einverstanden, dass mir zusätzlich zu meiner heutigen Blutspende cc 50 ml Blut für Forschungszwecke entnommen werden. Ich bin außerdem damit einverstanden, dass meine in Rahmen dieser experimentellen Untersuchungen erhobenen Daten aufgezeichnet und durch die Leiter dieses Forschungsvorhabens ausgewertet werden. Die Aufzeichnung Ihrer Daten erfolgt unter Beachtung der Vorschriften, wie sie sich aus dem Datenschutz ergeben. Ihre Einwilligung zur Aufzeichnung Ihrer Daten kann von Ihnen jederzeit widerrufen werden.

Düsseldorf, den ..

Name u. Geb. Datum d. Spender/in

Unterschrift Spender/in

Blutproben ( 50 ml ) wurden für das o.g. Forschungsvorhaben im Rahmen der heutigen Blutspende zusätzlich entnommen.

.....  
Unterschrift Spendearzt/ärztin

.....  
Spende-Nr. und Namenskürzel

Österreichische Verkehrsminister: Standardtelefonnummern 701, 706, 707, 711, 712; Bushörner 723, 726, 780, 782, 785, 809, 827, 835 und 836

Abb. 6: Einverständniserklärung

Den Probanden wurde im Anschluss an eine reguläre Blutspende Blut abgenommen. Das Blut wurde mittels allelspezifischer Restriktionsenzymanalyse auf relevante Polymorphismen des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  genotypisiert.

Die Aufteilung des Probandenkollektivs ist in Tabelle 2 dargestellt.

		Genotyp			
		HPA-1a/1a	HPA-1a/1b	HPA-1b/1b	Gesamt
Geschlecht	Männlich	22	7	7	36
	Weiblich	4	2	3	9
	Gesamt	26	9	10	45

Tabelle 2: Aufteilung des Probandenkollektivs

Neben der Genotypisierung wurden die Probanden zudem ausführlichen Blutuntersuchungen unterzogen; hierbei bestätigte sich, dass sie hinsichtlich der klinisch-chemischen und hämatologischen Parameter bis auf wenige Abweichungen Normalwerte aufwiesen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im Folgenden (Tabelle 3) aufgelistet. Hier sind sowohl die Mittelwerte und die Standardabweichungen der untersuchten Parameter sämtlicher Probanden ( $n = 45$ ) als auch die Aufteilung in die drei Genotypen dargestellt.

<b>Parameter</b>	<b>Gesamt- population n = 45</b>	<b>HPA-1a/1a n = 26</b>	<b>HPA-1a/1b n = 9</b>	<b>HPA-1b/1b n = 10</b>
Alter [Jahre]	42,7 ± 12,5	41,0 ± 12,8	40,2 ± 9,4	47,0 ± 15,1
Hämatokrit [%]	40,2 ± 3,7	40,3 ± 3,9	38,9 ± 4,2	41,4 ± 2,7
Thrombozytenzahl [nl <sup>-1</sup> ]	265,9 ± 52,6	267,7 ± 41,9	259,0 ± 81,7	266,9 ± 57,1
Fibrinogen [mg/dl]	254,0 ± 60,3	255,5 ± 67,4	241,6 ± 38,0	264,9 ± 59,8
Plasminogen [%]	109,8 ± 13,5	108,0 ± 14,6	116,3 ± 11,0	106,8 ± 7,6
Faktor II [%]	129,5 ± 27,8	126,0 ± 27,9	133,3 ± 31,3	137,1 ± 24,2
Faktor V [%]	129,2 ± 25,6	128,5 ± 25,7	126,2 ± 28,4	135,3 ± 24,4
Faktor VII [%]	122,7 ± 37,6	119,8 ± 36,0	123,7 ± 39,1	132,0 ± 45,6
Faktor VIII [%]	135,3 ± 62,2	132,1 ± 30,9	122,9 ± 39,2	163,0 ± 138,9
Faktor IX [%]	116,7 ± 22,3	117,6 ± 21,0	114,8 ± 26,5	115,7 ± 24,6
Faktor X [%]	124,5 ± 28,3	117,9 ± 24,3	139,7 ± 33,8	129,6 ± 30,2
Faktor XI [%]	101,7 ± 23,7	101,3 ± 22,1	107,9 ± 28,4	95,1 ± 25,2
Faktor XII [%]	101,8 ± 16,0	100,2 ± 15,1	104,6 ± 18,4	104,1 ± 18,0
Faktor XIII [%]	119,3 ± 20,0	116,0 ± 19,0	128,1 ± 19,6	120,4 ± 23,6
Protein C [%]	112,1 ± 22,2	109,9 ± 20,8	105,9 ± 21,5	127,3 ± 24,3
Protein S [%]	101,7 ± 19,2	98,3 ± 14,8	112,2 ± 28,3	99,6 ± 16,4
vWF-Aktivität [%]	151,8 ± 81,5	153,8 ± 90,8	126,4 ± 47,2	177,1 ± 79,4
vWF-Antigen [%]	143,7 ± 68,3	149,1 ± 73,4	120,4 ± 47,4	153,9 ± 73,3
Antithrombin III [%]	99,2 ± 9,4	97,9 ± 9,7	101,6 ± 11,1	101,0 ± 5,3
C-reaktives Protein [mg/dl]	0,5 ± 0,5	0,5 ± 0,6	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1

Tabelle 3: Alter und Laborprofil der Studienprobanden (angegeben sind Mittelwerte und einfache Standardabweichung)

## **2.2 Methodik**

### **2.2.1 Versuchsvorbereitung**

#### **2.2.1.1 Vorbereitung und Beschichtung der Deckgläschen**

Pro Versuch wurden jeweils drei Deckgläschen mit den Abmessungen 24x50 mm benötigt. Zunächst wurden die Deckgläschen markiert, um die spätere Fokusfindung am Mikroskop zu erleichtern. Dazu wurde ein etwa 2 cm langer Strich mit einem wasserfesten schwarzen Stift an einer Seite des Deckgläschens ca. 5 mm vom Rand entfernt aufgebracht. Dieser Strich befand sich damit an einer Stelle, die während des Versuchs nicht relevant war und somit die weitere Auswertung nicht beeinträchtigte.

Die Deckgläschen wurden mit Fibrinogen (Human Plasma, Plasminogen-Depletet) beschichtet, um eine thrombogene Oberfläche zu schaffen. Dafür wurde bei einer Temperatur von  $-20\text{ °C}$  aufbewahrtes humanes Fibrinogen in einer Konzentration von 2,5 mg/ml langsam unter Schütteln auf Zimmertemperatur gebracht und gut durchmischt. Anschließend wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  Fibrinogen mit einer Kolbenhub-Pipette auf die Deckgläschen aufgebracht und mit einem Zellschaber mit weicher Lippe durch Bewegungen in Längsrichtung, also der späteren Strömungsrichtung, verteilt. Dabei wurde zur besseren Handhabung die Region um den Markierungsstrich und der Rand ausgespart. Auf eine zusätzliche Blockierung mit BSA (Bovine Serum Albumin) wurde in dieser Versuchsanordnung verzichtet, in späteren Versuchen wurde dies allerdings durchgeführt.

Die so beschichteten Deckgläschen wurden dann in eine Petrischale verbracht und unverzüglich im Inkubator ( $37\text{ °C}$ , 5 % wassergesättigte  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre) für 60 Minuten inkubiert.

### **2.2.1.2 Entnahme und Vorbehandlung des Blutes**

Den Probanden wurde 30 ml venöses Blut einer Kubitalvene mit Hilfe einer Perfusorspritze und einem Venenpunktionsbesteck (W.I.N. 21G, Innendurchmesser 0,6 mm) entnommen.

In der Spritze waren zuvor 30 µl PPACK (1 µl pro ml Blut) vorgelegt; dadurch sollte eine Blutgerinnung vor Versuchsbeginn verhindert werden. Anschließend wurde das antikoagulierte Vollblut mit Mepacrin (Stocklösung 10 mM, Endkonzentration 10 µM) für 60 Minuten inkubiert.

Dazu wurde die Spritze mit einem Combi Stopper verschlossen und für 60 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.

### **2.2.1.3 Reinigung und Vorbereitung der Strömungskammer**

Die Strömungskammer und die zugehörigen Komponenten (zuführender Schlauch mit Drei-Wege-Hahn und abführender Schlauch) wurden durch Reinigung über Nacht in einer Reinigungslösung (Edisonite Schnellreiniger) von jeglichen Rückständen befreit. Alle Komponenten wurden anschließend mit Hilfe einer Perfusorspritze mit Leitungswasser von Reinigungsmittelresten befreit und zum Trocknen auf Zellstoff ausgelegt.

Ein mit Fibrinogen beschichtetes Deckgläschen wurde vorsichtig mit der beschichteten Seite nach oben in den Metallrahmen der Strömungskammer eingelegt, die Dichtung (50 µm) und der trockene Acrylglasblock aufgelegt. Anschließend wurden die 6 Schrauben fest über Kreuz eingeschraubt. Nachdem der zuführende und der abführende Schlauch an der Kammer befestigt waren, wurde diese blasenfrei mit PBS-Puffer gefüllt.

Die Kammer wurde dann in die Haltevorrichtung des Mikroskops eingebracht und über den zuführenden Schlauch mit der blutgefüllten Perfusorspritze verbunden. Anschließend wurde die Perfusorspritze in den Perfusor eingespannt. Das Ende des abführenden Schlauches wurde, um die während des Versuchs herauslaufende Flüssigkeit aufzufangen, in einen Glasbehälter eingebracht.

### 2.2.1.4 Einstellungen des Laser-Scanning-Mikroskops

Das Laser-Scanning-Mikroskop wurde wie folgt eingestellt:

- Argonlaser: 50 % Leistung, Wellenlängen 458, 488, 514 nm, maximale Kraft 25,0 mW
- Vergrößerung: 100fach (Carl Zeiss Plan-Neofluar 10x / 0,3 Objektiv, digital ohne Zoom)
- 2 Kanäle: Durchlicht (zum Fokussieren) und Fluoreszenz (Pinhole ganz offen, Detector Gain 1000, Ampl. Offset-1.995, 100 % Excitation bei 458 nm)
- Filter für CH2: BP 505-550
- Scan-Geschwindigkeit pro Pixel (Bildpunkt): 0,88  $\mu$ s
- Scan-Geschwindigkeit pro Bild: 786,4 ms
- Stapelscan: 5 Bilder (512 x 512 Pixel, 8 Bit Farbtiefe), Abstand 100 nm, Linienscan
- Datentiefe: 8 Bit
- Stack-Size: 921,3 x 921,3 x 0,4  $\mu$ m
- Scaling: 1,8 x 1,8 x 0,1  $\mu$ m

### 2.2.1.5 Fokussierung

Die Fokussierung wurde in zwei Schritten durchgeführt. Um zunächst die gewünschte Ebene orientierend einzustellen, wurde der Markierungsstrich, der sich am rechten Rand des Deckgläschens befand, fokussiert. Zur Feineinstellung wurde anschließend auf der Mitte des Deckgläschens eine von Falschfluoreszenzen möglichst freie Stelle aufgesucht, und es wurden die kleinsten sichtbaren Partikel auf dem Deckgläschen scharf eingestellt. Nun lag der Fokus unmittelbar über der Beschichtung und war damit optimal ausgerichtet.

### 2.2.2 Versuchsablauf

Jeder Versuch wurde in drei Versuchsabschnitte unterteilt. Bei den jeweiligen Versuchsabschnitten wurden bestimmte Strömungsverhältnisse vorgegeben. Dadurch sollten physiologische und pathologische Strömungsverhältnisse unter In-vitro-Bedingungen simuliert werden. Im ersten Versuchsabschnitt wurde der Perfusor auf eine Strömungsrate von 1,2 ml/h eingestellt, im zweiten auf 11,5 ml/h und im dritten Abschnitt auf 34 ml/h.

Jeder Versuchsabschnitt bestand aus drei Messungen, die zu definierten Zeitpunkten durchgeführt wurden, damit die Veränderungen der Plättchenadhäsion im Zeitverlauf festgehalten werden konnten. Die erste Messung erfolgte unmittelbar nach Beginn des jeweiligen Versuchsabschnitts (in der sogenannten „Minute 0“, d.h. nach etwa 15 Sekunden, so dass eine gleichmäßige Blutströmung angenommen werden konnte). Die zweite Messung wurde nach einer Minute und die dritte nach fünf Minuten vorgenommen. Damit ergaben sich pro Versuch insgesamt neun einzelne Messungen.

Jede Messung umfasste wiederum eine Bildserie von fünf Einzelbildern, welche im Abstand von 0,7 Sekunden gescannt (eingelesen) wurden.

### **2.2.3 Messungsablauf**

Für den ersten Versuchsabschnitt wurde der Perfusor auf eine Strömungsrate von 1,2 ml/h eingestellt. Nachdem der Drei-Wege-Hahn auf Durchlass gestellt worden war, wurde das Blut durch langsames Drehen an der Stellschraube des Perfusors in die Kammer geleitet. Sobald das Deckgläschen mit Blut bedeckt war, wurde die vorhergegangene Fokussierung kurz überprüft und bei Bedarf noch leicht verbessert. Unmittelbar nachdem der Perfusor das Signal für eine gleichmäßige Strömung gab, wurde durch Drücken der Stop- und der Scan-Taste mit dem 0-Minuten-Scan begonnen. Nach 1 Minute und nach 5 Minuten wurden weitere Scans durchgeführt. Nach dem letzten Scan wurde der Perfusor ausgeschaltet und die Kammer aus dem Mikroskop entnommen.

Anschließend wurde die Strömungskammer auseinandergelöst und unter fließendem Wasser mit Hilfe einer sauberen, mit Leitungswasser gefüllten Perfusorspritze gründlich gereinigt. Dadurch wurde eine Beeinträchtigung der nächsten Messung durch eventuelle Blutrückstände verhindert. Der Acrylblock wurde abgetrocknet, die restlichen Teile tropften ab.

Für den zweiten Versuchsabschnitt wurde die Strömungskammer wie beschrieben (Kap. 2.2.1.3) vorbereitet. Danach wurde die Strömungsrate des Perfusors auf 11,5 ml/h eingestellt, und es erfolgten die drei Messungen des zweiten Versuchsabschnitts.

Schließlich wurde nach dem gleichen Prinzip der dritte Versuchsabschnitt durchgeführt, diesmal mit einer Strömungsrate von 34 ml/h.

### 2.2.4 Auswertung der Messungen

Zur Auswertung wurden zunächst die entstandenen Bildserien als einzelne TIFF (Tagged Image File Format)-Dateien (512 x 512 Pixel, 8 Bit Farbtiefe) exportiert. Diese Daten wurden dann mit Hilfe des Programms Image J (Version 1.26t) weiter verarbeitet.

Für diese weitere Verarbeitung wurden jeweils nur die ersten zwei Einzelbilder einer Bildserie verwendet. Diese wurden mit der Funktion „Image Calculator“ und dem Befehl „AND“ verrechnet. Der Befehl kombiniert die Grafikinformationen aus zwei Bildern und gibt als Resultat ein (einziges) Bild wieder, welches nur diejenigen Bestandteile enthält, die in den beiden Quellbildern identisch sind. So konnten die statischen Teilchen identifiziert werden, welche den auf dem Deckgläschen adhärenen Thrombozyten entsprachen, während die bewegten Teilchen eliminiert wurden.

Das resultierende Bild mit den statischen Teilchen wurde mit der „Threshold“-Funktion „grauwertreduziert“, um Fluoreszenzstärke-Unterschiede und geringe Fokusunterschiede auszugleichen. Durch Setzen der oberen und unteren Grenze auf die Werte 0 bzw. 1 mit Hilfe des „SET“-Befehls konnte das Bild dann völlig von Grauwerten befreit werden, und es entstand ein reines Schwarz-Weiß-Bild.

Dieses Bild wurde zur weiteren Analyse noch invertiert, so dass sich ein Negativbild ergab. In dem so veränderten Bild konnten nun die Teilchen mit der „Analyze Particles“-Funktion in Anzahl und Größe gemessen werden. Diese Funktion wertete das Bild Zeile für Zeile aus. Dadurch konnte jedes Mal, wenn ein schwarzer Pixel getroffen wurde, dieser in kompletter Ausdehnung ausgewählt werden und je nach Größe als sogenannter „Bin“, also als Teilchen gezählt werden.

Die Anzahl der „Bins“, die frei gewählt werden konnte, wurde zunächst zweckmäßigerweise genau eine Zahl kleiner als das größte gezählte Teilchen gesetzt. Dabei resultierte eine Übereinstimmung der Ordnungszahl der „Bins“ mit der Anzahl der Pixel in einem Bild.

Daher wurde bei jedem Bild zweimal diese Funktion benutzt. Beim ersten Mal zur Bestimmung der Größe des größten Teilchens im Bild und beim zweiten Mal zur tatsächlichen Zählung und korrekten Einordnung der Teilchengröße in die „Bins“.

Die so erhaltenen Daten wurden in eine Microsoft Excel-Tabelle und schließlich in das Statistikprogramm „Sigma Plot“ übernommen. Hier wurden sie statistisch und graphisch ausgewertet.

### 2.2.5 Statistische Methoden

Die Messungen, die für drei Genotypen und drei Scherraten gemacht wurden, führten insgesamt zu neun Stichproben. In den jeweiligen Stichproben wurde die Plättchenadhäsion gemessen, daraus wurde insbesondere der betreffende Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler berechnet.

Jede Stichprobe, die einer bestimmten Scherrate und einem bestimmten Genotyp entsprach, wurde einerseits mit den beiden anderen Scherraten und andererseits mit den beiden anderen Genotypen verglichen; dabei wurde die Übereinstimmung zwischen den Mittelwerten geprüft. Bei diesen Gegenüberstellungen wurde jeweils der Mittelwertdifferenzentest verwendet, und zwar wegen des geringen Stichprobenumfangs ( $n < 30$ ) anhand des Student t-Tests.

Die Testgröße t lautet jeweils:

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

Bei der Anwendung des Mittelwertdifferenzentests musste unterschieden werden:

Beim Vergleich zwischen den unterschiedlichen Scherraten (bei gleichem Genotyp) war zu berücksichtigen, dass die Stichprobenelemente „gepaarten“ Charakter hatten. Demzufolge wurde der sogenannte Mittelwertdifferenzentest für verbundene Stichproben angewendet.

Die Formel<sup>\*1</sup> lautet:

$$t = \frac{\bar{D}}{S_{\bar{D}}}$$

wobei  $\bar{D} = \bar{x} - \bar{y}$  ;  $D_i = x_i - y_i$

---

<sup>\*1</sup> Diese Formel ist dem Formelverzeichnis von "Sigma Plot" entnommen und hier in geringfügig abgewandelter Schreibweise wiedergegeben.

$$\text{und } S_{\bar{D}} = \sqrt{\frac{S_D^2}{n}} = \sqrt{\frac{\frac{1}{n-1} \cdot \left[ \sum D_i^2 - \frac{1}{n} \cdot \left( \sum D_i \right)^2 \right]}{n}}$$

$$\text{so dass } t = \frac{\bar{D}}{\left( \frac{\sum D_i^2 - \frac{1}{n} \cdot \left( \sum D_i \right)^2}{n \cdot (n-1)} \right)^{1/2}}$$

Hierbei sind n-1 Freiheitsgrade zu berücksichtigen.

Dagegen musste beim Vergleich zwischen den unterschiedlichen Genotypen (bei gleicher Scherrate) berücksichtigt werden, dass die Stichprobenelemente „ungepaart“ waren. Hier wurde der sogenannte Mittelwertdifferenzentest für unabhängige Stichproben gewählt.

Die Formel<sup>\*2</sup> lautet:

$$t = \frac{\bar{D}}{S_{\bar{D}}}$$

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

$$\text{und } S_{\bar{D}} = \sqrt{\frac{n_x + n_y}{n_x \cdot n_y}} \cdot \sqrt{\frac{n_x \cdot S_x^2 + n_y \cdot S_y^2}{n_x + n_y - 2}} = \sqrt{\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y}} \cdot \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - n_x \cdot \bar{x} + \sum y_i^2 - n_y \cdot \bar{y}}{n_x + n_y - 2}}$$

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

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

---

<sup>\*2</sup> Diese Formel ist dem Formelverzeichnis von "Sigma Plot" entnommen und hier in geringfügig abgewandelter und korrigierter Schreibweise wiedergegeben.

