

Aus dem Institut für Hämostaseologie, Hämotherapie und Transfusionsmedizin der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger E. Scharf

Modell zur Charakterisierung der Micromobilität von Thrombozyten an Kollagen I unter  
arteriellen Strömungsbewegungen in der Strömungskammer.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf  
vorgelegt von

Aksel Hansen

Jahr der Promotion: 2016

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

Gez.:

Dekan: Univ. Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Hohlfeld

Zweitgutachter: Prof. Dr. Rainer Haas

# Inhalt

1.	Einleitung .....	5
1.1.	Grundlagen .....	5
1.2.	Virchow-Trias .....	5
1.2.1.	Entstehung .....	5
1.2.2.	Blutfluss .....	6
1.2.3.	Gefäßwand .....	7
1.2.4.	Hyperkoagulabilität durch veränderte Blutzusammensetzung.....	7
1.3.	Grundlagen der Thrombozytenfunktion.....	7
1.3.1.	Thrombozytenaktivierung .....	8
1.3.2.	Thrombozytenformveränderung unter Scherstress .....	10
1.4.	Integrin $\alpha_2\beta_1$ .....	12
1.4.1.	Polymorphismus des $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptors .....	13
1.4.2.	Grundlagenstudien .....	14
1.5.	Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit.....	16
2.	Material und Methoden .....	17
2.1	Herkunft des Bildmaterials.....	17
2.1.1.	Probanden.....	17
2.1.2.	Flusseexperimente.....	17
2.1.3.	Bildakquisition .....	18
2.2.	Bildverarbeitung.....	19
2.3.	Statistik.....	20
2.3.1.	Auswertung der Multitrackerergebnisse .....	21
2.3.2.	Regressionsgeradenauswertungen.....	21
2.3.3.	Chi-Quadrattests.....	21
2.3.4.	Die empirische Verteilungsfunktion .....	22
2.3.5.	Auswertung der geometrischen Mittel mit Hilfe des Wilcoxon-Mann- Whitney- Tests	22
3.	Ergebnisse .....	23
3.1.	Grundlagen .....	23
3.2.	Ergebnisse des Multitrackerprogramms .....	25
U Test	Ergebnis .....	26
3.3.	Regressionsgeradenberechnung .....	27
3.3.1.	Modifizierung der Berechnungsgrundlagen.....	28
3.4.	Ergebnisse des Chi-quadrat-Test.....	29
3.4.1.	Area/Fläche .....	29
3.4.2.	Höhe .....	29
3.4.3.	Länge.....	30

3.5. Ergebnisse der empirischen Verteilungsfunktion .....	31
4. Diskussion .....	34
5. Literaturliste .....	38
6. Zusammenfassung .....	47
7. Danksagung .....	48
8. Abkürzungsverzeichnis .....	49

# 1. Einleitung

## 1.1. Grundlagen.

Kardiovaskuläre Erkrankungen stehen an erster Stelle der Todes-Ursachenstatistik in der Bundesrepublik Deutschland (1). Im Jahre 2009 erlag mit einem Anteil von 45 % an der Gesamtmortalität knapp die Hälfte der Verstorbenen an einer Erkrankung aus diesem Formenkreis, also vor allem hypertensiven Kreislaufkrankungen, ischämischen Herz- und cerebrovaskulären Erkrankungen und peripheren arteriellen Durchblutungsstörungen.