Die beiden Tests basieren jeweils auf der sogenannten Nullhypothese, d.h. auf der Hypothese, dass die Differenzen zwischen den Mittelwerten der zu vergleichenden Stichproben zufallsbedingt sind. Der Mittelwertdifferenzentest prüft die Nullhypothese und führt zu einer Entscheidung, ob diese – bei einer bestimmten Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p = 0,05$ ) und einer bestimmten Anzahl von Freiheitsgraden – abgelehnt werden muss. Führt der Mittelwertdifferenzentest zu dem Ergebnis, dass die Ablehnung der Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von mehr als 5 % verbunden wäre, so wird die Nullhypothese angenommen; der Unterschied zwischen den Mittelwerten wird dann als „nicht-signifikant“ angesehen.

Liegt die betreffende Irrtumswahrscheinlichkeit dagegen bei 5 % oder niedriger, so wird die Nullhypothese abgelehnt. In diesem Fall gilt der Unterschied zwischen den Mittelwerten als „signifikant“.

Nachfolgend wird der Begriff grenzwertig signifikant eingeführt. Er soll den Fall bezeichnen, dass Signifikanz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit festgestellt wird, die geringfügig höher als 5 % liegt (maximal 10 %).

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Darstellung der Ergebnisse

Die Ergebnisse resultierten aus den lasermikroskopischen Bildern und der weiteren Bildverarbeitung.

Zur Generierung dieser Bilder wurde ein vorher bestimmter und in der Größe definierter Bereich (siehe Kap. 2.2.1.4.) des sich in der Strömungskammer befindlichen Deckgläschens gescannt (siehe Kap. 2.2.3.).

Abbildung 7 gibt ein Beispiel für ein solches lasermikroskopisches Bild. Es zeigt (in einer ca. 100fachen Vergrößerung) die Zelladhäsion an immobilisiertes Fibrinogen bei einer Scherrate von  $50 \text{ s}^{-1}$  nach einer Strömungsdauer von 5 Minuten. Die Abbildung enthält – vor einem schwarzen Hintergrund – zwei Gruppen von roten Partikeln, und zwar eine unüberschaubare Anzahl von kleinen (punktförmigen) und eine überschaubare Anzahl von größeren (flächigen) Partikeln.

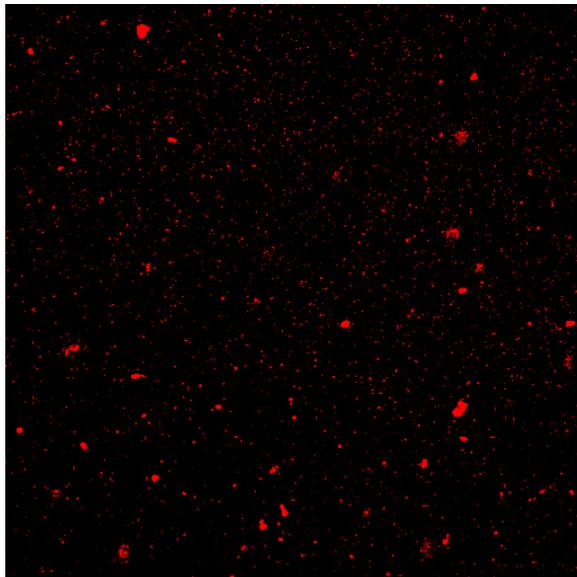


Abb. 7: Zelladhäsion an eine thrombogene Oberfläche  
(Beispiel für ein lasermikroskopisches Bild,  
ca. 100fache Vergrößerung)

Die kleinen roten Partikel waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht sicher zuzuordnen, es konnte sich bei ihnen entweder um einzelne Blutplättchen oder um Mikrothromben handeln. Ebenso waren auch die größeren Partikel noch nicht genau einzuordnen, sie konnten adhärenenten Thromben, aber auch Leukozyten entsprechen. Das Fluoreszenzsignal dieser beiden Zellarten

ergab sich durch die Anfärbung mit dem Farbstoff Mepacrin und Detektierung durch den Argon-Laser mit der Wellenlänge 458 nm. Der schwarze Hintergrund entstand durch die nicht gefärbten Blutbestandteile, zu denen Plasma oder Erythrozyten gehörten.

Zum Beweis, dass die kleinen roten Partikel auf den lasermikroskopischen Bildern tatsächlich Blutplättchen entsprachen, wurden im Anschluss an einen Versuchsabschnitt rasterelektronenmikroskopische Bilder der Oberfläche eines mit Fibrinogen beschichteten Deckgläschens angefertigt.

Abbildung 8 zeigt ein solches rasterelektronenmikroskopisches Bild. Deutlich sind hier diejenigen Merkmale zu sehen (Adhäsion, Spreading, Pseudopodien), die aktivierten Blutplättchen entsprechen. Durch dieses Bild war bewiesen, dass es sich bei den auf den lasermikroskopischen Bildern sichtbaren kleinen Partikeln tatsächlich um Blutplättchen handelte.

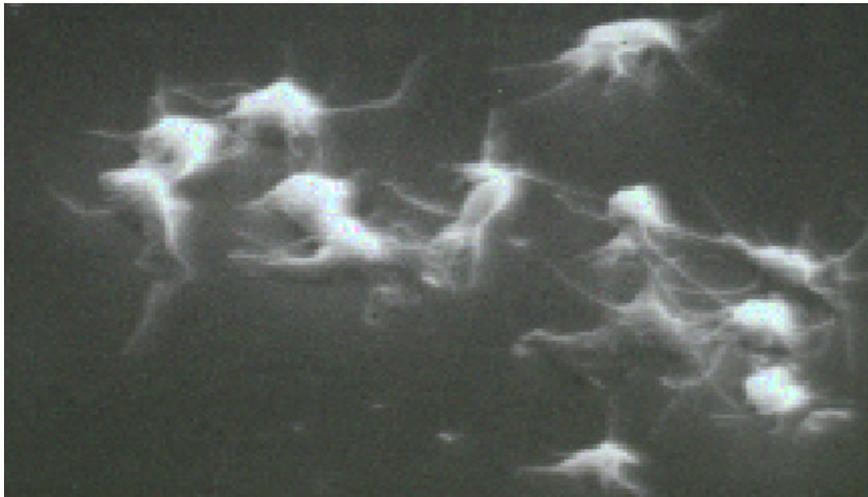


Abb. 8: Rasterelektronenmikroskopisches Bild adhärenter Blutplättchen. Untersuchung eines Deckgläschens am Ende eines Versuchsabschnitts, ca. 3.000fache Vergrößerung.

Die genaue Differenzierung der größeren Partikel in adhärenente Thromben oder Leukozyten konnte erst nach der weiteren Auswertung der Bilder erfolgen (Kap. 2.2.4).

### 3.2 Spezifität der Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen

Zum Beweis der Spezifität der Bindung zwischen immobilisiertem Fibrinogen auf dem Deckgläschen und dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  auf der Oberfläche der Blutplättchen wurden Kontrollversuche durchgeführt. Dazu wurden zwei Ansätze gewählt.

Für den ersten Kontrollversuch wurden zwei Messungen an Fibrinogen-beschichteten Deckgläschen durchgeführt. Bei der ersten Messung wurde das Blut lediglich in der üblichen Weise vorbereitet (Kap. 2.2.1.2), bei der zweiten Messung wurde zusätzlich Abciximab (4  $\mu\text{g/ml}$ ) hinzugefügt.

Abciximab ist ein gentechnisch hergestellter monoklonaler Antikörper. Er ist gegen  $\alpha_{IIb}\beta_3$  gerichtet und blockiert die Fibrinogenbindung an diesen Rezeptor. Somit verhindert er die Adhäsion und Aggregation von Blutplättchen [80].

Die folgenden Abbildungen (hier dargestellt als Schwarz-Weiß-Bilder) zeigen die Ergebnisse dieser Messungen bei einer Scherrate von  $50 \text{ s}^{-1}$  nach einer Strömungsdauer von 5 Minuten. Abbildung 9 entspricht dabei der ersten Messung (ohne Zusatz von Abciximab), Abbildung 10 der zweiten Messung (bei Zusatz von Abciximab).

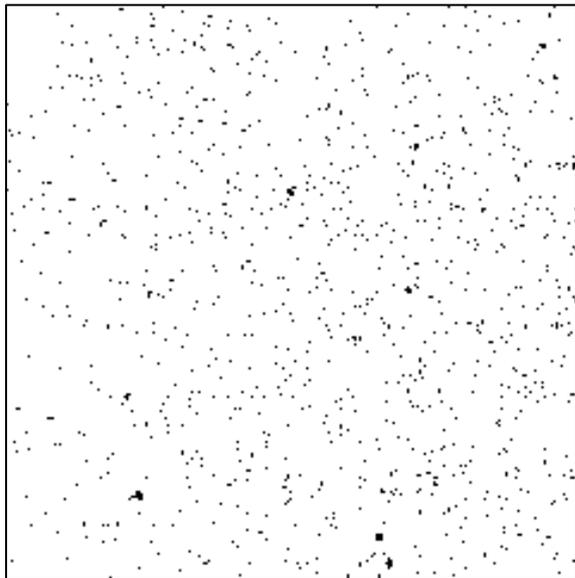


Abb. 9: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate  $50 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5, ohne Zusatz von Abciximab (ca. 100fache Vergrößerung)

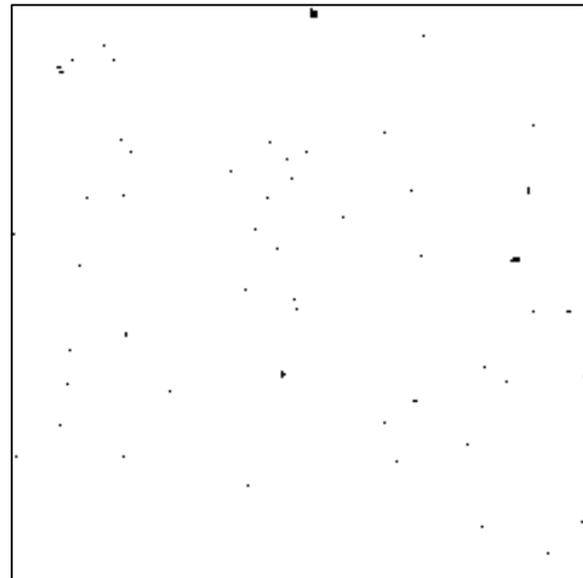


Abb. 10: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate  $50 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5, bei Zusatz von Abciximab (ca. 100fache Vergrößerung)

Wie der Vergleich der Abbildungen 9 und 10 zeigt, führte der Zusatz von Abciximab zu einer deutlich geringeren Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen (die adhärenen Teilchen sind hier schwarz dargestellt). Durch diesen Kontrollversuch konnte dargestellt werden, dass der größte Teil der Plättchenadhäsion bei den Strömungsversuchen durch den  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Rezeptor vermittelt und die Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen durch Abciximab spezifisch inhibiert wird.

Der zweite Kontrollversuch bestand ebenfalls aus zwei Messungen. Bei der ersten Messung wurde das Deckgläschen in der üblichen Weise mit Fibrinogen beschichtet (Kap. 2.2.1.1), für die zweite Messung wurde stattdessen Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin, BSA) verwendet. Die Beschichtung mit BSA diente zur Negativkontrolle.

Die Abbildungen 11 und 12 zeigen nun wieder die Plättchenadhäsion bei einer Scherrate von  $50 \text{ s}^{-1}$  nach einer Strömungsdauer von 5 Minuten. Abbildung 11 beruht dabei auf einer Fibrinogen-Beschichtung, Abbildung 12 auf einer BSA-Beschichtung. Im letzteren Fall wurde keine nennenswerte Plättchenadhäsion gemessen.

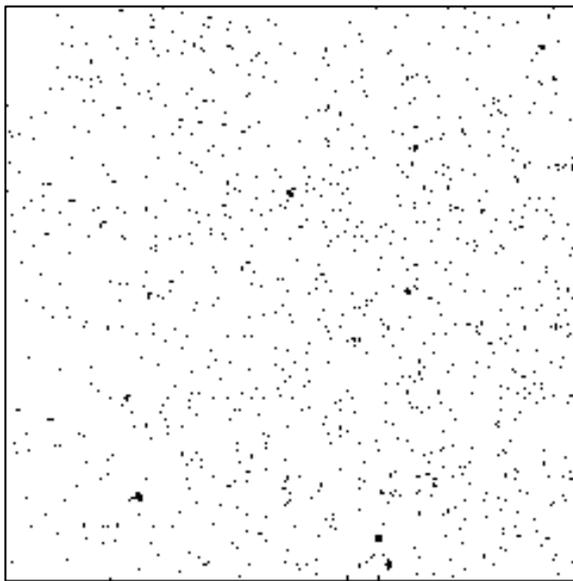


Abb. 11: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate  $50 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (ca. 100fache Vergrößerung)

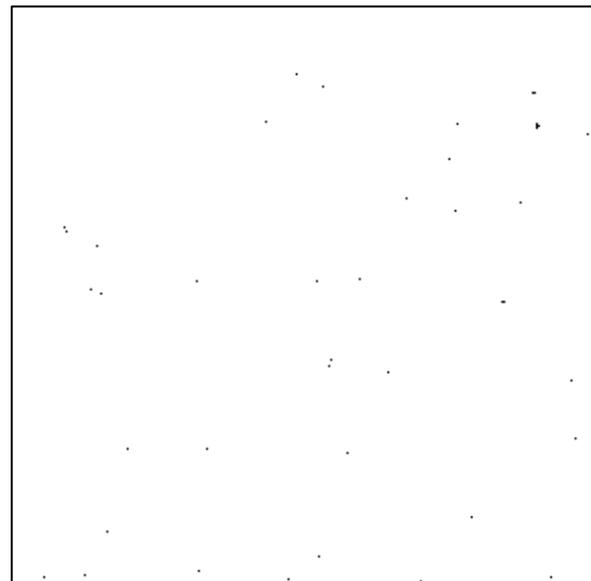


Abb. 12: Plättchenadhäsion an BSA, Scherrate  $50 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (ca. 100fache Vergrößerung)

### 3.3 Absolute Plättchenadhäsion

#### 3.3.1 Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen bei ansteigender Scherrate

##### 3.3.1.1 Graphische Darstellung der Ergebnisse

Abbildung 13 zeigt das grundsätzliche Adhäsionsverhalten der Blutplättchen an immobilisiertes Fibrinogen bei ansteigender Scherrate, jeweils nach fünf Minuten Perfusion. Dargestellt ist hier die Fluoreszenzintensität (arbitrary units) als Maß für die absolute Anzahl der adhärenen Blutplättchen.

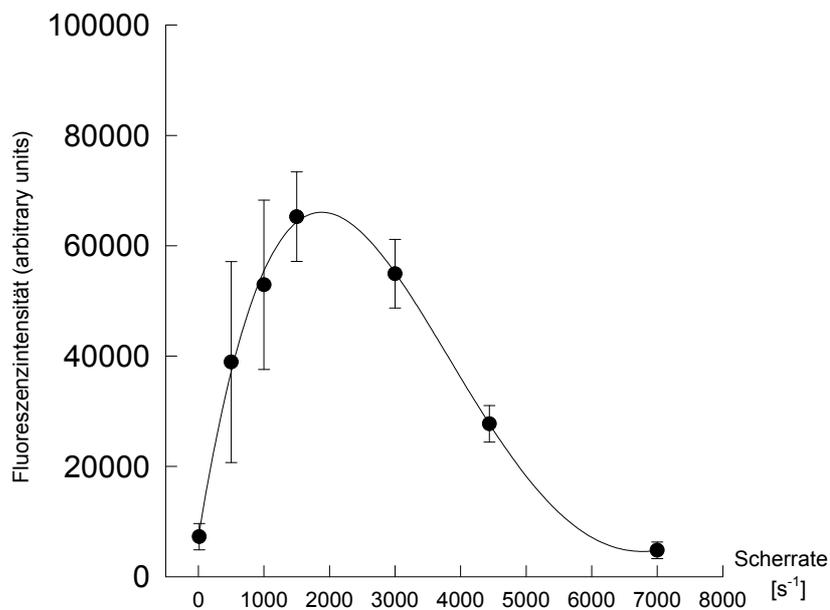


Abb. 13: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen bei ansteigender Scherrate, Minute 5 (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)

In Abbildung 13 zeigt sich eine bestimmte „Glockenkurve“. Wie im Einzelnen zu erkennen ist, nahm die Adhäsion der Thrombozyten an immobilisiertes Fibrinogen bis zu einer Scherrate von etwa  $1.500 \text{ s}^{-1}$  stetig zu. Höhere Scherraten über  $1.500 \text{ s}^{-1}$  führten dann nur noch zu einem abgeschwächten Kurvenanstieg bis zu einem Maximum bei einer Scherrate von etwa  $1.800 \text{ s}^{-1}$ ; danach ergab sich ein Abfall der thrombozytären Adhäsion.

Im Folgenden wird nur der erste Bereich der Kurve, in welchem die Plättchenadhäsion deutlich zunimmt (bis  $1.500 \text{ s}^{-1}$ ), näher betrachtet.

### 3.3.1.2 Lasermikroskopische Bilder

Abbildungen 14a bis 14c zeigen die Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen nach fünf Minuten bei ansteigender Scherrate. Hier sind sowohl die nicht-adhärenenten Teilchen als auch die bereits adhärenenten Teilchen sichtbar. Diese sind dabei nicht voneinander zu unterscheiden, da die Bilder zu diesem Zeitpunkt noch nicht weiter bearbeitet waren.

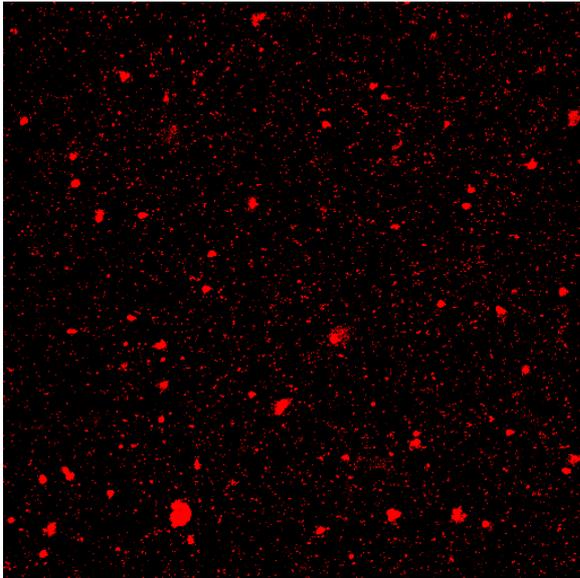


Abb. 14a: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate  $50 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (unbearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)

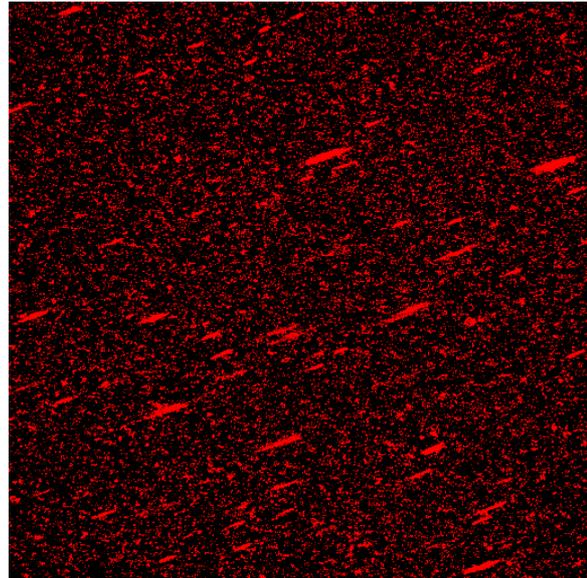


Abb. 14b: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate  $500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (unbearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)

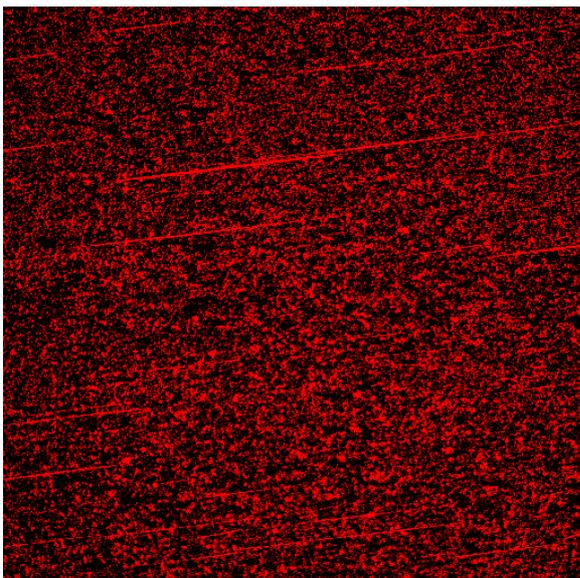


Abb. 14c: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate  $1.500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (unbearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)

Abbildung 14a zeigt die Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen bei einer Scherrate von  $50 \text{ s}^{-1}$ . Da auf diesem Bild der schwarze Hintergrund dominiert, war anzunehmen, dass die Plättchenadhäsion hier noch relativ gering war. Die großen roten Partikel, die durch die geringe Strömungsgeschwindigkeit besonders gut in dieser Abbildung zu sehen sind, entsprachen teilweise adhärenenten Thromben, größtenteils aber Leukozyten, deren Granula gleichfalls durch Mepacrin angefärbt worden sind; die kleinen roten Partikel entsprachen den Thrombozyten.