Thrombozyten spielen in der Pathophysiologie dieser mit arteriosklerotischen Veränderungen assoziierten Krankheitsbilder eine entscheidende Rolle, so dass diese Zellen schon seit Jahrzehnten im Fokus der Forschung stehen. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Medikamenten entwickelt, die beispielsweise in der Therapie des akuten Myokardinfarktes (MI) eingesetzt werden und speziell die Aktivität der Blutplättchen inhibieren. Epidemiologische Studien (2) lassen vermuten, dass diese Erkrankungen aus einer komplexen Interaktion zwischen genetischen Faktoren, chronischen Umwelteinflüssen (z.B. hormonelles Ungleichgewicht, Rauchen, Übergewicht) und erworbenen Krankheiten (z.B. Diabetes, Bluthochdruck oder Dyslipidämie) entstehen. Die schwerste Komplikation dieser Erkrankungen ist der akute MI oder Schlaganfall, die aus dem thrombotischen Verschluss an der Stelle eines rupturierten arteriosklerotischen Plaque resultiert.

Als Risikofaktoren haben sich Adipositas, Rauchen, Diabetes Mellitus und arterielle Hypertonie schon seit längerer Zeit etabliert. In jüngster Zeit stehen thrombozytäre Rezeptorpolymorphismen im Blickpunkt des Interesses (50).

## 1.2. Virchow-Trias.

### 1.2.1. Entstehung

Die virchowsche Trias besteht aus drei wesentlichen ätiologischen Faktoren, die bei der Thrombogenese eine Rolle spielen (52, 51):

- 1.) Blutfluss
- 2.) Gefäßwandläsion
- 3.) Hyperkoagulabilität.

Dieses Konzept wurde zunächst für die Entstehung von venösen Thromben beschrieben, besitzt jedoch auch bei der Entstehung von arteriellen Thromben Gültigkeit (53). In letzter Zeit wurden diese beiden Thromboseformen nicht mehr als streng getrennte Krankheitsbilder aufgefasst (53).

Eine zeitgemäße Darstellung dieser Trias sollte weitere Faktoren mit berücksichtigen: Entzündungsreaktionen, Arteriosklerose und endotheliale Dysfunktionen, Veränderung des Blutflusses an Bifurkationen und Stenosen sowie Rezeptorpolymorphismen, welche ihrerseits die Thrombozytenfunktionen beeinflussen können. Die venöse Thrombose wird traditionell als roter Thrombus mit Erythrozyten und Fibrin beschrieben. Die arterielle Thrombose am Ort einer arteriosklerotischen Läsion wird als thrombozytenreicher, weißer Thrombus dargestellt. Untersuchungen zeigten jedoch im „Kopfbereich“ venöser Thromben thrombozytenreiche Areale, während auf der anderen Seite Zusammenhänge zwischen Arteriosklerose und venösen Thrombosen entdeckt wurden (54, 55). Ein neueres Konzept (108) stellt neutrophile

Granulozyten in den Mittelpunkt des Interesses. Unter experimentellen Bedingungen wurde bei Mäusen und Pavianen eine venöse Stase generiert und die nachfolgenden Prozesse untersucht. Venöse Stase führt zu einer Hypoxie (109), welches eine Thrombogenese unterstützen und das Endothel aktiviert könnte. Fuchs et al. zeigten, dass es bei einer venösen Stase in Mäusen es zu einer Freisetzung des vWf kommt und dies wiederum zu einer Aktivierung von Thrombozyten führt (110). Neben den Thrombozyten sind neutrophile Granulozyten von zentraler Bedeutung (110). Thrombozyten und Endothelzellen können P-Selectin freisetzen, welches dann neutrophile Granulozyten rekrutiert (108). Neutrophile Granulozyten können in Rahmen von Entzündungsprozessen extrazelluläre DNS freisetzen. Dies kann Mikroben durch ein Gerüst aus intakten Chromatinfasern und antimikrobiellen Substanzen binden (112). Dieses Gerüst wird dann als „Neutrophil Extracellular Trap“, abgekürzt NET bezeichnet. Diese NET's können allerdings auch die Plättchenadhäsion und Koagulation stimulieren (108).

Im Nachfolgenden werden Determinanten erläutert, die Einfluss auf die Entwicklung einer Thrombose haben, da sie eine Relevanz für das experimentelle Design haben.

### **1.2.2. Blutfluss**

In einem Blutgefäß ist die Geschwindigkeit der zirkulierenden Blutzellen und der übrigen Bestandteile im Zentrum höher als an der Gefäßwand. Auf diese Weise entstehen mehrere intraluminale Schichten mit Zellen ähnlicher Flussgeschwindigkeit, welche sich in der Geschwindigkeit unterscheiden. In den Blutgefäßen mit einem geringeren Durchmesser, in denen die Geschwindigkeit nur noch indirekt von der Kontraktion des Herzens abhängt, verhält sich das Blut wie eine Newton'sche Flüssigkeit mit einem laminären Flussverhalten (55). Benachbarte Schichten (Laminae) fließen also parallel mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Der Geschwindigkeitsunterschied ist durch einen Schereffekt hervorgerufen. Mit der Scherrate, welche die Dimension  $s^{-1}$  (reziproke Sekunde) hat, wird der resultierende Geschwindigkeitsgradient beschrieben. Die entstehende Schubspannung an der Gefäßwand, welche durch das vorbeifließende Blut verursacht wird, und auch auf die zellulären Bestandteil wirkt, wird durch den Scherstress definiert (113). Die Scherrate ist direkt proportional zum Scherstress (13). Dieser Scherstress überträgt sich folglich auf die zellulären Bestandteile, seien sie mobil oder adhärent (13). Durch diesen Scherstress wird eine Plättchenaggregation durch ADP-Freisetzung und Bindung von vWF induziert. Weiterhin führt er zu intrathrombozytären Signalvorgängen mit starkem Anstieg des cytoplasmatischen Calciums und beeinflusst die Endothelfunktion (14, 15, 56). Die Scherkräfte sind zudem proportional zur Kollisionsfrequenz von Zellen untereinander, was rein statistisch schon Bindungsvorgänge mit steigender Scherrate wahrscheinlich macht.

Unter Strömungsgeschwindigkeiten, wie sie in arteriellen Gefäßen herrschen, werden die Thrombozyten durch einen Prozess, der sich axiale Migration nennt, an die Endothelschicht gedrückt, welches eine Akkumulation der Thrombozyten an der Gefäßwand begünstigt, während Erythrozyten in der Gefäßmitte konzentriert werden (82, 83).

Weiterhin beeinflussen schwankende Scherraten und Wirbelbildung das Endothel. Sie können zu einer Dysfunktion des Endothels über die Beeinflussung der Genexpressionen z.B. des Endothelins-1, eNOS oder COX-2 führen (62, 66). Als Folge kann es unter anderem zu einer verminderten Freisetzung von vasorelaxierenden Faktoren kommen.

### **1.2.3. Gefäßwand**

Die Arteriosklerose hat eine entscheidende pathogenetische Bedeutung als Gefäßwandfaktor. Die genaue Pathogenese der Arteriosklerose ist ein komplexer und ein noch nicht vollständig geklärter Prozess. Nach Jahrzehnten der Forschung haben sich zwei Hypothesen herausgebildet, die die Initiierung des Prozesses der Arteriosklerose beschreiben. Auf der einen Seite „Response-to-injury“-Hypothese von Russell Ross (60) und auf der anderen Seite die „Lipoprotein-induced-atherosclerosis“-Hypothese von Joseph Leonard Goldstein (61).

Diese Gefäßwandschädigungen laufen in mehreren Stadien ab, beginnend mit einer Störung der endothelialen Funktion (58). Unter physiologischen Bedingungen setzen Endothelzellen vasodilatative Substanzen frei und tragen dazu bei, eine Fibrindisposition, Thrombozytenaggregation und –aktivierung zu verhindern und die Thrombinentstehung zu inhibieren. Unter anderem werden vom Endothel Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) und Stickstoffmonoxid (NO) gebildet, welche neben einer Vasodilatation auch eine Plättchenthrombenbildung hemmen. Des Weiteren werden unter physiologischen Bedingungen entzündliche Reaktionen wie die Leukozytenadhäsion und die Freisetzung von freien Radikalen gebremst (58).