Abbildung 14b zeigt die Plättchenadhäsion bei einer Scherrate von  $500 \text{ s}^{-1}$ , Abbildung 14c bei einer Scherrate von  $1.500 \text{ s}^{-1}$ . Aufgrund der Zunahme der roten Partikel, die auf diesen Bildern erkennbar ist, konnte auf eine Zunahme der Adhäsion bei steigender Strömungsgeschwindigkeit geschlossen werden.

Um diese Vermutung zu bestätigen und um zu verdeutlichen, wie viele Blutplättchen in diesem Versuch tatsächlich adhärenent waren, wurden die lasermikroskopischen Bilder in der beschriebenen Weise (Kap. 2.2.4) weiter ausgewertet.

Dadurch war eine exakte Darstellung der tatsächlich in einem Versuch adhärenenten Blutplättchen möglich, die sich dann in den resultierenden Schwarz-Weiß-Bildern als schwarze Partikel darstellten.

Auch auf den bearbeiteten Bildern (Abb. 15a bis 15c) ist deutlich die Zunahme der Adhäsion bei steigender Strömungsgeschwindigkeit zu erkennen. Abbildung 15a zeigt zunächst noch eine relativ schwache Adhäsion, die allerdings in Abbildung 15b schon merklich angestiegen ist. In Abbildung 15c ist schließlich die Adhäsion der Blutplättchen am größten.

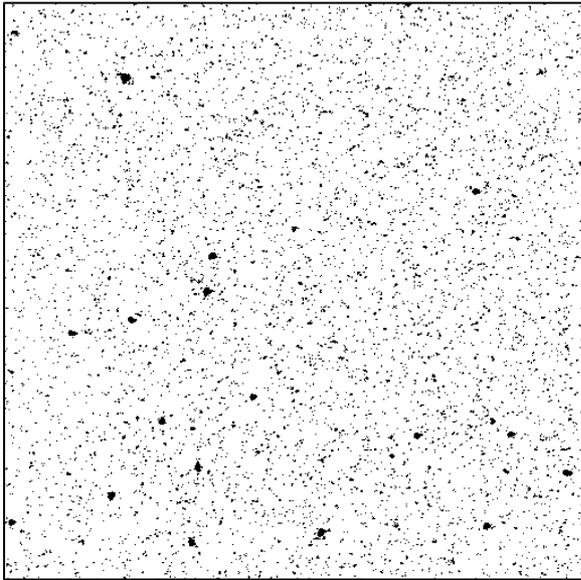


Abb. 15a: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate  $50 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (bearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)

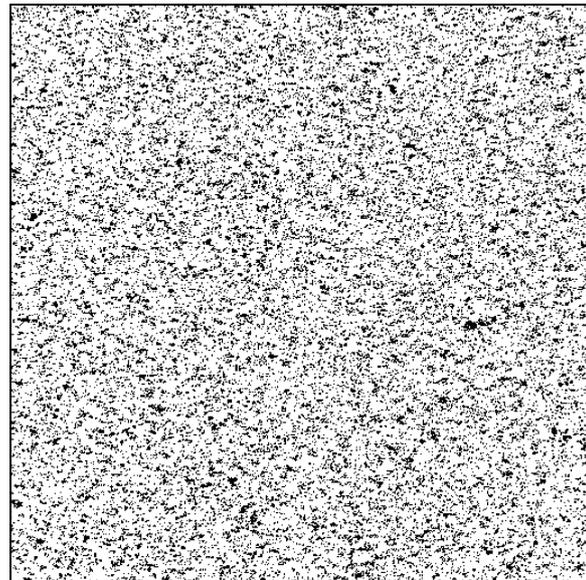


Abb. 15b: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate  $500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (bearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)

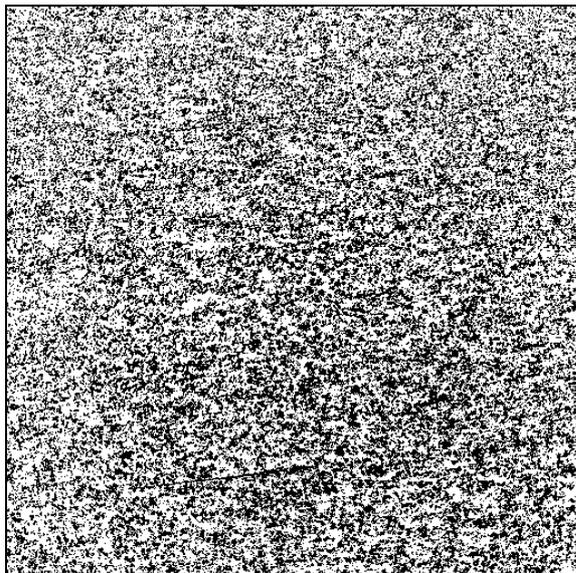


Abb. 15c: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate  $1.500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (bearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)

Des Weiteren konnten nun die in den unbearbeiteten Bildern (Abb. 14a und 14b) vorliegenden großen roten Partikel sicher identifiziert werden: Sie mussten, da sie in den bearbeiteten Bildern (Abb. 15a und 15b) verschwunden waren, nicht-adhärenenten Teilchen, also Leukozyten, entsprechen.

### 3.3.2 Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen im Zeitverlauf

#### 3.3.2.1 Graphische Darstellung der Ergebnisse

Abbildung 16 zeigt die Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen bei den verschiedenen Scherraten ( $50 \text{ s}^{-1}$ ,  $500 \text{ s}^{-1}$ ,  $1.500 \text{ s}^{-1}$ ) im Zeitverlauf.

Dargestellt sind die Ergebnisse zu den drei Zeitpunkten (Minute 0, Minute 1, Minute 5), und zwar die jeweiligen Mittelwerte und die Standardfehler. Es ist deutlich bei allen drei gewählten Scherraten der Anstieg der Plättchenadhäsion vom Beginn bis zum Abschluss des Versuchsabschnitts zu erkennen.

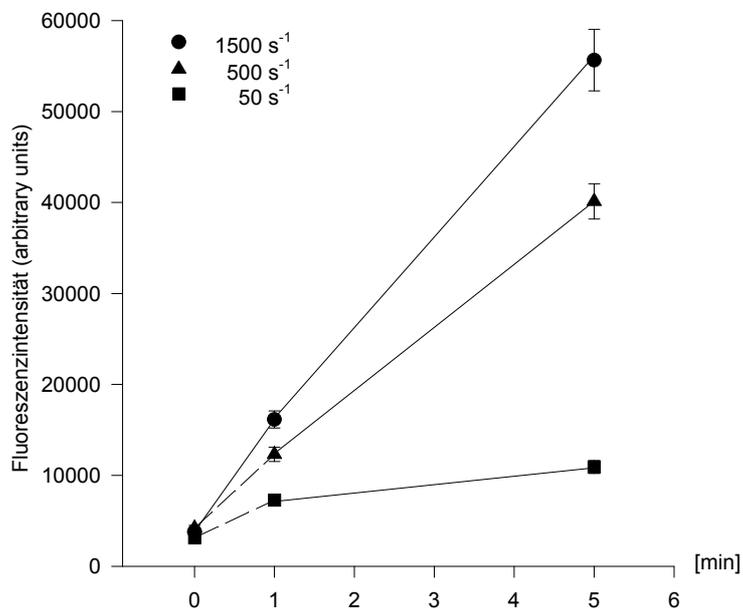


Abb. 16: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen im Zeitverlauf bei unterschiedlichen Scherraten (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)

Zur weiteren Auswertung wurde bei allen drei Scherraten das Ergebnis der Minute 0 dem der Minute 1 gegenübergestellt. Ebenso wurde die Minute 0 mit der Minute 5 verglichen sowie die Minute 1 mit der Minute 5 (Tabelle 4).

Hier ließ sich in allen neun Fällen (durch \* markiert) mit einer sehr geringen Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  ein signifikanter Unterschied feststellen.

* $\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	Minute 0 vs. Minute 1	$p<0,05$
* $\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	Minute 0 vs. Minute 5	$p<0,05$
* $\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	Minute 1 vs. Minute 5	$p<0,05$
* $\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	Minute 0 vs. Minute 1	$p<0,05$
* $\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	Minute 0 vs. Minute 5	$p<0,05$
* $\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	Minute 1 vs. Minute 5	$p<0,05$
* $\gamma=1500 \text{ s}^{-1}$	Minute 0 vs. Minute 1	$p<0,05$
* $\gamma=1500 \text{ s}^{-1}$	Minute 0 vs. Minute 5	$p<0,05$
* $\gamma=1500 \text{ s}^{-1}$	Minute 1 vs. Minute 5	$p<0,05$

Tabelle 4: Statistik zu Abb. 16 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Zeitpunkte, drei Scherraten)

### 3.3.2.2 Lasermikroskopische Bilder

Der Anstieg der Plättchenadhäsion über die Zeit war nicht nur in der graphischen Darstellung, sondern auch bei einer Analyse der folgenden lasermikroskopischen Originalbilder deutlich zu erkennen.

Die Abbildungen 17a bis 17c sind drei unbearbeitete Bilder, die das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten an immobilisiertes Fibrinogen im Zeitverlauf zeigen, jeweils bei einer Scherrate von  $1.500 \text{ s}^{-1}$ .

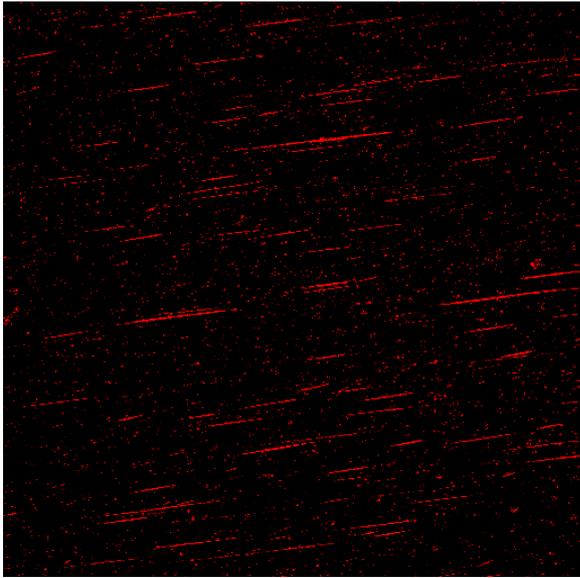


Abb. 17a: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate  $1.500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 0 (unbearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)

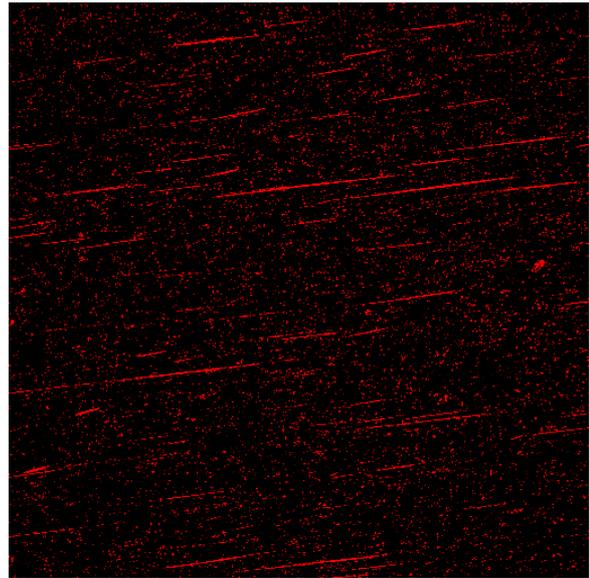


Abb. 17b: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate  $1.500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 1 (unbearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)

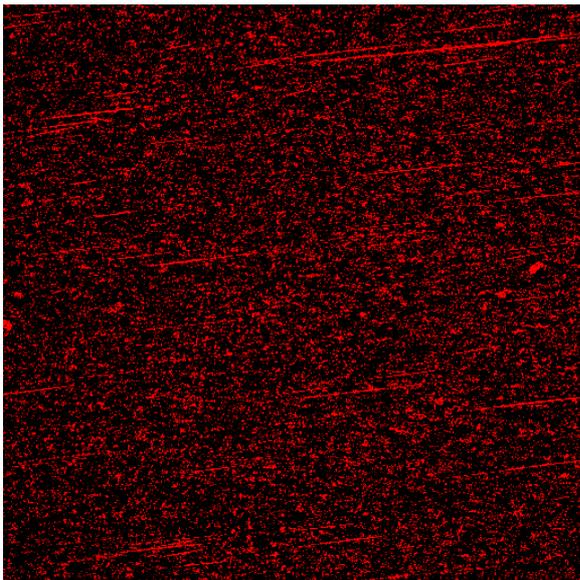


Abb. 17c: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate  $1.500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (unbearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)

Abbildung 17a zeigt die Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen unmittelbar nach Beginn eines Versuchsabschnitts. Abbildung 17b ist das nachfolgende Bild nach einer Minute Perfusion. In Abbildung 17c ist die Plättchenadhäsion nach fünf Minuten Blutströmung zu sehen.

Auf diesen Bildern ist eine Adhäsionszunahme schon nach einer Minute zu erkennen, noch deutlicher ist sie nach fünf Minuten Perfusion.

Die folgenden drei Bilder (Abb. 18a bis 18c) entsprechen dem gleichen Versuchsabschnitt, sind nun aber in der zuvor beschriebenen Weise bearbeitet worden (Kap. 2.2.4).

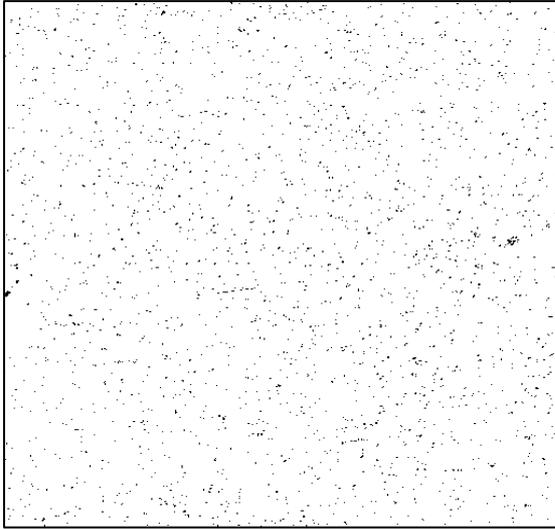


Abb. 18a: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate  $1.500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 0 (bearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)

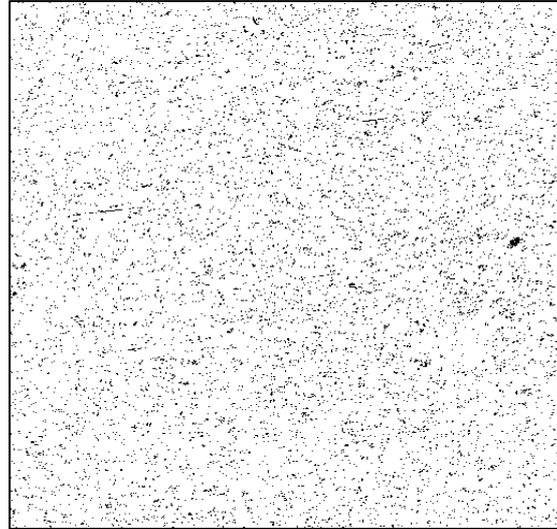


Abb. 18b: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate  $1.500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 1 (bearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)

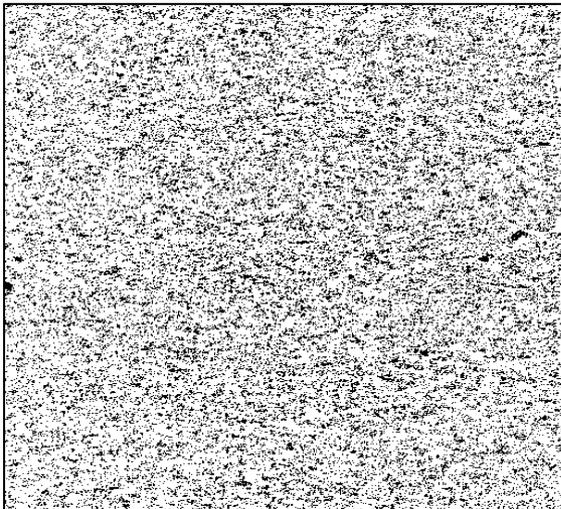


Abb. 18c: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate  $1.500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (bearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)

Auf den Abbildungen 18a bis 18c ist wieder der deutliche Anstieg der Plättchenadhäsion zu erkennen. Während die Adhäsion, wie auf Abbildung 18a zu sehen ist, unmittelbar nach Beginn des Strömungsexperiments noch gering war, ergab sich nach einer Minute eine deutliche Zunahme (Abb. 18b). Fünf Minuten nach Perfusionsbeginn (Abb. 18c) war dann eine starke Plättchenadhäsion klar zu erkennen.

Im Folgenden wird eine unterschiedliche Adhäsionsaktivität der Blutplättchen in Relation zum HPA-1-Polymorphismus des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  geprüft.

### 3.3.3 Einfluss des HPA-1-Polymorphismus des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf die Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen bei ansteigender Scherrate

Nachfolgend wird die Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen bei den verschiedenen Genotypen 15 Sekunden nach Perfusionsbeginn (Minute 0), nach 1 Minute sowie nach 5 Minuten Blutströmung dargestellt.

#### 3.3.3.1 Plättchenadhäsion in Minute 0

Abb. 19 zeigt die Plättchenadhäsion der drei Genotypen bei drei verschiedenen Scherraten, 15 Sekunden nach Perfusionsbeginn.

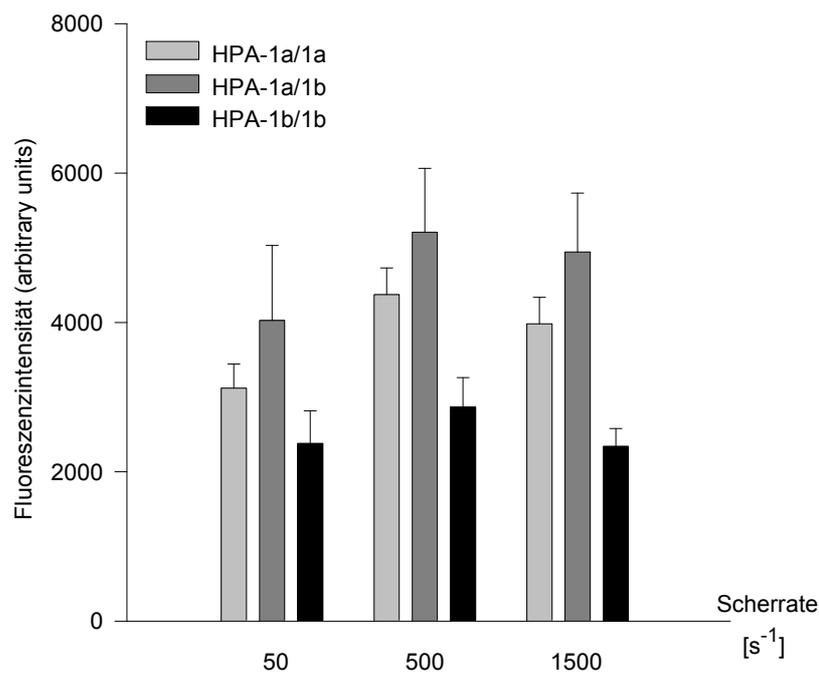


Abb. 19: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen; Minute 0, steigende Scherraten, unterschiedliche Genotypen (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)

Wurde zunächst die Plättchenadhäsion bei gleichem Genotyp und ansteigender Scherrate verglichen, war auffällig, dass der Adhäsionswert zunächst anstieg, bei einer Scherrate von  $1.500 \text{ s}^{-1}$  dann aber wieder abnahm. Signifikant unterschiedlich war dies allerdings nur beim Genotyp HPA-1a/1a (Tabelle 5, die signifikanten Unterschiede sind mit \* markiert)

* HPA-1a/1a	$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	vs. $500 \text{ s}^{-1}$	$p<0,05$
* HPA-1a/1a	$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	vs. $1500 \text{ s}^{-1}$	$p<0,05$
HPA-1a/1a	$\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	vs. $1500 \text{ s}^{-1}$	$p>0,05$
HPA-1a/1b	$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	vs. $500 \text{ s}^{-1}$	$p>0,05$
HPA-1a/1b	$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	vs. $1500 \text{ s}^{-1}$	$p>0,05$
HPA-1a/1b	$\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	vs. $1500 \text{ s}^{-1}$	$p>0,05$
HPA-1b/1b	$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	vs. $500 \text{ s}^{-1}$	$p>0,05$
HPA-1b/1b	$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	vs. $1500 \text{ s}^{-1}$	$p>0,05$
HPA-1b/1b	$\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	vs. $1500 \text{ s}^{-1}$	$p>0,05$

Tabelle 5: Statistik zu Abb. 19 (Signifikanzprüfung für steigende Scherraten bei drei Genotypen; Minute 0)

Im Fokus dieser Arbeit stand allerdings der Vergleich der Genotypen untereinander bei gleichbleibender Scherrate. Betrachtete man dies genauer, so fand sich die höchste Adhäsion jeweils beim Genotyp HPA-1a/1b, der geringste Wert war in allen drei Fällen beim Genotyp HPA-1b/1b zu sehen. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich hierbei jedoch nur bei den beiden höheren Scherraten jeweils zwischen dem Genotyp HPA-1a/1a und HPA-1a/1b sowie zwischen HPA-1a/1b und HPA-1b/1b (in Tabelle 6 jeweils mit \* markiert).

$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	$p>0,05$
$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$
$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$
$\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	$p>0,05$
* $\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	$p<0,05$
* $\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	$p<0,05$
$\gamma=1500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	$p>0,05$
* $\gamma=1500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	$p<0,05$
* $\gamma=1500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	$p<0,05$

Tabelle 6: Statistik zu Abb. 19 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Genotypen bei drei Scherraten; Minute 0)

### 3.3.3.2 Plättchenadhäsion nach Minute 1

In Abbildung 20 wird die thrombozytäre Adhäsion nach der ersten Minute dargestellt, und zwar für die drei Scherraten und die drei Genotypen.

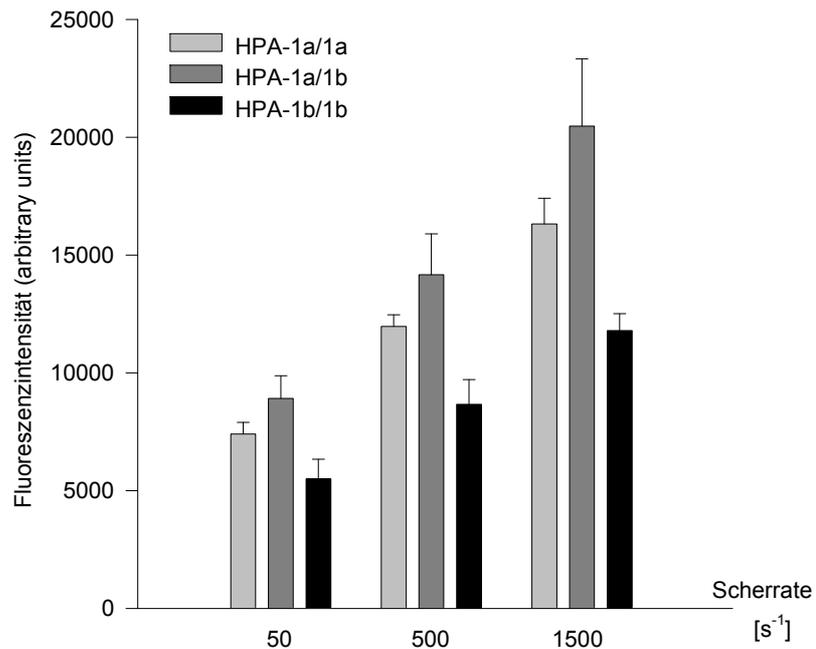


Abb. 20: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen; Minute 1, steigende Scherraten, unterschiedliche Genotypen (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)

Hierbei gab es ebenfalls zwei Möglichkeiten der Auswertung:

Zum einen konnten die Ergebnisse der Plättchenadhäsion bei ansteigender Scherrate und gleichem Genotyp verglichen werden. Hier zeigte sich bei jedem der drei Genotypen ein eindeutiger und jeweils signifikanter Anstieg (in Tabelle 7 mit \* markiert) der Plättchenadhäsion.

* HPA-1a/1a	$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	vs. $500 \text{ s}^{-1}$	$p<0,05$
* HPA-1a/1a	$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	vs. $1500 \text{ s}^{-1}$	$p<0,05$
* HPA-1a/1a	$\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	vs. $1500 \text{ s}^{-1}$	$p<0,05$
* HPA-1a/1b	$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	vs. $500 \text{ s}^{-1}$	$p<0,05$
* HPA-1a/1b	$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	vs. $1500 \text{ s}^{-1}$	$p<0,05$
* HPA-1a/1b	$\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	vs. $1500 \text{ s}^{-1}$	$p<0,05$
* HPA-1b/1b	$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	vs. $500 \text{ s}^{-1}$	$p<0,05$
* HPA-1b/1b	$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	vs. $1500 \text{ s}^{-1}$	$p<0,05$
* HPA-1b/1b	$\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	vs. $1500 \text{ s}^{-1}$	$p<0,05$

Tabelle 7: Statistik zu Abb. 20 (Signifikanzprüfung für steigende Scherraten bei drei Genotypen; Minute 1)

Beim Vergleich der Genotypen untereinander war die höchste Adhäsion jeweils beim Genotyp HPA-1a/1b zu sehen, danach folgte der Genotyp HPA-1a/1a. Die geringste Adhäsion fand sich beim Genotyp HPA-1b/1b.

Eine signifikant unterschiedliche Adhäsion zwischen den einzelnen Genotypen bei gleichbleibender Scherrate war nach der ersten Minute Blutströmung in sechs Fällen zu sehen (in Tabelle 8 jeweils mit \* markiert).

$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	$p>0,05$
* $\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	$p=0,05$
* $\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	$p<0,05$
$\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	$p>0,05$ ( $p=0,09$ )
* $\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	$p<0,05$
* $\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	$p<0,05$
$\gamma=1500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	$p>0,05$ ( $p=0,10$ )
* $\gamma=1500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	$p<0,05$
* $\gamma=1500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	$p<0,05$

Tabelle 8: Statistik zu Abb. 20 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Genotypen bei drei Scherraten; Minute 1)

Wie Tabelle 8 zeigt, war sowohl zwischen HPA-1a/1a und HPA-1b/1b als auch zwischen HPA-1a/1b und HPA-1b/1b jeweils ein signifikanter Unterschied bei allen drei Scherraten zu sehen. Zwischen den Genotypen HPA-1a/1a und HPA-1a/1b fand sich dagegen kein signifikanter Unterschied im strengen Sinne, allerdings konnten die Unterschiede in zwei Fällen (bei Scherraten von  $500\text{ s}^{-1}$  und  $1.500\text{ s}^{-1}$ ) als grenzwertig signifikant ( $p = 0,09$  und  $p = 0,10$ ) bezeichnet werden.

### 3.3.3.3 Plättchenadhäsion nach Minute 5

Die folgende Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse der Plättchenadhäsion nach fünf Minuten Perfusion.

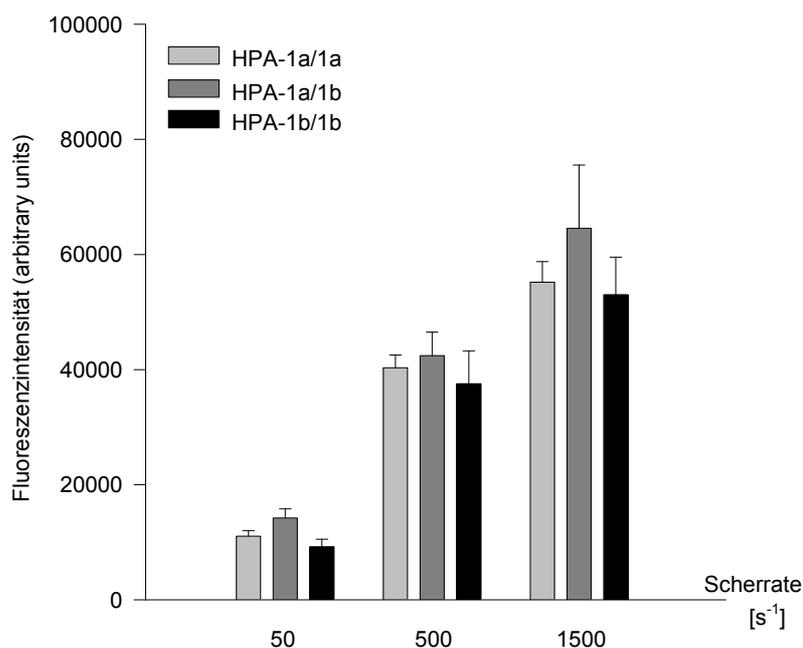


Abb. 21: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen; Minute 5, steigende Scherraten, unterschiedliche Genotypen (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)

Abbildung 21 ließ sich ebenfalls auf zwei Arten analysieren. Zunächst konnten die Ergebnisse der Plättchenadhäsion bei steigender Scherrate und gleichem Genotyp verglichen werden. Auch hier fand sich ein deutlicher Anstieg der Plättchenadhäsion.

Wie Tabelle 9 darstellt, waren diese Unterschiede, die schon nach Minute 1 zu sehen waren, nach Minute 5 ebenfalls in fast allen Fällen signifikant (in Tabelle mit \* markiert). Einzige Ausnahme war der Genotyp HPA-1a/1b, hier zeigte sich beim Vergleich der Scherraten  $500\text{ s}^{-1}$  und  $1.500\text{ s}^{-1}$  lediglich ein grenzwertig signifikanter Unterschied ( $p = 0,08$ ).

* HPA-1a/1a	$\gamma=50\text{ s}^{-1}$	vs. $500\text{ s}^{-1}$	$p<0,05$
* HPA-1a/1a	$\gamma=50\text{ s}^{-1}$	vs. $1500\text{ s}^{-1}$	$p<0,05$
* HPA-1a/1a	$\gamma=500\text{ s}^{-1}$	vs. $1500\text{ s}^{-1}$	$p<0,05$
* HPA-1a/1b	$\gamma=50\text{ s}^{-1}$	vs. $500\text{ s}^{-1}$	$p<0,05$
* HPA-1a/1b	$\gamma=50\text{ s}^{-1}$	vs. $1500\text{ s}^{-1}$	$p<0,05$
HPA-1a/1b	$\gamma=500\text{ s}^{-1}$	vs. $1500\text{ s}^{-1}$	$p>0,05$ ( $p=0,08$ )
* HPA-1b/1b	$\gamma=50\text{ s}^{-1}$	vs. $500\text{ s}^{-1}$	$p<0,05$
* HPA-1b/1b	$\gamma=50\text{ s}^{-1}$	vs. $1500\text{ s}^{-1}$	$p<0,05$
* HPA-1b/1b	$\gamma=500\text{ s}^{-1}$	vs. $1500\text{ s}^{-1}$	$p<0,05$

Tabelle 9: Statistik zu Abb. 21 (Signifikanzprüfung für steigende Scherraten bei drei Genotypen; Minute 5)

Die zweite Interpretationsmöglichkeit der Abbildung 21 war auch hier wieder der Vergleich der Ergebnisse der drei Genotypen untereinander bei gleichbleibender Scherrate. Wie bei den Ergebnissen nach einer Minute Blutströmung war auch hier die höchste Plättchenadhäsion beim Genotyp HPA-1a/1b zu finden, gefolgt vom Genotyp HPA-1a/1a. Die geringste Adhäsion zeigte wiederum der Genotyp HPA-1b/1b.

Tabelle 10 zeigt, dass hier nur in einem Fall (in Tabelle mit \* markiert) ein signifikanter Unterschied vorlag, nämlich bei einer Scherrate von  $50\text{ s}^{-1}$  zwischen HPA-1a/1b und HPA-1b/1b. Ein grenzwertig signifikanter Unterschied fand sich – ebenfalls bei einer Scherrate von  $50\text{ s}^{-1}$  – beim Vergleich der Genotypen HPA-1a/1a und HPA-1a/1b ( $p = 0,08$ ).

$\gamma=50\text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	$p>0,05$ ( $p=0,08$ )
$\gamma=50\text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$
* $\gamma=50\text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	$p<0,05$
$\gamma=500\text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	$p>0,05$
$\gamma=500\text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$
$\gamma=500\text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$
$\gamma=1500\text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	$p>0,05$
$\gamma=1500\text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$
$\gamma=1500\text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$

Tabelle 10: Statistik zu Abb. 21 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Genotypen bei drei Scherraten; Minute 5)

### 3.3.4 Einfluss des HPA-1-Polymorphismus des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf die Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen im Zeitverlauf

Nachfolgend wird die Plättchenadhäsion bei den verschiedenen Genotypen bei einer geringen ( $50 \text{ s}^{-1}$ ), einer mittleren ( $500 \text{ s}^{-1}$ ) und einer hohen Scherrate ( $1.500 \text{ s}^{-1}$ ) dargestellt.

#### 3.3.4.1 Plättchenadhäsion bei geringer Scherrate ( $50 \text{ s}^{-1}$ )

Die folgende Abbildung 22 zeigt die Adhäsionsunterschiede zwischen den einzelnen Genotypen im Zeitverlauf bei einer geringen Scherrate ( $50 \text{ s}^{-1}$ ) für die drei Genotypen und im Zeitverlauf.

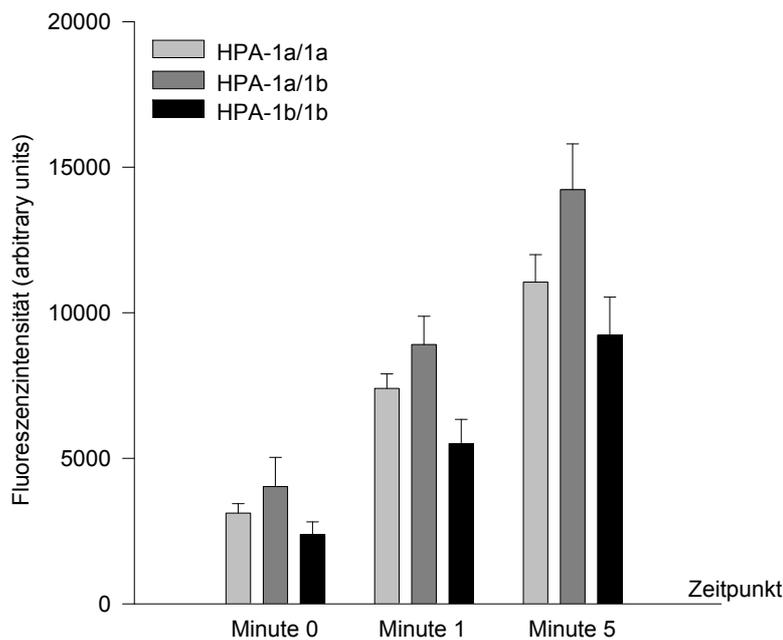


Abb. 22: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen; Scherrate  $50 \text{ s}^{-1}$ , unterschiedliche Genotypen, unterschiedliche Zeitpunkte (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)

Auch hier kamen zwei Vergleichsmöglichkeiten in Frage. Zunächst erfolgte die Betrachtung zu unterschiedlichen Zeitpunkten und bei gleichem Genotyp.

Wie Tabelle 11 darstellt, war bei den drei Genotypen ein eindeutiger und in allen Fällen signifikanter Anstieg der Plättchenadhäsion im Zeitverlauf zu finden (in Tabelle mit \* markiert).

* HPA-1a/1a Minute 0 vs. Minute 1	p<0,05
* HPA-1a/1a Minute 0 vs. Minute 5	p<0,05
* HPA-1a/1a Minute 1 vs. Minute 5	p<0,05
* HPA-1a/1b Minute 0 vs. Minute 1	p<0,05
* HPA-1a/1b Minute 0 vs. Minute 5	p<0,05
* HPA-1a/1b Minute 1 vs. Minute 5	p<0,05
* HPA-1b/1b Minute 0 vs. Minute 1	p<0,05
* HPA-1b/1b Minute 0 vs. Minute 5	p<0,05
* HPA-1b/1b Minute 1 vs. Minute 5	p<0,05

Tabelle 11: Statistik zu Abb. 22 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Zeitpunkte bei drei Genotypen; Scherrate 50 s<sup>-1</sup>)

Wurden nun die Adhäsionsunterschiede zwischen den Genotypen zum gleichen Zeitpunkt miteinander verglichen, so fand sich auch hier wieder die größte Plättchenadhäsion beim Genotyp HPA-1a/1b, gefolgt vom Genotyp HPA-1a/1a und HPA-1b/1b.

Diese Unterschiede waren allerdings nur teilweise signifikant. Wie Tabelle 12 zeigt, lag ein signifikanter Unterschied in drei Fällen vor (in Tabelle mit \* markiert), nämlich nach Minute 1 zwischen den Genotypen HPA-1a/1a und HPA-1b/1b sowie zwischen HPA-1a/1b und HPA-1b/1b. Nach Minute 5 war ein signifikanter Unterschied zu sehen beim Vergleich der Genotypen HPA-1a/1b und HPA-1b/1b; der Vergleich von HPA-1a/1a und HPA-1a/1b ergab ein grenzwertig signifikantes Ergebnis (p = 0,08).

Minute 0 HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	p>0,05
Minute 0 HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	p>0,05
Minute 0 HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	p>0,05
Minute 1 HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	p>0,05
* Minute 1 HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	p=0,05
* Minute 1 HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	p<0,05
Minute 5 HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	p>0,05 (p=0,08)
Minute 5 HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	p>0,05
* Minute 5 HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	p<0,05

Tabelle 12: Statistik zu Abb. 22 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Genotypen bei drei Zeitpunkten; Scherrate 50 s<sup>-1</sup>)

### 3.3.4.2 Plättchenadhäsion bei mittlerer Scherrate ( $500 \text{ s}^{-1}$ )

Abbildung 23 zeigt die absolute Plättchenadhäsion bei einer Scherrate von  $500 \text{ s}^{-1}$ , und zwar für die drei Genotypen und im Zeitverlauf.

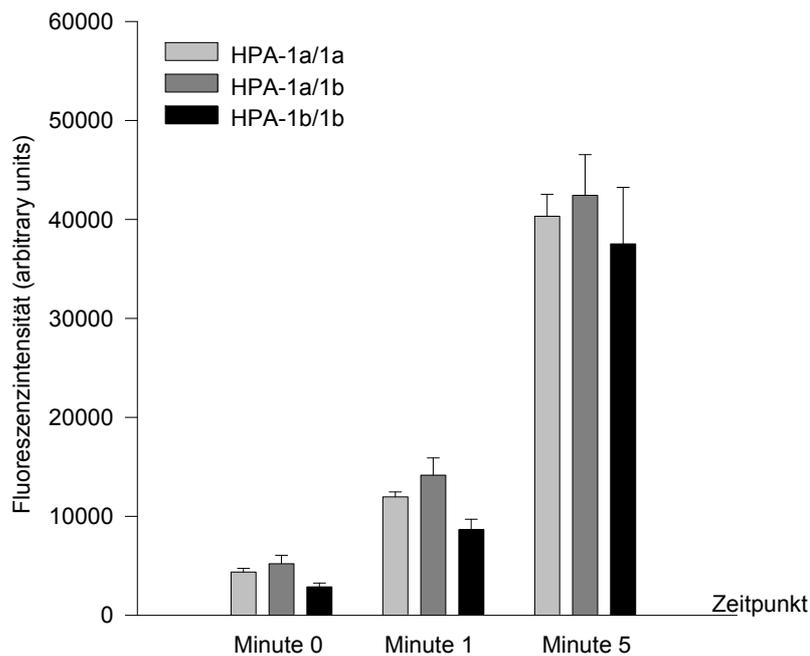


Abb. 23: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen; Scherrate  $500 \text{ s}^{-1}$ , unterschiedliche Genotypen, unterschiedliche Zeitpunkte (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)

Wurde zunächst die Plättchenadhäsion bei einer mittleren Scherrate von  $500 \text{ s}^{-1}$  zu unterschiedlichen Zeitpunkten und bei gleichem Genotyp betrachtet, fand sich auch hier wieder bei allen drei Genotypen ein deutlicher Anstieg der Plättchenadhäsion im Zeitverlauf.