Endothelschädigungen durch die arteriosklerotischen Prozesse äußern sich in einer Endotheldysfunktion und führen zu Entzündungsreaktionen, die durch verschiedene Proteine (z.B. COX 2) und Zytokine (z.B. TNF- $\alpha$ ) mediiert werden. Dies kann zu einer Adhäsion und Migration von Leukozyten in das Endothel führt (63, 65). Weiterhin entscheidend für die Progression der Arteriosklerose ist neben der Endotheldysfunktion, auch die Akkumulierung und Oxidation von LDL-Partikeln in der Intima (64).

Durch proteolytische Enzyme und Metalloproteinasen wird der Plaque brüchig und kann rupturieren. Dieser Vorgang setzt massenhaft thrombogenes Gefäßwandmaterial (Tissue factor, Kollagen, sukzessiv Fibrinogendepositionen und Zellanteile) und Gewebsthromboplastin frei. Dieses kann über einen thrombotischen Gefäßverschluss z.B. zu einem Myokardinfarkt oder einem Apoplex führen (10, 105).

### **1.2.4. Hyperkoagulabilität durch veränderte Blutzusammensetzung**

Die Hämostase ist ein fein ausbalanciertes Gleichgewicht zwischen prokoagulatorischen und fibrinolytischen Abläufen. Die Fibrinolyse ist in erster Linie beeinflusst durch die Interaktion zwischen Plasminogenaktivatoren (z.B. Tissue-plasminogenaktivator) und Inhibitoren (z.B. Plasminogen activator inhibitor), welche die Aktivität steuern (52).

## **1.3. Grundlagen der Thrombozytenfunktion**

Thrombozyten sind die kleinsten korpuskulären Bestandteile des zirkulierenden Blutes. Sie entstehen als Abschnürungen des Zytoplasmas von Megakaryozyten im Knochenmark und werden dann ins periphere Blut ausgeschwemmt. Sie haben einen Durchmesser von 2-4  $\mu\text{m}$  und besitzen im Unterschied zu anderen eukaryoten Zellen keinen Zellkern, sie werden deshalb als „anukleäre Zellen“ bzw. Blutplättchen bezeichnet (11). Einer der wichtigsten Funktionen der Thrombozyten besteht darin, bei Gefäßwandverletzungen ein Austreten des Blutes aus dem Gefäßsystem zu verhindern. Dies geschieht durch Abdichtung des Defektes und Bildung eines hämostatischen Pfropfes, wodurch Hämostase resultiert (11). Diese Hämostase kann in eine primäre und sekundäre differenziert werden. Bei der primären Hämostase kommt es zu einer Vasokonstriktion und zur Bildung eines Plättchenthrombus. Dieser Plättchenthrombus entsteht durch die Adhäsion der Thrombozyten an freiliegenden extrazellulären Matrices, wie z.B. Kollagen, Laminin, von-Willebrand-Faktor oder Fibronectin, und die darauf folgende Aktivierung und Aggregation weiterer Thrombozyten. Diese Aktivierung bewirkt eine Formveränderung, auf die im Kapitel 1.3.1 weiter

eingegangen wird, und die Ausschüttung von intrathrombozytären Granulainhaltsstoffen wie z.B. ADP/ATP, GDP/GTP, Serotonin und Calcium (68). Bei der sekundären Hämostase kommt es zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade (11). Hierbei wird Prothrombin in Thrombin umgewandelt, welches wiederum Fibrin aus Fibrinogen bildet und seinerseits den Thrombus weiter verfestigt (10).