Wie die folgende Tabelle 13 darstellt, war dieser Adhäsionsanstieg für alle 3 Genotypen nach 5 Minuten Perfusion im Vergleich zum Zeitpunkt 0 bzw. nach 1 Minute eindeutig und signifikant (in Tabelle mit \* markiert).

* HPA-1a/1a	Minute 0 vs. Minute 1	p<0,05
* HPA-1a/1a	Minute 0 vs. Minute 5	p<0,05
* HPA-1a/1a	Minute 1 vs. Minute 5	p<0,05
* HPA-1a/1b	Minute 0 vs. Minute 1	p<0,05
* HPA-1a/1b	Minute 0 vs. Minute 5	p<0,05
* HPA-1a/1b	Minute 1 vs. Minute 5	p<0,05
* HPA-1b/1b	Minute 0 vs. Minute 1	p<0,05
* HPA-1b/1b	Minute 0 vs. Minute 5	p<0,05
* HPA-1b/1b	Minute 1 vs. Minute 5	p<0,05

Tabelle 13: Statistik zu Abb. 23 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Zeitpunkte bei drei Genotypen; Scherrate 500 s<sup>-1</sup>)

Wurden nun die Genotypen untereinander verglichen, so fiel auch hier wieder die höchste Plättchenadhäsion beim Genotyp HPA-1a/1b auf, gefolgt vom Genotyp HPA-1a/1a. Die geringste Adhäsion zeigte der Genotyp HPA-1b/1b.

Signifikante Unterschiede waren hierbei nur teilweise zu finden (in Tabelle 14 mit \* markiert), nämlich sowohl zum Zeitpunkt 0 als auch nach Minute 1 zwischen den Genotypen HPA-1a/1a und HPA-1b/1b sowie zwischen HPA-1a/1b und HPA-1b/1b. Ein grenzwertig signifikanter Unterschied fand sich zusätzlich noch nach Minute 1 zwischen HPA-1a/1a und HPA-1a/1b (p = 0,09).

Minute 0	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	p>0,05
* Minute 0	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	p<0,05
* Minute 0	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	p<0,05
Minute 1	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	p>0,05 (p=0,09)
* Minute 1	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	p<0,05
* Minute 1	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	p<0,05
Minute 5	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	p>0,05
Minute 5	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	p>0,05
Minute 5	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	p>0,05

Tabelle 14: Statistik zu Abb. 23 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Genotypen bei drei Zeitpunkten; Scherrate 500 s<sup>-1</sup>)

### 3.3.4.3 Plättchenadhäsion bei hoher Scherrate ( $1.500 \text{ s}^{-1}$ )

Die folgende Abbildung 24 stellt die Plättchenadhäsion bei einer Scherrate von  $1.500 \text{ s}^{-1}$  dar, und zwar für die drei Genotypen und im Zeitverlauf.

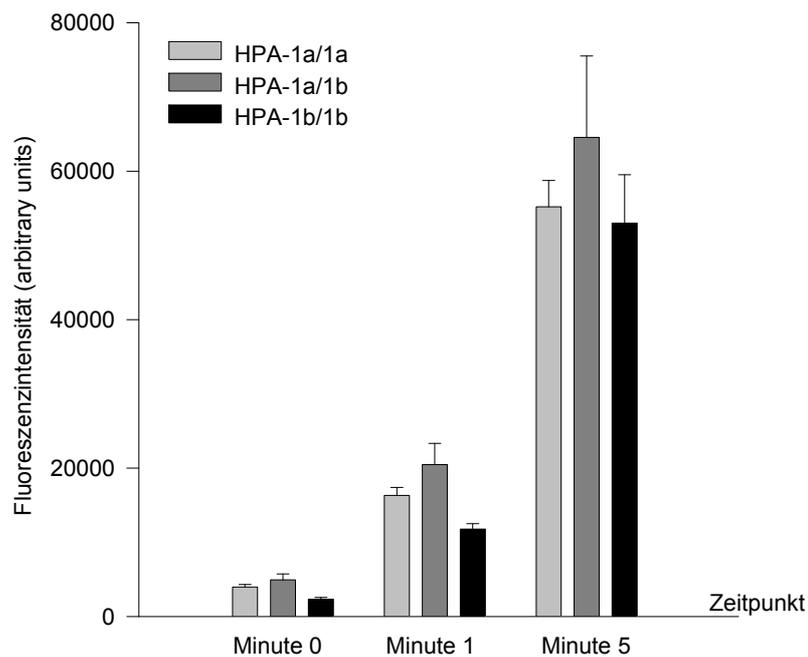


Abb. 24: Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen; Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$ , unterschiedliche Genotypen, unterschiedliche Zeitpunkte (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)

Wie bei den niedrigeren Scherraten konnte auch für eine Scherrate von  $1.500 \text{ s}^{-1}$  beim Vergleich der Ergebnisse zwischen den verschiedenen Zeitpunkten und bei gleichem Genotyp beobachtet werden, dass die Plättchenadhäsion im Zeitverlauf anstieg.

Auch hier waren die Adhäsionsunterschiede, die in Abbildung 24 zu sehen sind, in allen Fällen signifikant (in Tabelle 15 mit \* markiert).

* HPA-1a/1a	Minute 0 vs. Minute 1	p<0,05
* HPA-1a/1a	Minute 0 vs. Minute 5	p<0,05
* HPA-1a/1a	Minute 1 vs. Minute 5	p<0,05
* HPA-1a/1b	Minute 0 vs. Minute 1	p<0,05
* HPA-1a/1b	Minute 0 vs. Minute 5	p<0,05
* HPA-1a/1b	Minute 1 vs. Minute 5	p<0,05
* HPA-1b/1b	Minute 0 vs. Minute 1	p<0,05
* HPA-1b/1b	Minute 0 vs. Minute 5	p<0,05
* HPA-1b/1b	Minute 1 vs. Minute 5	p<0,05

Tabelle 15: Statistik zu Abb. 24 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Zeitpunkte bei drei Genotypen; Scherrate 1.500 s<sup>-1</sup>)

Analog zu den Ergebnissen für eine Scherrate von 500 s<sup>-1</sup> war beim Vergleich der Genotypen untereinander zum gleichen Zeitpunkt auch hier wieder die größte Plättchenadhäsion beim Genotyp HPA-1a/1b zu finden, gefolgt vom Genotyp HPA-1a/1a und HPA-1b/1b.

In Tabelle 16 sind ebenfalls nur teilweise signifikante Unterschiede zu sehen (in Tabelle mit \* markiert); sie entsprachen denen der Scherrate von 500 s<sup>-1</sup>, nämlich sowohl in Minute 0 als auch nach Minute 1 beim Vergleich zwischen den Genotypen HPA-1a/1a und HPA-1b/1b sowie zwischen HPA-1a/1b und HPA-1b/1b.

Minute 0	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	p>0,05
* Minute 0	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	p<0,05
* Minute 0	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	p<0,05
Minute 1	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	p>0,05
* Minute 1	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	p<0,05
* Minute 1	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	p<0,05
Minute 5	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	p>0,05
Minute 5	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	p>0,05
Minute 5	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	p>0,05

Tabelle 16: Statistik zu Abb. 24 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Genotypen bei drei Zeitpunkten; Scherrate 1.500 s<sup>-1</sup>)

### 3.4 Relative Plättchenadhäsion

Die relative Plättchenadhäsion stellt das Verhältnis zweier absoluter Adhäsionswerte zu unterschiedlichen Zeitpunkten dar. Sie entspricht dem Quotienten aus der Adhäsionsrate eines späteren Zeitpunktes ( $T_2$ ) und der Adhäsionsrate eines früheren Zeitpunktes ( $T_1$ ) und kann somit dem Adhäsionsanstieg gleichgesetzt werden. Durch diese Berechnung eliminieren sich individuelle Unterschiede des Untersuchungsmaterials (z.B. eine höhere oder niedrigere Anzahl von Blutplättchen) oder methodische Fehler, soweit sie zu beiden Zeitpunkten parallel auftreten.

Nachfolgend wurden die Ergebnisse, die aus Minute 0, Minute 1 und Minute 5 resultierten, zueinander in Beziehung gesetzt, so dass sich insgesamt drei Fälle der relativen Adhäsion ergaben.

### 3.4.1 Vergleich zwischen Minute 5 und Minute 1

Abbildung 25 zeigt die Unterschiede in der relativen Adhäsion zwischen Minute 5 und Minute 1 bei den drei Scherraten und bei den drei Genotypen.

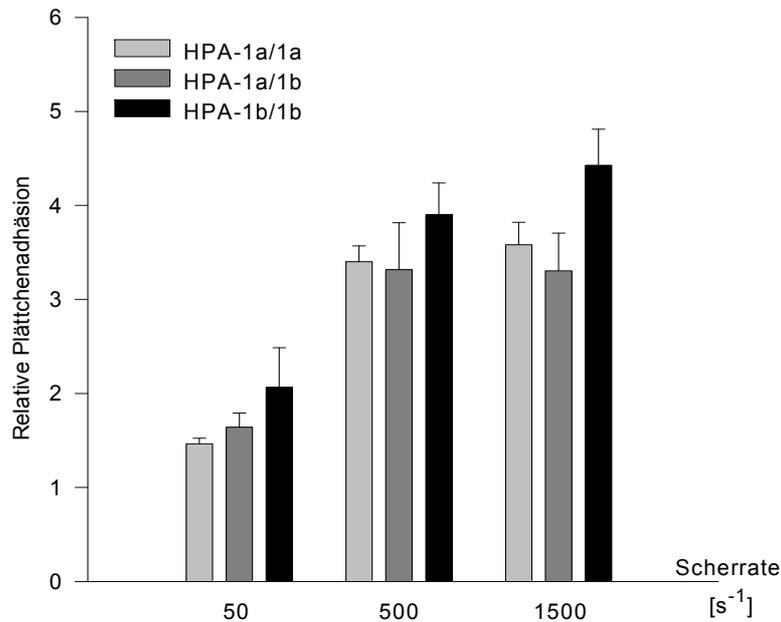


Abb. 25: Relative Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen; Adhäsion der Minute 5 im Vergleich zu Minute 1; unterschiedliche Scherraten, unterschiedliche Genotypen (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)

Den größten Wert der relativen Plättchenadhäsion, also die stärkste Adhäsionszunahme, zeigte bei sämtlichen Scherraten der Genotyp HPA-1b/1b. Bei den höheren Scherraten ( $500 s^{-1}$  und  $1.500 s^{-1}$ ) fiel zusätzlich die relativ geringste Adhäsionszunahme des Genotyps HPA-1a/1b auf.

Wie in Tabelle 17 dargestellt ist, waren diese Unterschiede nur bei einer Scherrate von  $50 \text{ s}^{-1}$  zwischen HPA-1a/1a und HPA-1b/1b signifikant (in Tabelle mit \* markiert). Grenzwertig signifikante Unterschiede waren zu sehen bei einer Scherrate von  $500 \text{ s}^{-1}$  zwischen HPA-1a/1a und HPA-1b/1b ( $p = 0,10$ ) sowie bei einer Scherrate von  $1.500 \text{ s}^{-1}$  zwischen HPA-1a/1a und HPA-1b/1b ( $p = 0,07$ ) und zwischen HPA-1a/1b und HPA-1b/1b ( $p = 0,06$ ).

$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	$p>0,05$
* $\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	$p<0,05$
$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$
$\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	$p>0,05$
$\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$ ( $p=0,10$ )
$\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$
$\gamma=1500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	$p>0,05$
$\gamma=1500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$ ( $p=0,07$ )
$\gamma=1500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$ ( $p=0,06$ )

Tabelle 17: Statistik zu Abb. 25 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Genotypen bei drei Scherraten; Minute 5 im Vergleich zu Minute 1)

### 3.4.2 Vergleich zwischen Minute 1 und Minute 0

In Abbildung 26 wird die relative Adhäsion zwischen Minute 1 und Minute 0 aufgezeigt.

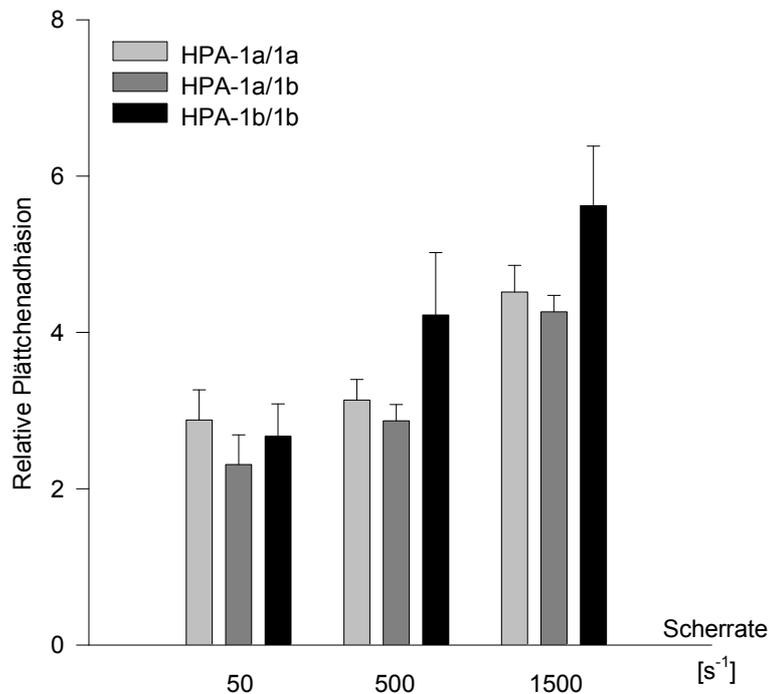


Abb. 26: Relative Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen; Adhäsion der Minute 1 im Vergleich zu Minute 0; unterschiedliche Scherraten, unterschiedliche Genotypen (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)

Auch bei dieser Darstellung war auffällig, dass bei den höheren Scherraten ( $500 \text{ s}^{-1}$  und  $1.500 \text{ s}^{-1}$ ) der höchste Wert der relativen Adhäsion jeweils beim Genotyp HPA-1b/1b zu finden war; bei der niedrigen Scherrate von  $50 \text{ s}^{-1}$  zeigte sich der höchste Wert dagegen beim Genotyp HPA-1a/1a. Der Genotyp HPA-1a/1b führte in allen drei Fällen zur geringsten relativen Adhäsion.

Die Signifikanzprüfung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 18 dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen ergaben sich hierbei nicht, es konnte lediglich bei einer Scherrate von  $500 \text{ s}^{-1}$  zwischen HPA-1a/1a und HPA-1b/1b ein grenzwertig signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p = 0,10$ ).

$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	$p>0,05$
$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$
$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$
$\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	$p>0,05$
$\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$ ( $p=0,10$ )
$\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$
$\gamma=1500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	$p>0,05$
$\gamma=1500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$
$\gamma=1500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$

Tabelle 18: Statistik zu Abb. 26 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Genotypen bei drei Scherraten; Minute 1 im Vergleich zu Minute 0)

### 3.4.3 Vergleich zwischen Minute 5 und Minute 0

Die relative Adhäsion zwischen Minute 5 und Minute 0 ist aus Abbildung 27 ersichtlich.

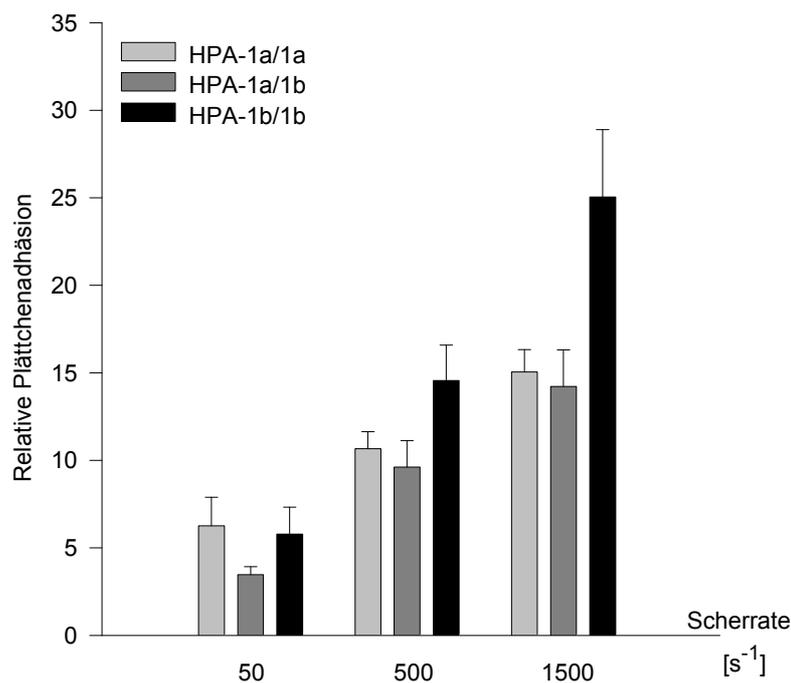


Abb. 27: Relative Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen; Adhäsion der Minute 5 im Vergleich zu Minute 0; unterschiedliche Scherraten, unterschiedliche Genotypen (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)

Auch bei dieser Darstellung war bei den höheren Scherraten ( $500 \text{ s}^{-1}$  und  $1.500 \text{ s}^{-1}$ ) deutlich die höhere relative Plättchenadhäsion bei dem Genotyp HPA-1b/1b zu erkennen.

Wie Tabelle 19 zeigt, waren die Unterschiede zwischen dem Genotyp HPA-1a/1a und HPA-1b/1b bei den beiden höheren Scherraten jeweils signifikant. Zwischen dem Genotyp HPA-1a/1b und HPA-1b/1b bestand ein signifikanter Unterschied bei einer Scherrate von  $1.500 \text{ s}^{-1}$ , bei einer Scherrate von  $500 \text{ s}^{-1}$  zeigte sich zwischen diesen beiden Genotypen nur ein grenzwertig signifikanter Unterschied ( $p = 0,07$ ). Alle signifikanten Unterschiede sind in der Tabelle jeweils mit \* markiert.

$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	$p>0,05$
$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$
$\gamma=50 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$
$\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	$p>0,05$
* $\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	$p=0,05$
$\gamma=500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	$p>0,05$ ( $p=0,07$ )
$\gamma=1500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1a/1b	$p>0,05$
* $\gamma=1500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1a vs. HPA-1b/1b	$p<0,05$
* $\gamma=1500 \text{ s}^{-1}$	HPA-1a/1b vs. HPA-1b/1b	$p<0,05$

Tabelle 19: Statistik zu Abb. 27 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Genotypen bei drei Scherraten; Minute 5 im Vergleich zu Minute 0)

## 4. Diskussion

### 4.1 Hintergrund

Blutplättchen spielen eine zentrale Rolle nicht nur in der normalen Hämostase, in welcher sie im Fall einer Gefäßverletzung durch Adhäsion und nachfolgende Aggregation zu einer Minimierung des Blutverlustes führen, sondern auch in der Pathogenese thromboembolischer Erkrankungen. Hierbei können sie unter vorbestehenden pathologischen Bedingungen, wie z.B. in arteriosklerotischen Gefäßen, zu Gefäßverschlüssen führen und damit lebensbedrohlich werden.

Der Prozess der normalen Hämostase und auch der Thromboseentstehung beginnt mit einer reversiblen Plättchenadhäsion an freigelegte Kollagenfasern der Gefäßwand und an von-Willebrand-Faktor, der an Kollagen adsorbiert und dabei immobilisiert wird [18, 21, 22]. Hierbei sind verschiedene Rezeptoren der Plättchenmembran beteiligt, insbesondere der GP-Ib $\alpha$ -V-IX-Komplex, Integrin  $\alpha_2\beta_1$  und GP VI. Anschließend folgt die stabile Adhäsion und Aggregation der Blutplättchen, für die das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  die entscheidende Rolle spielt [18, 24].

Seit einigen Jahren sind Polymorphismen dieser verschiedenen Rezeptoren bekannt. Dazu gehören z.B. der Thr/Met-Polymorphismus des GP-Ib $\alpha$ , der 807 C/T-Polymorphismus des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  und der HPA-1-Polymorphismus des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  [82].

Die Auswirkungen dieser Polymorphismen wurden bisher in vielen klinischen und experimentellen Studien untersucht. In mehreren Fällen konnte dabei gezeigt werden, dass ein bestimmter prothrombotischer Genotyp eines Glykoproteins mit einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Mortalität verbunden ist [15, 82, 83]. Daher wird vermutet, dass die verschiedenen Rezeptorvarianten zu funktionellen Änderungen des Plättchenverhaltens führen können.

Sollte sich in weiteren Untersuchungen das Vorhandensein dieser erblichen und plättchen-spezifischen Risikofaktoren für die Entstehung arterieller Thrombosen bestätigen, so wäre dies ein interessanter Aspekt nicht nur für eine Risikoeinschätzung, sondern auch für eine prophylaktische und therapeutische Intervention.

Einer der verschiedenen Polymorphismen, der in letzter Zeit besonders beobachtet wurde, ist der HPA-1-Polymorphismus des Integrins  $\alpha_{11b}\beta_3$ .

In der ersten Fall-Kontroll-Studie zu diesem Thema im Jahr 1996 mit 139 Probanden [15] wurde berichtet, dass die HPA-1b-Variante in derjenigen Patientengruppe, die aus Patienten mit erlittenem Myokardinfarkt und instabiler Angina pectoris bestand, im Vergleich zur Kontrollgruppe aus gesunden Probanden überrepräsentiert war. Daher wurde ein Zusammenhang zwischen diesem Genotyp und einer erhöhten Inzidenz arterieller Thrombosen vermutet.

Seitdem hat es ein beträchtliches Interesse an der Fragestellung gegeben, ob der HPA-1b-Genotyp ein Risikofaktor für eine arterielle Thrombose ist. In den darauf folgenden Jahren wurden viele klinische Studien, zumeist ebenfalls Fall-Kontroll-Studien, mit dem Ziel durchgeführt, die Rolle dieses Polymorphismus genauer zu untersuchen.

Die Ergebnisse waren z.T. widersprüchlich. Einige der Untersuchungen konnten eine Beziehung zwischen dem heterozygoten oder homozygoten Genotyp HPA-1b und einem erhöhten Risiko für eine arterielle Thrombose und damit einer frühzeitigen myokardialen oder zerebralen Ischämie nachweisen [17, 31, 32, 47, 48, 49, 59], in anderen Untersuchungen wurde in Bezug auf diese Fragestellung dagegen kein Zusammenhang gefunden [50, 51, 52, 53, 54, 55].

Die Unterschiedlichkeit dieser Ergebnisse wurde mit der Annahme erklärt, dass die HPA-1b-Variante zwar keinen eigenen Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit darstellt, aber die Ursache für eine gesteigerte Plättchenthrombogenität sein könnte [17, 31, 56]. Diese Erklärung wurde u.a. darauf zurückgeführt, dass Plättchen, welche die HPA-1b-Variante aufweisen, einen niedrigeren Schwellenwert – verglichen mit dem homozygoten Genotyp HPA-1a/1a – für Plättchenaktivierung,  $\alpha$ -Granulafreisetzung,  $\alpha_{11b}\beta_3$ -Aktivierung und Fibrinogen-Bindung haben. Diese Hyperreaktivität der Blutplättchen könnte also die Ursache für ein größeres thrombotisches Potential sein [63].

Eine weitere mögliche Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse ist das unterschiedliche Alter der Probanden in den verschiedenen Studien. So konnte in mehreren Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen der HPA-1b-Variante und koronaren Ereignissen festgestellt werden, dass auch das Lebensalter eine Rolle spielt [15, 17, 32, 48, 59].

Andererseits wurde die Assoziation mit dem Alter der Probanden auch in einem Großteil derjenigen Studien untersucht, die keinen Zusammenhang feststellen konnte [50, 51, 52, 54, 55].

Neben den Fall-Kontroll-Studien wurden in der Vergangenheit auch experimentelle Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurde u.a. geprüft, ob Blutplättchen mit der HPA-1b-Variante des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  eine signifikant erhöhte Bindung an Fibrinogen zeigen. Hierbei wurden widersprüchliche Ergebnisse berichtet. Ein Teil dieser Studien konnte die These einer erhöhten Plättchenthrombogenität direkt [33] oder durch Versuche u.a. mit CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary Cells) [60] stützen, ein anderer Teil konnte keinen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und der Bindung an Fibrinogen aufzeigen [61, 62].

In diesen vier Untersuchungen wurden die Experimente allerdings nur unter statischen Bedingungen durchgeführt.

Im Gegensatz dazu wurden in dieser hier vorliegenden Arbeit flussdynamische Bedingungen als Grundlage gewählt, um die in vivo herrschenden Verhältnisse weitestgehend simulieren zu können. Dazu wurden die eingangs beschriebenen Strömungsversuche durchgeführt.

Das Ziel dabei war es, durch experimentelle Untersuchungen zu prüfen, ob bestimmte Genotypen des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  zu einer gesteigerten Plättchenthrombogenität führen.

Zur Bestimmung des Verhaltens der Blutplättchen wurden drei verschiedene Scherraten ( $50\text{ s}^{-1}$ ,  $500\text{ s}^{-1}$ ,  $1.500\text{ s}^{-1}$ ) und Untersuchungszeitpunkte (Minute 0, Minute 1, Minute 5) gewählt. Die unterschiedlichen Scherraten repräsentierten dabei die Strömungsverhältnisse, die in vivo im Bereich der Venen, der Arterien und der Arteriolen herrschen.

## 4.2 Adhäsionsverhalten der Blutplättchen bei ansteigender Scherrate

Im ersten Versuchsteil (Kap. 3.3.1) wurde das allgemeine Verhalten der Blutplättchen und die Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen in einer rechteckigen Strömungskammer bei ansteigender Scherrate untersucht. Dabei blieb der Polymorphismus des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  noch unberücksichtigt.

Hierbei zeigte sich, dass die Adhäsion der Thrombozyten bis zu einer Scherrate von etwa  $1.500 \text{ s}^{-1}$  zunahm. Damit entsprachen die Ergebnisse den Aussagen, die durch bereits zuvor veröffentlichte Studien vorlagen [11, 12].

Die Ursachen für den Anstieg der Plättchenadhäsion (Abb. 13) lassen sich mit Hilfe eines Modells erklären, wobei die Strömungsbedingungen in einem Blutgefäß analog zu denen in einem Rohr gesehen werden: Ein gleichmäßiger Flüssigkeitsstrom durch ein Rohr generiert in dessen Querschnitt ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil und eine lineare Verteilung der Scherraten. Hierbei befindet sich das Minimum der Scherkräfte im Zentrum des Flusses und das Maximum der Scherkräfte an der Peripherie. Je höher nun die Strömungsgeschwindigkeit in diesem Rohr ist, desto höher sind auch die Scherkräfte, die auf die Flüssigkeitskomponenten wirken [3].

Entsprechend diesem physikalischen Prinzip erhöhen sich bei steigender Strömungsgeschwindigkeit des Blutes die Scherkräfte, die auf die einzelnen Blutkomponenten wirken. Betroffen sind hiervon insbesondere diejenigen Blutkomponenten, die sich an der Peripherie eines Blutgefäßes befinden, also die Blutplättchen [3].

Somit sind Scherkräfte, die zur Plättchenaktivierung beitragen [3], wichtig für die nachfolgende Plättchenadhäsion.

Neben der Plättchenaktivierung tragen Scherkräfte noch auf eine weitere Art zur Plättchenadhäsion bei. Diese wird bestimmt durch die Kollisionsfrequenz der Plättchen mit der thrombogenen Oberfläche und durch die Adhäsionseffizienz dieser Kollisionen. Mit steigender Scherrate (bis zu einem gewissen Punkt) erhöht sich die Kollisionsfrequenz und führt somit zu einem Anstieg der Adhäsion [12].

Die Adhäsion lässt sich in der vorliegenden Arbeit anhand der sogenannten „Glockenkurve“ (Abb. 13) darstellen. Auch hier zeigt sich bei steigender Scherrate ein Anstieg der Plättchenadhäsion bis zu einem Maximum für einen (schmalen) Scherratenbereich, anschließend kommt es zu einem Abfall der Adhäsion.

Die Abschwächung des Adhäsionsanstiegs (etwa ab  $1.500 \text{ s}^{-1}$ ) und der anschließende Adhäsionsabfall sind ebenfalls bereits in früheren Studien beschrieben worden [84, 85].

Dieses Phänomen wird in einer Studie mit dem Erklärungsansatz erläutert, dass die Bindung zwischen  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  und oberflächengebundenem Fibrinogen durch die starken hämodynamischen Kräfte, die auf die schnell an der Gefäßwand vorbeiströmenden Plättchen wirken, wieder gelöst wird [84].

Die andere Möglichkeit, diesen Adhäsionsabfall zu deuten, besteht darin, dass bei diesen hohen Scherraten eine Bindung gar nicht erst zustande kommt, da die Kontaktzeit zwischen Substrat und Rezeptor zu gering ist [85].

### 4.3 Adhäsionsverhalten der Blutplättchen im Zeitverlauf

Im nächsten Versuchsteil wurde das Adhäsionsverhalten der Blutplättchen im Zeitverlauf untersucht (Kap. 3.3.2). In diesem Abschnitt blieb der Polymorphismus des Integrins  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  ebenfalls noch außer Betracht.

Frühere Studien [12, 22, 23, 24] hatten gezeigt, dass die Plättchenadhäsion im Zeitverlauf ansteigt.

Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden. Wie Abbildung 16 zeigt, stieg die Adhäsion der Thrombozyten im Laufe des Strömungsexperiments bei allen drei gewählten Scherraten an. Dieser zeitabhängige Anstieg der Plättchenadhäsion war in allen drei Fällen signifikant.

Ein solcher Anstieg lässt sich folgendermaßen begründen: Durch bereits adhärente Blutplättchen kommt es über aktivierte  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Rezeptoren zu einer Rekrutierung und Aktivierung von weiteren, noch strömenden Plättchen. Dies führt zur Adhäsion und zur Aggregation [18]. Dadurch nimmt die Plättchenadhäsion an thrombogene Oberflächen mit der Zeit zu.

#### 4.4 Einfluss des HPA-1-Polymorphismus des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$

Im dritten Versuchsteil (Kap. 3.3.3 und 3.3.4) wurde die Untersuchung der Plättchenadhäsion in Relation zu den verschiedenen Genotypen des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  durchgeführt. Hierbei wurde geprüft, ob eine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp besteht, nämlich eine Beziehung zwischen dem HPA-1-Polymorphismus und der Plättchenadhäsion.

In verschiedenen Studien war zuvor bereits beschrieben worden, dass thrombozytäre Rezeptorpolymorphismen das Funktionsverhalten zirkulierender Blutplättchen in einer Weise modulieren können, dass eine gesteigerte Reagibilität und Thrombogenität besteht [63, 64].

Aus diesem Grund war auch für die hier vorliegende Studie ein Einfluss des HPA-1-Polymorphismus auf die Plättchenadhäsion postuliert worden, und zwar eine größere Adhäsion bei HPA-1b-positiven Plättchen.

Zunächst wurde in Kapitel 3.3.3 das Adhäsionsverhalten der einzelnen Genotypen bei ansteigender Scherrate untersucht (Abb. 19, 20 und 21).

Bereits zum Zeitpunkt Null, also direkt nach Beginn einer gleichmäßigen Blutströmung, zeigte sich zunächst ein Anstieg der Plättchenadhäsion bei steigender Scherrate. Im Falle des Genotyps HPA-1a/1a bestand dabei ein signifikanter Unterschied. Stieg die Scherrate jedoch auf  $1.500 \text{ s}^{-1}$ , so war ein Adhäsionsabfall zu beobachten. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass unter diesen Versuchsbedingungen (d.h. zu diesem frühen Zeitpunkt) noch keine vollständige Stabilität der Thrombozytenadhäsion vorlag.

Nach einer Minute Blutströmung ließen sich reproduzierbare Ergebnisse finden. Hier war bei allen drei Genotypen ein deutlicher und signifikanter Anstieg der absoluten Plättchenadhäsion bei ansteigender Scherrate zu erkennen. Dies legt den Schluss nahe, dass sich die Versuchsbedingungen nach einer Minute stabilisiert haben und eine Übertragung auf andere Versuche zulassen.

Unterstützt wird diese These durch die Ergebnisse nach fünf Minuten Perfusion. Hierbei war bei allen Genotypen ein noch deutlicherer Anstieg der Plättchenadhäsion bei ansteigender Scherrate zu finden, dieser war bis auf eine Ausnahme ebenfalls in allen Fällen signifikant.

Weiterhin wurde in diesem Kapitel ein Vergleich der Ergebnisse der absoluten Plättchenadhäsion der drei Genotypen durchgeführt.

Hierbei hatten frühere Studien [33, 60] ergeben, dass die HPA-1b-positiven Plättchen die größte absolute Adhäsion zeigen. Diese Ergebnisse wurden teilweise bestätigt, teilweise ergaben sich neue Aspekte.

So fiel einerseits die absolute Adhäsion bei den Plättchen, die heterozygot für den Genotyp HPA-1b waren, bei allen drei gewählten Scherraten am größten aus, andererseits zeigten jedoch diejenigen Plättchen, die homozygot für HPA-1b waren, die geringste Adhäsion. Ein solches uneinheitliches Verhalten der HPA-1b-positiven Plättchen wurde hier sowohl zum Zeitpunkt Null als auch nach einer Minute und nach fünf Minuten Blutströmung festgestellt.

Dieses Ergebnis ist bemerkenswert; es steht allerdings in gewisser Übereinstimmung mit zwei Studien [61, 62], die – ebenfalls in experimentellen Untersuchungen – keinen Einfluss des HPA-1-Polymorphismus auf die absolute Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen feststellen konnten.

Im weiteren Verlauf wurde in Kapitel 3.3.4 das Verhalten der einzelnen Genotypen zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Auch hierbei konnten die Ergebnisse einer früheren Studie [60] teilweise reproduziert werden, teilweise wurden sie aber auch in eine neue Richtung gelenkt.

Wurde zunächst jeder Genotyp für sich betrachtet, so zeigte sich jeweils ein deutlicher und auch signifikanter Anstieg der Plättchenadhäsion im Zeitverlauf. Dies war bei allen drei gewählten Scherraten zu sehen (Abb. 22, 23 und 24).

Anschließend wurden die Ergebnisse der absoluten Plättchenadhäsion für die drei Genotypen miteinander verglichen. Auch hier bestätigte es sich, in Übereinstimmung mit der genannten Studie [60], dass diejenigen Plättchen, die den heterozygoten Rezeptorgenotyp HPA-1a/1b aufwiesen, bei allen drei Scherraten die höchste Adhäsion zeigten, gefolgt vom Genotyp HPA-1a/1a.

Der homozygote Genotyp HPA-1b/1b führte allerdings erstaunlicherweise in allen drei Fällen zur geringsten Plättchenadhäsion.

Für dieses interessante Phänomen, nämlich das unterschiedliche Verhalten der homozygoten und heterozygoten HPA-1b-Plättchen, gibt es zwei unterschiedliche Erklärungsansätze:

Zum einen kann vermutet werden, dass hier ein Einfluss anderer Komponenten, wie z.B. der Gerinnungsfaktoren, wirksam ist. Um diese Hypothese zu testen und eine solche Beeinflussung der Ergebnisse auszuschließen, waren für die vorliegende Arbeit alle teilnehmenden Probanden vor Beginn der Studie auf Abweichungen hinsichtlich klinisch-chemischer und hämatologischer Parameter untersucht worden. Nach Beendigung der Versuche wurden die Ergebnisse der absoluten Adhäsion in Beziehung zu den verschiedenen Parametern gesetzt. Da hierbei kein Zusammenhang festgestellt werden konnte, ist ein Einfluss solcher hämatologischer oder klinisch-chemischer Variablen nicht erkennbar.

Während dieser erste Erklärungsansatz somit zu vernachlässigen ist, findet sich bei näherer Betrachtung der Ergebnisse (Abb. 22, 23 und 24) noch eine weitere Interpretationsmöglichkeit:

Die Plättchenadhäsion des homozygoten Genotyps HPA-1a/1a lag in Minute 0 und Minute 1 bei allen drei Scherraten um 16-23 % unter der des heterozygoten Genotyps HPA-1a/1b. Nach Minute 5 ergab sich bei der geringen Scherrate von  $50 \text{ s}^{-1}$  ein ähnlicher Wert (22 %), während hier bei den höheren Scherraten von  $500 \text{ s}^{-1}$  und  $1.500 \text{ s}^{-1}$  der Adhäsionsunterschied niedriger war (5-15 %).

Ähnliche Ergebnisse ließen sich beim Vergleich des homozygoten Genotyps HPA-1b/1b mit dem Genotyp HPA-1a/1b feststellen: So lag die Plättchenadhäsion des Genotyps HPA-1b/1b in Minute 0 und Minute 1 bei allen drei Scherraten um 39-53 % unter der des Genotyps HPA-1a/1b. Nach Minute 5 sank dann der Unterschied bei der niedrigen Scherrate von  $50 \text{ s}^{-1}$  auf 36 %; bei den höheren Scherraten von  $500 \text{ s}^{-1}$  und  $1.500 \text{ s}^{-1}$  betrug der Adhäsionsunterschied hier nur noch 12-18 %.

Auch bei der Gegenüberstellung der Genotypen HPA-1b/1b und HPA-1a/1a zeigte sich dieselbe Tendenz: Die Adhäsion lag in Minute 0 und Minute 1 bei HPA-1b/1b um 24-41 % niedriger als bei HPA-1a/1a. Dieser Unterschied belief sich nach Minute 5 bei der geringen Scherrate von  $50 \text{ s}^{-1}$  auf nur 17 %; bei den höheren Scherraten waren es lediglich 4-7 %.

Diese Vergleiche lassen vermuten, dass die Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen bei Plättchen, die den homozygoten Genotyp HPA-1b/1b tragen, initial zwar noch geringer ist als bei den anderen zwei Genotypen, dann aber schneller ansteigt und sich der Adhäsionsrate der anderen beiden Genotypen annähert. Besonders deutlich ist dies bei den höheren Scherraten ( $500 \text{ s}^{-1}$  und  $1.500 \text{ s}^{-1}$ ) zu sehen.

Um diese These zu erhärten, wurden die Ergebnisse zusätzlich in anderer Form ausgewertet, nämlich in Form der relativen Plättchenadhäsion (Kap. 3.4). Dazu wurden jeweils die Werte der absoluten Adhäsion der Minute 5 und der Minute 1 in Beziehung gesetzt zur Minute 1 und zur Minute 0, so dass insgesamt drei unterschiedliche Darstellungen resultierten (Abb. 25, 26 und 27).

Bei Betrachtung dieser Ergebnisse ist deutlich zu sehen, dass der Adhäsionsanstieg der Plättchen mit dem homozygoten Genotyp HPA-1b/1b im Vergleich zwischen der Minute 5 und der Minute 1 (Abb. 25) bei allen drei Scherraten jeweils am größten ist. Diese Aussage trifft bei den beiden anderen Vergleichen (Abb. 26 und 27) nur für die höheren Scherraten zu. Signifikante Unterschiede konnten zwar hierbei nur in wenigen Fällen festgestellt werden, es zeigten sich aber immerhin in mehreren Vergleichen grenzwertig signifikante Ergebnisse. Dies lässt vermuten, dass die Beeinflussung der Plättchenadhäsion durch den HPA-1-Polymorphismus am stärksten bei hohen Scherraten zum Tragen kommt.

Eine Erklärung dafür ist die bereits beschriebene Feststellung, dass HPA-1b-positive Plättchen – verglichen mit dem homozygoten Genotyp HPA-1a/1a – einen niedrigeren Schwellenwert für Plättchenaktivierung,  $\alpha$ -Granulafreisetzung,  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung und Fibrinogen-Bindung haben. Dies führt zu einer Hyperreaktivität und damit zu einem größeren thrombotischen Potential [63, 64]. Vielleicht beeinflussen dabei gerade die hohen Scherraten die schnellere Aktivierung der HPA-1b-positiven Plättchen und führen damit zu einer zwar initial langsameren, dann aber gesteigerten Adhäsion an Fibrinogen.

Möglicherweise entwickeln diese Plättchen auch stärkere Adhäsionskräfte mit einer stabileren Plättchen-Oberfläche-Interaktion und einer verminderten Ablösung der Plättchen von der Oberfläche bei höheren Scherraten [81, 86].