In Abhängigkeit von den Strömungsverhältnissen, welche dann auch die Scherkräfte beeinflussen, dominieren verschiedene Mechanismen der Hämostase (7, 12, 57). Bei Scherraten von über  $1000 \text{ s}^{-1}$  dominiert die thrombozytäre Komponente (68), dies wird in Kapitel 3.1. dargestellt. Bei der arteriellen Thrombogenese haben die Thrombozyten eine zentrale Rolle. Während bei sehr niedrigen Scherraten ( $50 \text{ s}^{-1}$ ), wie sie im venösen System herrschen Blutgerinnsel größtenteils aus Fibrin bestehen, sind Thrombozyten bei Strömungsbedingungen von über  $1000 \text{ s}^{-1}$ , wie sie in stenosierten Arterien z.B. bestehen, der beherrschende Anteil (12).

Die Thrombozyten sind auch an der Pathogenese der Arteriosklerose und der Hämostase beteiligt.

### ***1.3.1. Thrombozytenaktivierung***

Die Plättchen können freiliegende subendotheliale Strukturen, wie Kollagene, immobilisierten vWF, elastische Fibrillen, Fibronectin und Laminin über verschiedene Mechanismen erkennen und leiten die ersten Schritte der Hämostase ein (105). Des Weiteren können die Thrombozyten durch einen spezifischen Rezeptor an den Von-Willebrand-Faktor andocken. Im normalen, physiologisch zirkulierenden Blut sind die Plättchen in einem nicht-adhärenenten ruhenden Status und werden durch die Interaktion der Plättchen mit den vorbeschriebenen Strukturen aktiviert. Die Plättchen sind in diesem aktivierten Zustand „klebrig“ und können nun unter anderem an Kollagen haften bleiben. Diese Fähigkeit zur regulierten Aktivierung ist wichtig, da sie verhindert, daß die Plättchen nicht spontan in einem Gefäß adhären und zu einem Thrombus aggregieren und so z.B. zu einem Myocardinfarkt oder einer Apoplexie führen (75).

Die Signalkaskade, die während der Aktivierung abläuft und zu einem Fibrin-Plättchenthrombus führt, kann in 7 Phasen unterteilt werden (115, Abb.1):

1. Zirkulierendes Fibrinogen oder vWF interagiert mit freiliegenden subendothelialen Strukturen wie Kollagen. Dies führt zu einer Immobilisierung und zu einer Konformationsänderung dieser Agonisten.
2. Interaktion der Agonisten mit ihren jeweiligen Plättchenrezeptoren und Anheftung der Plättchen. Diese Rezeptoren sind z.B. der GPIIb $\alpha$ - Rezeptor des GPIIb-IX-V-Komplexes, welcher vWF bindet, GPVI oder das Integrin  $\alpha_2\beta_1$ , welche als Rezeptoren für Kollagen fungieren.
3. Aufgrund der multiplen Rezeptor-Ligandeninteraktionen werden multiple Signalkaskaden aktiviert und ein Outside-In-Signaling findet statt.
4. Expression des aktivierten GPIIb-IIIa Rezeptor an der Oberfläche des Thrombozyten, welcher als Rezeptor für multiple Liganden fungiert.
5. Bindung von adhäsiven Liganden aus dem Plasma (vWF und Fg) durch den aktivierten GPIIb-IIIa Rezeptor und nachfolgende Plättchenaggregation.



6. Sekretion und Freisetzung von stimulierenden Granulainhalten oder –metaboliten, wie z.B. ADP, Serotonin, und Thromboxane A<sub>2</sub>.
7. Die Oberfläche des Thrombozyten entwickelt prokoagulatorische Aktivität, welches in Thrombinbildung und zur Fibrinbildung führt.