Aufgrund des hier dargestellten Trends der erhöhten relativen Adhäsion für HPA-1b-positive Blutplättchen wären weitere Studien interessant, in denen die Plättchenadhäsion im Zeitverlauf über eine noch längere Versuchsdauer untersucht wird. Dabei könnte geprüft werden, ob sich die Annäherung der absoluten Adhäsion der Plättchen mit dem Genotyp HPA-1b/1b an die Adhäsion der anderen Genotypen weiter fortsetzt und möglicherweise nach einer gewissen Zeit sogar die Adhäsion der anderen beiden Genotypen übertrifft.

#### 4.5 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Seit vielen Jahren werden zur Primär- und Sekundärprophylaxe von Herz-Kreislauf-Erkrankungen Plättchenhemmstoffe eingesetzt, dazu zählt insbesondere Acetylsalicylsäure (ASS), aber auch Abciximab bzw. eine weitere Substanz dieser Wirkstoffgruppe, das Tirofiban (Aggrastat®).

Wie durch mehrere Studien bereits bekannt wurde, kann die regelmäßige Einnahme von Aspirin® (wichtigster Vertreter von ASS) die Infarktinzidenz um über 50 % senken [87, 88, 89]. Allerdings hat eine solche Therapie auch einige Nachteile:

Zum einen handelt es sich bei ASS um einen relativ schwachen Wirkstoff, der nur die Thromboxan A<sub>2</sub>-gesteuerte Plättchenaggregation hemmt [30, 90]. Zum anderen können vor allem bei längerer Einnahme verschiedene Nebenwirkungen auftreten, wie z.B. allergische Reaktionen, gastrointestinale Beschwerden oder Nierenschädigungen [91].

Im Jahr 1995 wurde in Deutschland als weitere antithrombotische Therapieoption der Antikörper c7E3 Fab (Abciximab) zugelassen. Dieser Antikörper, der gegen das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  gerichtet ist, verhindert die Bindung von Fibrinogen an diesen Rezeptor und somit die Plättchenaggregation [80].

Während dieser Antikörper ursprünglich nur als zusätzliche Therapie bei der perkutanen Koronarintervention für Hochrisiko-Patienten zugelassen war, ist die Behandlung mit Aggrastat® mittlerweile ebenfalls indiziert bei instabiler Angina pectoris und bei non-Q-wave-Infarkt (intramuralem Infarkt) [80]. Allerdings hat auch die Therapie mit diesen plättchenspezifischen Inhibitoren des Fibrinogenrezeptors Nachteile, da als Nebenwirkungen unter der Therapie u.a. ein deutlich erhöhtes Risiko für das Auftreten von Blutungen und auch von Thrombozytopenien besteht.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Studien durchgeführt mit dem Ziel, die Wirkung von Aspirin® [57, 63, 92] und Abciximab [63, 93] in Bezug auf den Rezeptorpolymorphismus des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  zu untersuchen.

Diese Studien führten zu unterschiedlichen Ergebnissen:

In einer derjenigen Untersuchungen, die sich mit Aspirin® befassten, wurde die Wirkung dieses Medikaments auf Zellen sowohl mit dem Genotyp HPA-1a/1a als auch mit der Variante HPA-1b-positiv geprüft. Es wurde nachgewiesen, dass die erhöhte Migration auf Fibrinogen und vWF, die HPA-1b-positiven Zellen zeigten, durch Aspirin® vollständig

aufgehoben wurde; es ergab sich jedoch kein Effekt bei Zellen, die den Genotyp HPA-1a/1a aufwiesen [57].

Ähnliche Ergebnisse konnten auch in einer anderen Studie dargestellt werden, die den Einfluss von Aspirin® auf die Plättchenaggregation untersuchte und dabei die Genotypen HPA-1a/1a und HPA-1a/1b gegenüberstellte [92]. Hier konnte ebenfalls ein größerer Einfluss, also eine stärkere Hemmung der Aggregation, auf Plättchen des Genotyps HPA-1a/1b nachgewiesen werden.

Eine weitere Studie ging noch differenzierter vor und brachte einen Vergleich aller drei Genotypen (HPA-1a/1a, HPA-1a/1b, HPA-1b/1b) [63]. Während hierbei ebenfalls die Aggregation der Plättchen mit dem Genotyp HPA-1a/1b durch Aspirin® am stärksten gehemmt wurde, zeigten diejenigen Plättchen, die den Genotyp HPA-1b/1b aufwiesen, kaum eine Veränderung.

In derselben Studie wurde außerdem der Effekt von Abciximab geprüft. Die Ergebnisse stimmten dabei mit den Aspirin®-Versuchen überein. Auch hier wurde die Aggregation bei Plättchen mit dem Genotyp HPA-1a/1b am stärksten gehemmt, am wenigsten bei HPA-1b/1b-Plättchen.

Dagegen konnte eine andere Untersuchung darstellen, dass Plättchen mit dem Genotyp HPA-1a/1b im Vergleich zum Genotyp HPA-1a/1a eine geringere Rezeptorhemmung durch Abciximab aufwiesen und dadurch eine erhöhte Plättchenaggregation zur Folge hatten [93].

In diesen verschiedenen Studien zu Aspirin® und Abciximab konnte somit ein Einfluss der Genotypen des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  nachgewiesen werden, wobei mit wenigen Ausnahmen der HPA-1a/1b-Genotyp als der einflussreichste Genotyp beschrieben wurde.

Bestätigt werden können diese Ergebnisse durch die hier vorliegende Arbeit, in der sich ebenfalls ein Einfluss des HPA-1-Polymorphismus ergab. Dieser zeigte sich in einer erhöhten absoluten Adhäsion der HPA-1a/1b-Plättchen an immobilisiertes Fibrinogen.

Zusätzlich dazu konnte hier eine erhöhte relative Adhäsion der Plättchen des Genotyps HPA-1b/1b dargestellt werden.

Aus diesem Grund kann mit der hier vorliegenden Untersuchung ein Einfluss des Polymorphismus des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  auf die Inzidenz der arteriellen Thrombose bestätigt werden. Allerdings lässt sich eine derart starke Assoziation, wie sie in verschiedenen klinischen Studien festgestellt worden ist [17, 31, 32, 47, 48, 49, 59], hier nicht nachweisen.

Möglicherweise tritt diese starke Assoziation nur im Zusammenspiel mit einem oder mehreren weiteren klassischen Risikofaktoren auf, wie z.B. Rauchen [48], Geschlecht [32] oder Hypercholesterinämie [32].

Falls sich durch weitere Studien der heterozygote oder homozygote HPA-1b-Genotyp als zusätzliche Risikodeterminante für eine arterielle Thrombose – neben bzw. gemeinsam mit den klassischen Risikofaktoren – herausstellt, kann bei frühzeitiger Feststellung einer genetischen Disposition eine prophylaktische Therapie mit Thrombozytenfunktionshemmern, wie z.B. Aspirin®, angezeigt sein. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund, dass bei Personen, die diese Risikodeterminante tragen, das Auftreten eines Myokardinfarktes um etwa 7 Jahre vorverlegt ist [15]. Weiterhin kann eine gezielte Verminderung der klassischen Risikofaktoren bei diesen Patienten zu einer Reduktion des Risikos einer arteriellen Thrombose beitragen.

## 5. Zusammenfassung

- Die Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen unter arteriellen Blutflussbedingungen wird über das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  gesteuert, hierbei steigt die Adhäsion sowohl im Zeitverlauf als auch bei steigender Scherrate
- Die spezifische Interaktion zwischen immobilisiertem Fibrinogen und dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  wird moduliert durch den HPA-1-Polymorphismus der  $\beta$ -Untereinheit des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$
- Der HPA-1b/1b Genotyp ist assoziiert mit einer erhöhten (relativen) Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, dies zeigt sich in einem schnelleren Anstieg der Plättchenadhäsion im Vergleich zu den Genotypen HPA-1a/1a und HPA-1a/1b

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass insbesondere die HPA-1b-Variante eine gesteigerte Plättchenthrombogenität zur Folge hat. Darüber hinaus wird festgestellt, dass speziell der Genotyp HPA-1b/1b, welcher zu Beginn der Versuche noch die geringste (absolute) Adhäsion zeigt, im Verlauf des größten Adhäsionsanstieg aufweist.

Die Ergebnisse unterstützen somit die Hypothese, dass der HPA-1-Polymorphismus des Integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  die Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen beeinflusst und dadurch eine Rolle bei der Entstehung der arteriellen Thrombose spielt.

Allerdings lässt sich eine derart starke Assoziation, wie sie in vorangegangenen klinischen Studien festgestellt worden ist, in dieser Arbeit nicht nachweisen. Möglicherweise ist der heterozygote oder homozygote HPA-1b-Genotyp kein eigener Risikofaktor für die Entstehung arterieller Thrombosen, sondern eine zusätzliche Risikodeterminante, welche nur in Kombination mit weiteren (klassischen) Risikofaktoren zum Tragen kommt.

## 6. Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ionen (Ca <sup>++</sup> )
CD	Cluster of Differentiation
CHO	Chinese Hamster Ovary
C/T	Cytosin/Thymin
d.h.	das heißt
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GP	Glykoprotein
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonicacid]
HPA	human platelet antigen
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
KGD	Lysin-Glycin-Aspartat
KQAGDV	Lysin-Glutamin-Alanin-Glycin-Aspartat-Valin
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
µM	Mikromol
mM	Millimol
PBS	Phosphate Buffer Solution
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPACK	H-D-Phenylalanin-Prolin-Arginin-Chloromethylketon
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
Thr/Met	Threonin/Methionin
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem

vWF	von Willebrand-Faktor
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 6.2 Symbolverzeichnis

$D_i$	Differenz zweier Merkmale ( $D_i = D_1, \dots, D_n$ )
$\bar{D}$	Mittelwertdifferenz zweier Merkmale
$h$	Höhe des Feldes der Strömungskammer
$i$	Nummer eines Stichprobenelements ( $i = 1, \dots, n$ )
$n$	Stichprobenumfang
$n_x$	Stichprobenumfang des ersten Merkmals
$n_y$	Stichprobenumfang des zweiten Merkmals
$p$	Irrtumswahrscheinlichkeit
$\dot{Q}$	Strömungsrate
$s^{-1}$	reziproke Sekunde
$S_x^2$	Varianz des ersten Merkmals
$S_y^2$	Varianz des zweiten Merkmals
$S_D^2$	Varianz der Merkmalsdifferenz
$S_{\bar{D}}$	Standardfehler der Merkmalsdifferenz
$t$	Testgröße
$T_x$	Zeitpunkt $x$
TIFF	Tagged Image File Format
$w$	Länge des Feldes der Strömungskammer
$x_i$	Merkmalsbetrag des ersten Merkmals ( $x_i = x_1, \dots, x_n$ )
$\bar{x}$	Mittelwert des ersten Merkmals
$y_i$	Merkmalsbetrag des zweiten Merkmals ( $y_i = y_1, \dots, y_n$ )
$\bar{y}$	Mittelwert des zweiten Merkmals
$\gamma$	Scherrate

### 6.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematischer Aufbau der rechteckigen Strömungskammer	S. 12
Abb. 2a:	Rechteckige Strömungskammer (zusammengesetzt)	S. 13
Abb. 2b:	Rechteckige Strömungskammer (Einzelteile)	S. 13
Abb. 3:	Vereinfachte Darstellung des Strahlengangs im Laser-Scanning-Mikroskop	S. 14
Abb. 4:	Versuchsaufbau, Aufbau des Laser-Scanning-Mikroskops	S. 15
Abb. 5:	Versuchsaufbau, Strömungskammer im Laser-Scanning-Mikroskop	S. 15
Abb. 6:	Einverständniserklärung	S. 18
Abb. 7:	Zelladhäsion an eine thrombogene Oberfläche (Beispiel für ein lasermikroskopisches Bild, ca. 100fache Vergrößerung)	S. 29
Abb. 8:	Rasterelektronenmikroskopisches Bild adhärenter Blutplättchen. Untersuchung eines Deckgläschens am Ende eines Versuchsabschnitts, ca. 3.000fache Vergrößerung.	S. 30
Abb. 9:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate $50 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5, ohne Zusatz von Abciximab (ca. 100fache Vergrößerung)	S. 31
Abb. 10:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate $50 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5, bei Zusatz von Abciximab (ca. 100fache Vergrößerung)	S. 31
Abb. 11:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate $50 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (ca. 100fache Vergrößerung)	S. 32
Abb. 12:	Plättchenadhäsion an BSA, Scherrate $50 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (ca. 100fache Vergrößerung)	S. 32
Abb. 13:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen bei ansteigender Scherrate, Minute 5 (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)	S. 33
Abb. 14a:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate $50 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (unbearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)	S. 35
Abb. 14b:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate $500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (unbearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)	S. 35
Abb. 14c:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate $1.500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (unbearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)	S. 35
Abb. 15a:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate $50 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (bearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)	S. 37

---

Abb. 15b:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate $500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (bearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)	S. 37
Abb. 15c:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate $1.500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (bearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)	S. 37
Abb. 16:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen im Zeitverlauf bei unterschiedlichen Scherraten (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)	S. 38
Abb. 17a:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate $1.500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 0 (unbearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)	S. 40
Abb. 17b:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate $1.500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 1 (unbearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)	S. 40
Abb. 17c:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate $1.500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (unbearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)	S. 40
Abb. 18a:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate $1.500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 0 (bearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)	S. 41
Abb. 18b:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate $1.500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 1 (bearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)	S. 41
Abb. 18c:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen, Scherrate $1.500 \text{ s}^{-1}$ , Minute 5 (bearbeitetes Bild, ca. 100fache Vergrößerung)	S. 41
Abb. 19:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen; Minute 0, steigende Scherraten, unterschiedliche Genotypen (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)	S. 43
Abb. 20:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen; Minute 1, steigende Scherraten, unterschiedliche Genotypen (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)	S. 45
Abb. 21:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen; Minute 5, steigende Scherraten, unterschiedliche Genotypen (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)	S. 47
Abb. 22:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen; Scherrate $50 \text{ s}^{-1}$ , unterschiedliche Genotypen, unterschiedliche Zeitpunkte (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)	S. 49
Abb. 23:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen; Scherrate $500 \text{ s}^{-1}$ , unterschiedliche Genotypen, unterschiedliche Zeitpunkte (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)	S. 51
Abb. 24:	Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen; Scherrate $1500 \text{ s}^{-1}$ , unterschiedliche Genotypen, unterschiedliche Zeitpunkte (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)	S. 53

Abb. 25:	Relative Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen; Adhäsion der Minute 5 im Vergleich zu Minute 1; unterschiedliche Scherraten, unterschiedliche Genotypen (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)	S. 56
Abb. 26:	Relative Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen; Adhäsion der Minute 1 im Vergleich zu Minute 0; unterschiedliche Scherraten, unterschiedliche Genotypen (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)	S. 58
Abb. 27:	Relative Plättchenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen; Adhäsion der Minute 5 im Vergleich zu Minute 0; unterschiedliche Scherraten, unterschiedliche Genotypen (dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler)	S. 59

#### 6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Klassifizierung und Nomenklatur der Integrine [16, 25, 30]	S. 6
Tabelle 2:	Aufteilung des Probandenkollektivs	S. 19
Tabelle 3:	Alter und Laborprofil der Studienprobanden (angegeben sind Mittelwerte und einfache Standardabweichung)	S. 20
Tabelle 4:	Statistik zu Abb. 16 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Zeitpunkte, drei Scherraten)	S. 39
Tabelle 5:	Statistik zu Abb. 19 (Signifikanzprüfung für steigende Scherraten bei drei Genotypen; Minute 0)	S. 44
Tabelle 6:	Statistik zu Abb. 19 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Genotypen bei drei Scherraten; Minute 0)	S. 44
Tabelle 7:	Statistik zu Abb. 20 (Signifikanzprüfung für steigende Scherraten bei drei Genotypen; Minute 1)	S. 46
Tabelle 8:	Statistik zu Abb. 20 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Genotypen bei drei Scherraten; Minute 1)	S. 46
Tabelle 9:	Statistik zu Abb. 21 (Signifikanzprüfung für steigende Scherraten bei drei Genotypen; Minute 5)	S. 48
Tabelle 10:	Statistik zu Abb. 21 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Genotypen bei drei Scherraten; Minute 5)	S. 48
Tabelle 11:	Statistik zu Abb. 22 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Zeitpunkte bei drei Genotypen; Scherrate $50 \text{ s}^{-1}$ )	S. 50
Tabelle 12:	Statistik zu Abb. 22 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Genotypen bei drei Zeitpunkten; Scherrate $50 \text{ s}^{-1}$ )	S. 50

---

Tabelle 13:	Statistik zu Abb. 23 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Zeitpunkte bei drei Genotypen; Scherrate $500 \text{ s}^{-1}$ )	S. 52
Tabelle 14:	Statistik zu Abb. 23 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Genotypen bei drei Zeitpunkten; Scherrate $500 \text{ s}^{-1}$ )	S. 52
Tabelle 15:	Statistik zu Abb. 24 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Zeitpunkte bei drei Genotypen; Scherrate $1.500 \text{ s}^{-1}$ )	S. 54
Tabelle 16:	Statistik zu Abb. 24 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Genotypen bei drei Zeitpunkten; Scherrate $1.500 \text{ s}^{-1}$ )	S. 54
Tabelle 17:	Statistik zu Abb. 25 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Genotypen bei drei Scherraten; Minute 5 im Vergleich zu Minute 1)	S. 57
Tabelle 18:	Statistik zu Abb. 26 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Genotypen bei drei Scherraten; Minute 1 im Vergleich zu Minute 0)	S. 59
Tabelle 19:	Statistik zu Abb. 27 (Signifikanzprüfung für unterschiedliche Genotypen bei drei Scherraten; Minute 5 im Vergleich zu Minute 0)	S. 60

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] Statistisches Bundesamt (Hrsg.)  
Gesundheitswesen, Todesursachen Deutschland 2003  
Fachserie 12 / Reihe 4  
Wiesbaden 2005; Kap. 2.1.3
- [2] Lopez A.D., Murray C.C.J.L.  
The global burden of disease, 1990-2020  
Nat Med 1998; 4: S. 1241-1243
- [3] Kroll M.H., Hellums J.D., McIntire L.V., Schafer A.I., Moake J.L.  
Platelets and shear stress  
Blood 1996; 88: S. 1525-1541
- [4] Lohr M., Keppler B.  
Innere Medizin - Kompendium für Studium und Klinik, 3. Auflage  
Urban & Fischer München Jena 2000; S. 88
- [5] Lohr M., Keppler B.  
Innere Medizin - Kompendium für Studium und Klinik, 3. Auflage  
Urban & Fischer München Jena 2000; S. 103-104
- [6] Gawaz M.  
Das Blutplättchen – Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren,  
antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung  
Georg Thieme Stuttgart 1999; S. 1-2
- [7] Aarts P.A.M.M., Bolhuis P.A., Sakariassen K.S., Heethaar R.M., Sixma J.J.  
Red blood cell size is important for adherence of blood platelets to artery  
subendothelium  
Blood 1983; 62: S. 214-217
- [8] Joist J.H., Bauman J.E., Suter S.P.  
Platelet adhesion and aggregation in pulsatile shear flow: Effects of red blood  
cells  
Thromb Res 1998; 92: S. 47-52

- [9] Hellem A.J., Borchgrevink C.F., Ames S.B.  
The role of red cells in haemostasis: the relation between haematocrit, bleeding time and platelet adhesiveness  
Brit J Haematol 1961; 7: S. 42-50
- [10] Moia M., Vizzotto L., Cattaneo M., Mannucci P.M., Casati S., Ponticelli C.  
Improvement in the haemostatic defect of uraemia after treatment with recombinant human Erythropoietin  
Lancet 1987; ii: S. 1227-1229
- [11] Weiss H.J., Turitto V.T., Baumgartner H.R.  
Effect of shear rate on platelet interaction with subendothelium in citrated and native blood.  
I. Shear rate-dependent decrease of adhesion in von Willebrand's disease and the Bernard-Soulier syndrome  
J Lab Clin Med 1978; 92: S. 750-764
- [12] Bonnefoy A., Liu Q., Legrand C., Frojmovic M.M.  
Efficiency of platelet adhesion to fibrinogen depends on both cell activation and flow  
Biophys J 2000; 78: S. 2834-2843
- [13] Turner N.A., Moake J.L., Kamat S.G., Schafer A.I., Kleiman N.S., Jordan R., McIntire L.V.  
Comparative real-time effects on platelet adhesion and aggregation under flowing conditions of in vivo aspirin, heparin, and monoclonal antibody fragments against glycoprotein IIb-IIIa  
Circulation 1995; 91: S. 1354-1362
- [14] Goldsmith H.L., Turitto V.T.  
Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: Basic principles and applications  
Thromb Haemost 1986; 55: S. 415-435
- [15] Weiss E.J., Bray P.F., Tayback M., Schulman S.P., Kickler T.S., Becker L.C., Weiss J.L., Gerstenblith G., Goldschmidt-Clermont P.J.  
A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis  
N Engl J Med 1996; 334: S. 1090-1094
- [16] Müller-Berghaus G., Pötzsch B. (Hrsg.)  
Hämostaseologie - Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik  
Springer Berlin Heidelberg 1999; S. 15-16

- [17] Zotz R.B., Winkelmann B.R., Nauck M., Giers G., Maruhn-Debowski B., März W., Scharf R.E.  
Polymorphism of platelet membrane glycoprotein IIIa: Human platelet antigen 1b (HPA-1b/PI<sup>A2</sup>) is an inherited risk factor for premature myocardial infarction in coronary artery disease  
Thromb Haemost 1998; 79: S. 731-735
- [18] Gawaz M.  
Das Blutplättchen – Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung  
Georg Thieme Stuttgart 1999; S. 9-10
- [19] Alevriadou B.R., Moake J.L., Turner N.A., Ruggeri Z.M., Folie B.J., Phillips M.D., Schreiber A.B., Hrinda M.E., McIntire L.V.  
Real-time analysis of shear-dependent thrombus formation and its blockade by inhibitors of von Willebrand Factor binding to platelets  
Blood 1993; 81: S. 1263-1276
- [20] Nieswandt B., Watson S.P.  
Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?  
Blood 2003; 102: S. 449-461
- [21] Massberg S., Gawaz M., Grüner S., Schulte V., Konrad I., Zohlnhöfer D., Heinzmann U., Nieswandt B.  
A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo  
J Exp Med 2003; 197: S. 41-49
- [22] Moroi M., Jung S.M., Nomura S., Sekiguchi S., Ordinas A., Diaz-Ricart M.  
Analysis of the involvement of the von Willebrand Factor – glycoprotein Ib interaction in platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions  
Blood 1997; 90: S. 4413-4424
- [23] Siljander P.R-M., Munnix I.C.A., Smethurst P.A., Deckmyn H., Lindhout T., Ouwehand W.H., Farndale R.W., Heemskerk J.W.M.  
Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood  
Blood 2004; 103: S. 1333-1341
- [24] Kulkarni S., Dopheide S.M., Yap C.L., Ravanat C., Freund M., Mangin P., Heel K.A., Street A., Harper I.S., Lanza F., Jackson S.P.  
A revised model of platelet aggregation  
J Clin Invest 2000; 105: S. 783-791

- [25] Gawaz M.  
Das Blutplättchen – Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren,  
antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung  
Georg Thieme Stuttgart 1999; S. 30-35
- [26] Phillips D.R., Charo I.F., Parise L.V., Fitzgerald L.A.  
The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex  
Blood 1988; 71: S. 831-843
- [27] Kunicki T.J., Pidard D., Rosa J-P., Nurden A.T.  
The formation of  $Ca^{++}$ -dependent complexes of platelet membrane  
glycoproteins IIb and IIIa in solution as determined by crossed  
immunoelectrophoresis  
Blood 1981; 58: S. 268-278
- [28] Fujimura K., Phillips D.R.  
Calcium cation regulation of glycoprotein IIb-IIIa complex formation in platelet  
plasma membranes  
J Biol Chem 1983; 258: S. 10247-10252
- [29] Kunicki T.J., Newman P.J.  
The molecular immunology of human platelet proteins  
Blood 1992; 80: S. 1386-1404
- [30] Lefkovits J., Plow E.F., Topol E.J.  
Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine  
N Engl J Med 1995; 332: S. 1553-1559
- [31] Zotz R.B., Klein M., Dauben H.P., Moser C., Gams E., Scharf R.E.  
Prospective analysis after coronary-artery bypass grafting: Platelet GP IIIa  
polymorphism (HPA-1b/PI<sup>A2</sup>) is a risk factor for bypass occlusion, myocardial  
infarction, and death  
Thromb Haemost 2000; 83: S. 404-407
- [32] Carter A.M., Ossei-Gerning N., Wilson I.J., Grant P.J.  
Association of the platelet PI<sup>A</sup> polymorphism of glycoprotein IIb/IIIa and the  
fibrinogen B $\beta$  448 polymorphism with myocardial infarction and extent of  
coronary artery disease  
Circulation 1997; 96: S. 1424-1431

- [33] Goodall A.H., Curzen N., Panesar M., Hurd C., Knight C.J., Ouwehand W.H., Fox K.M.  
Increased binding of fibrinogen to glycoprotein IIIa-proline33 (HPA-1b, Pl<sup>A2</sup>, Zw<sup>b</sup>) positive platelets in patients with cardiovascular disease  
Eur Heart J 1999; 20: S. 742-747
- [34] Woods V.L., Wolff L.E., Keller D.M.  
Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins  
J Biol Chem 1986; 261: S. 15242-15251
- [35] Niiya K., Hodson E., Bader R., Byers-Ward V., Koziol J.A., Plow E.F., Ruggeri Z.M.  
Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation  
Blood 1987; 70: S. 475-483
- [36] McEver R.P., Baenziger J.U., Majerus P.W.  
Isolation and structural characterization of the polypeptide subunits of membrane glycoprotein IIb-IIIa from human platelets  
Blood 1982; 59: S. 80-85
- [37] Poncz M., Eisman R., Heidenreich R., Silver S.M., Vilaire G., Surrey S., Schwartz E., Bennett J.S.  
Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb  
J Biol Chem 1987; 262: S. 8476-8482
- [38] McEver R.P., Baenziger N.L., Majerus P.W.  
Isolation and quantitation of the platelet membrane glycoprotein deficient in thrombasthenia using a monoclonal hybridoma antibody  
J Clin Invest 1980; 66: S. 1311-1318
- [39] Ruoslahti E., Pierschbacher M.D.  
New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins  
Science 1987; 238: S. 491-497
- [40] Weisel J.W., Nagaswami C., Vilaire G., Bennett J.S.  
Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy  
J Biol Chem 1992; 267: S. 16637-16643

- [41] Farrell D.H., Thiagarajan P., Chung D.W., Davie E.W.  
Role of fibrinogen  $\alpha$  and  $\gamma$  chain sites in platelet aggregation  
Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: S. 10729-10732
- [42] Prasad K.S.S., Andre P., He M., Bao M., Manganello J., Phillips D.R.  
Soluble CD40 ligand induces  $\beta_3$  integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling  
Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: S. 12367-12371
- [43] Bray P.F.  
Integrin polymorphisms as risk factors for thrombosis  
Thromb Haemost 1999; 82: S. 337-344
- [44] von dem Borne A.E.G., Décarý F.  
Nomenclature of platelet-specific antigens  
Transfusion 1990; 30: S. 477
- [45] Newman P.J., Derbes R.S., Aster R.H.  
The human platelet alloantigens,  $Pl^{A1}$  and  $Pl^{A2}$ , are associated with a leucine<sup>33</sup>/proline<sup>33</sup> amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing  
J Clin Invest 1989; 83: S. 1778-1781
- [46] Müller-Berghaus G., Pötzsch B. (Hrsg.)  
Hämostaseologie - Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik  
Springer Berlin Heidelberg 1999; S. 99
- [47] Streifler J.Y., Rosenberg N., Chetrit A., Eskaraev R., Sela B.A., Dardik R., Zivelin A., Ravid B., Davidson J., Seligsohn U., Inbal A.  
Cerebrovascular events in patients with significant stenosis of the carotid artery are associated with hyperhomocysteinemia and platelet antigen-1 (Leu33Pro) polymorphism  
Stroke 2001; 32: S. 2753-2758
- [48] Ardissino D., Mannucci P.M., Merlini P.A., Duca F., Fève R., Tagliabue L., Tubaro M., Galvani M., Ottani F., Ferrario M., Corral J., Margaglione M.  
Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction  
Blood 1999; 94: S. 46-51
- [49] Walter D.H., Schächinger V., Elsner M., Dimmeler S., Zeiher A.M.  
Platelet glycoprotein IIIa polymorphisms and risk of coronary stent thrombosis  
Lancet 1997; 350: S. 1217-1219

- [50] Herrmann S-M., Poirier O., Marques-Vidal P., Evans A., Arveiler D., Luc G., Emmerich J., Cambien F.  
The leu33/pro polymorphism (PI<sup>A1</sup>/PI<sup>A2</sup>) of the glycoprotein IIIa (GPIIIa) receptor is not related to myocardial infarction in the ECTIM study  
Thromb Haemost 1997; 77: S. 1179-1181
- [51] Ridker P.M., Hennekens C.H., Schmitz C., Stampfer M.J., Lindpaintner K.  
PI<sup>A1/A2</sup> polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis  
Lancet 1997; 349: S. 385-388
- [52] Scaglione L., Bergerone S., Gaschino G., Imazio M., Maccagnani A., Gambino R., Cassader M., Di Leo M., Macchia G., Brusca A., Pagano G., Cavallo-Perin P.  
Lack of relationship between the PI<sup>A1</sup>/PI<sup>A2</sup> polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and premature myocardial infarction  
Eur J Clin Invest 1998; 28: S. 385-388
- [53] Böttiger C., Kastrati A., Koch W., Mehilli J., Seidl H., Schömig K., von Beckerath N., Schömig A.  
HPA-1 and HPA-3 polymorphisms of the platelet fibrinogen receptor and coronary artery disease and myocardial infarction  
Thromb Haemost 2000; 83: S. 559-562
- [54] Durante-Mangoni E., Davies G.J., Ahmed N., Ruggiero G., Tuddenham E.G.  
Coronary thrombosis and the platelet glycoprotein IIIa gene PI<sup>A2</sup> polymorphism  
Thromb Haemost 1998; 80: S. 218-219
- [55] Samani N.J., Lodwick D.  
Glycoprotein IIIa polymorphism and risk of myocardial infarction  
Cardiovasc Res 1997; 33: S. 693-697
- [56] Scharf R.E., Zotz R.B.  
Blood platelets and myocardial infarction: Do hyperactive platelets really exist?  
Transfus Med Hemother 2006; 33: S. 189-199
- [57] Sajid M., Vijayan K.V., Souza S., Bray P.F.  
PI<sup>A</sup> polymorphism of integrin  $\beta_3$  differentially modulates cellular migration on extracellular matrix proteins  
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002; 22: S. 1984-1989

- [58] Stoldt V.R., Peveling J., Loncar R., Beck A., Aurich V., Scharf R.E.  
Evaluation of platelet thrombus formation under flow  
Blood 2005; 106: S. 3954
- [59] Zotz R.B., Winkelmann B.R., Müller C., Boehm B.O., März W., Scharf R.E.  
Association of polymorphisms of platelet membrane integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (HPA-1b/PI<sup>A2</sup>) and  $\alpha_2\beta_1$  ( $\alpha_2807TT$ ) with premature myocardial infarction  
J Thromb Haemost 2005; 3: S. 1522-1529
- [60] Vijayan K.V., Goldschmidt-Clermont P.J., Roos C., Bray P.F.  
The PI<sup>A2</sup> polymorphism of integrin  $\beta_3$  enhances outside-in signaling and adhesive functions  
J Clin Invest 2000; 105: S. 793-802
- [61] Meiklejohn D.J., Urbaniak S.J., Greaves M.  
Platelet glycoprotein IIIa polymorphism HPA 1b (PI<sup>A2</sup>): No association with platelet fibrinogen binding  
Brit J Haematol 1999; 105: S. 664-666
- [62] Bennett J.S., Vilaire G., Catella-Lawson F., Rut A.R., FitzGerald G.  
The PIA2 alloantigen does not alter the affinity of GPIIb-IIIa for fibrinogen or RGD-containing peptides  
Blood 1997; 90: S. 154a
- [63] 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., Kundu S., Bray P.F.  
Platelet GP IIIa PI<sup>A</sup> polymorphisms display different sensitivities to agonists  
Circulation 2000; 101: S. 1013-1018
- [64] Feng D.L., 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., Muller J.E., Myers R.H., Levy D., Tofler G.H.  
Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa PI<sup>A2</sup> polymorphism  
The Framingham offspring study  
Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: S. 1142-1147
- [65] Dise C.A., Burch J.W., Goodman D.B.P.  
Direct interaction of mepacrine with erythrocyte and platelet membrane phospholipid  
J Biol Chem 1982; 257: S. 4701-4704

- [66] Müller-Berghaus G., Pötzsch B. (Hrsg.)  
Hämostaseologie - Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie  
und Klinik  
Springer Berlin Heidelberg 1999; S. 65
- [67] Grabowski E.F.  
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 1990; 75: S. 390-398
- [68] Skaer R.J., Flemans R.J., McQuilkan S.  
Mepacrine stains the dense bodies of human platelets and not platelet lysosomes  
Brit J Haematol 1981; 49: S. 435-438
- [69] Wall J.E., Buijs-Wilts M., Arnold J.T., Wang W., White M.M., Jennings L.K.,  
Jackson C.W.  
A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of  
platelet dense granule contents  
Brit J Haematol 1995; 89: S. 380-385
- [70] Robinson M., Machin S., Mackie I., Harrison P.  
In vivo biotinylation studies: Specificity of labelling of reticulated platelets by  
thiazole orange and mepacrine  
Brit J Haematol 2000; 108: S. 859-864
- [71] Lorez H.P., Da Prada M., Rendu F., Pletscher A.  
Mepacrine, a tool for investigating the 5-hydroxytryptamine organelles of blood  
platelets by fluorescence microscopy  
J Lab Clin Med 1977; 89: S. 200-206
- [72] Da Prada M., Pletscher A.  
Accumulation of basic drugs in 5-hydroxytryptamine storage organelles of  
rabbit blood platelets  
Eur J Pharmacol 1975; 32: S. 179-185
- [73] Read N.G., Trist D.G.  
The uptake of mepacrine by horse polymorphonuclear leucocytes in vitro  
J Pharm Pharmacol 1982; 34: S. 711-714

- [74] Balasubramanian V., Grabowski E., Bini A., Nemerson Y.  
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 2002; 100: S. 2787-2792
- [75] Greco N.J., Tenner T.E. Jr., Tandon N.N., Jamieson G.A.  
PPACK-thrombin inhibits thrombin-induced platelet aggregation and  
cytoplasmic acidification but does not inhibit platelet shape change  
Blood 1990; 75: S. 1983-1990
- [76] Kettner C., Shaw E.  
D-Phe-Pro-ArgCH<sub>2</sub>Cl – A selective affinity label for thrombin  
Thromb Res 1979; 14: S. 969-973
- [77] Lyon M.E., Fine J.S., Henderson P.J., Lyon A.W.  
D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone (PPACK): Alternative  
anticoagulant to heparin salts for blood gas and electrolyte specimens  
Clin Chem 1995; 41: S. 1038-1041
- [78] Savage B., Shattil S.J., Ruggeri Z.M.  
Modulation of platelet function through adhesion receptors  
J Biol Chem 1992; 267: S. 11300-11306
- [79] Müller-Berghaus G., Pötzsch B. (Hrsg.)  
Hämostaseologie - Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie  
und Klinik  
Springer Berlin Heidelberg 1999; S. 285-286
- [80] Karow T., Lang-Roth R.  
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie -  
Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden 2004  
Eigenverlag Pulheim 2004; S. 302-304
- [81] Loncar R.  
Functional relevance of HPA-1 and  $\alpha_2$  807C/T platelet receptor polymorphisms  
under standardized in-vitro blood flow conditions  
Universität Düsseldorf, Medizinische Fakultät, Habilitationsschrift, 2006

- [82] Reiner A.P., Kumar P.N., Schwartz S.M., Longstreth W.T. Jr., Pearce R.M., Rosendaal F.R., Psaty B.M., Siscovick D.S.  
Genetic variants of platelet glycoprotein receptors and risk of stroke in young women  
Stroke 2000; 31: S. 1628-1633
- [83] Roest M., Banga J.D., Grobbee D.E., de Groot P.G., Sixma J.J., Tempelman M.J., van der Schouw Y.T.  
Homozygosity for 807 T polymorphism in  $\alpha_2$  subunit of platelet  $\alpha_2\beta_1$  is associated with increased risk of cardiovascular mortality in high-risk women  
Circulation 2000; 102: S. 1645-1650
- [84] Zaidi T.N., McIntire L.V., Farrell D.H., Thiagarajan P.  
Adhesion of platelets to surface-bound fibrinogen under flow  
Blood 1996; 88: S. 2967-2972
- [85] Müller-Berghaus G., Pötzsch B. (Hrsg.)  
Hämostaseologie - Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik  
Springer Berlin Heidelberg 1999; S. 29
- [86] HPA-1 polymorphism of  $\alpha_{IIb}\beta_3$  modulates platelet adhesion onto immobilized fibrinogen in an in-vitro flow system  
Loncar R., Stoldt V., Hellmig S., Zotz R.B., Mihalj M., Scharf R.E.  
Thromb J 2007; 5: S. 2
- [87] Steering committee of the physicians' health study research group  
Final report on the aspirin component of the ongoing physicians' health study  
N Engl J Med 1989; 321: S. 129-135
- [88] Lewis H.D.Jr., Davis J.W., Archibald D.G., Steinke W.E., Smitherman T.C., Doherty J.E.III., Schnaper H.W., LeWinter M.M., Linares E., Pouget J.M., Sabharwal S.C., Chesler E., DeMots H.  
Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina  
Results of a Veterans Administration Cooperative Study  
N Engl J Med 1983; 309: S. 396-403
- [89] The RISC Group  
Risk of myocardial infarction and death during treatment with low dose aspirin and intravenous heparin in men with unstable coronary artery disease  
Lancet 1990; 336: S. 827-830

- 
- [90] Karow T., Lang-Roth R.  
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie -  
Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden 2004  
Eigenverlag Pulheim 2004; S. 299
- [91] Karow T., Lang-Roth R.  
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie -  
Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden 2004  
Eigenverlag Pulheim 2004; S. 552-553
- [92] Cooke G.E., Bray P.F., Hamlington J.D., Pham D.M., Goldschmidt-Clermont  
P.J.  
P1<sup>A2</sup> polymorphism and efficacy of aspirin  
Lancet 1998; 351: S. 1253
- [93] Wheeler G.L., Braden G.A., Bray P.F., Marciniak S.J., Mascelli M.A., Sane  
D.C.  
Reduced inhibition by abciximab in platelets with the P1<sup>A2</sup> polymorphism  
Am Heart J 2002; 143: S. 76-82

## **Danksagung**

Diese Arbeit wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 612, Teilprojekt B2).

Ich möchte an dieser Stelle den Personen, die mich bei der Erstellung der Arbeit unterstützt haben, meinen herzlichen Dank ausdrücken.

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Rüdiger Eberhard Scharf, für die Überlassung des Themas, Diskussionsbereitschaft und Korrektur der Dissertation.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Dr. Robert Loncar und Herrn Dr. Volker Stoldt für ihre fachliche Beratung, Anleitung und Hilfestellung bei der Durchführung der Experimente, sowie bei Frau Beate Maruhn-Debowski und Frau Bianka Weingart für ihre große Hilfsbereitschaft.

Zu guter Letzt möchte ich den wichtigsten drei Personen in meinem Leben danken:

Zum einen meinem Ehemann Stefan, der immer für mich da ist und der besonders in den letzten Monaten eine unendliche Geduld mit mir hatte.

Zum anderen meinen Eltern Ingrid und Günter Hellmig, die mich immer unterstützt haben und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und stehen.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Sabine Opalka, geb. Hellmig

Geburtsdatum: 15.02.1979

Geburtsort: Bochum

## Schule

1985 bis 1989 Gemeinschaftsgrundschule Borgholzschule, Bochum

1989 bis 1998 Schiller-Gymnasium, Bochum

## Beruflicher Werdegang

10/1998-03/1999 Ausbildungszeit an der Schule für Medizinisch-technische Assistenten an den berufsgenossenschaftlichen Kliniken „Bergmannsheil“, Bochum

04/1999-05/2006 Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

03/2001 Ärztliche Vorprüfung

03/2002 Erstes Staatsexamen

08/2004 Zweites Staatsexamen

04/2005-05/2006 Praktisches Jahr in Stoke on Trent/Großbritannien (North Staffordshire Hospital) und Düsseldorf (Marienhospital)

05/2006 Drittes Staatsexamen

Seit 07/2006 Assistenzärztin der Inneren Medizin, Klinikum Dortmund Mitte