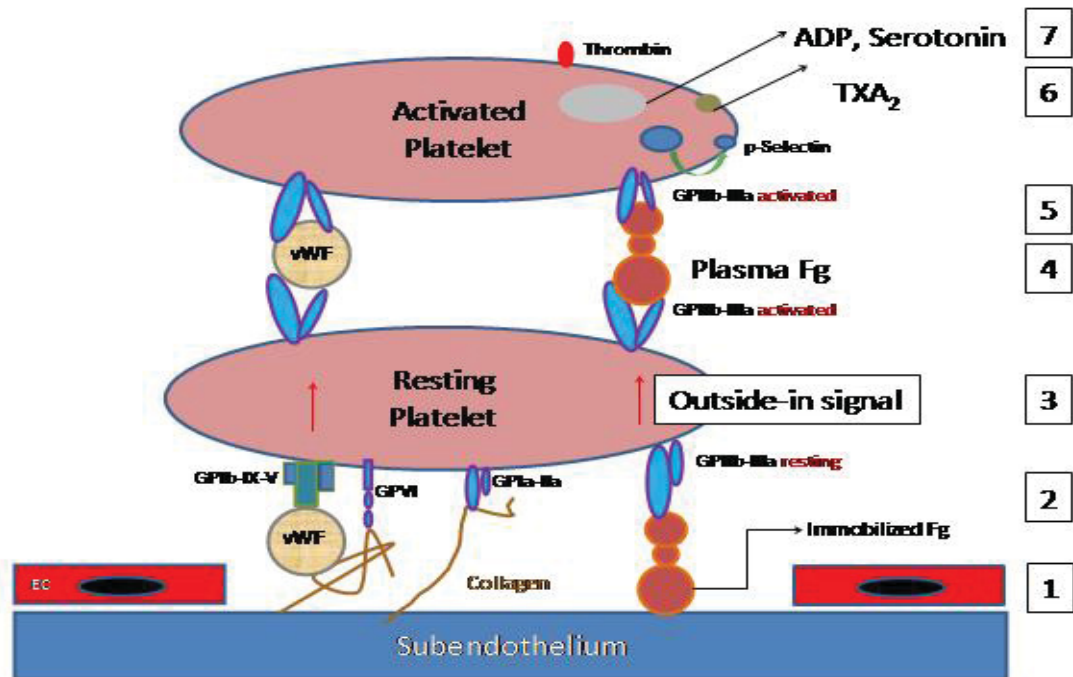


Abb.1: Rekrutierung und Aktivierung von zirkulierenden Thrombozyten nach Gefäßverletzung. Die Ziffern werden im Kapitel 1.3.1 erklärt. Aus Scharf 2004 (115)

Die Plättchenaktivierung ist ein dynamischer Prozess mit mehreren Feedbackschleifen und Cross-Talk zwischen den verschiedenen Signalwegen (72).

Unter anderem werden diese Mechanismen initiiert und beeinflusst durch die thrombozytären Membranglykoproteine. Diese Plättchenmembranglykoproteine lassen sich in vier Gruppen einteilen: Integrine, leuzinreiche Glykoproteine, Rezeptoren vom Immunglobulin-Typ und Selektine (10, 16).

Bei Scherraten, die in normalen oder stenotischen Arteriolen herrschen, benötigen Thrombozyten für die initiale Adhäsion eine Interaktion zwischen Von-Willebrand-Faktor (vWF), welches auf Kollagen immobilisiert wird, und dem Glykoprotein GPIb-V-IX (7, 69). Dieser initiale Kontakt führt zu keiner stabilen Adhäsion der Thrombozyten, sondern lediglich zu einem kurzen „Festhaken“ (22, 80), dem Tethering. Nach dem die Plättchen aktiviert wurden, verändern sie ihre Form mit Ausbildung von Filopodien (72). Dieser initiale Kontakt und das Festhalten der Thrombozyten wird in dieser Arbeit als Tethering bezeichnet. Dieses Tethering führt zu einer Kaskade von intrazellulären Aktivierungsvorgängen (26) und

anderem zu einer Aktivierung des Integrin  $\alpha_2\beta_1$  (Abb. 2). Diese Abbildung macht auch deutlich, dass die Aktivierungskaskaden parallel erfolgen.

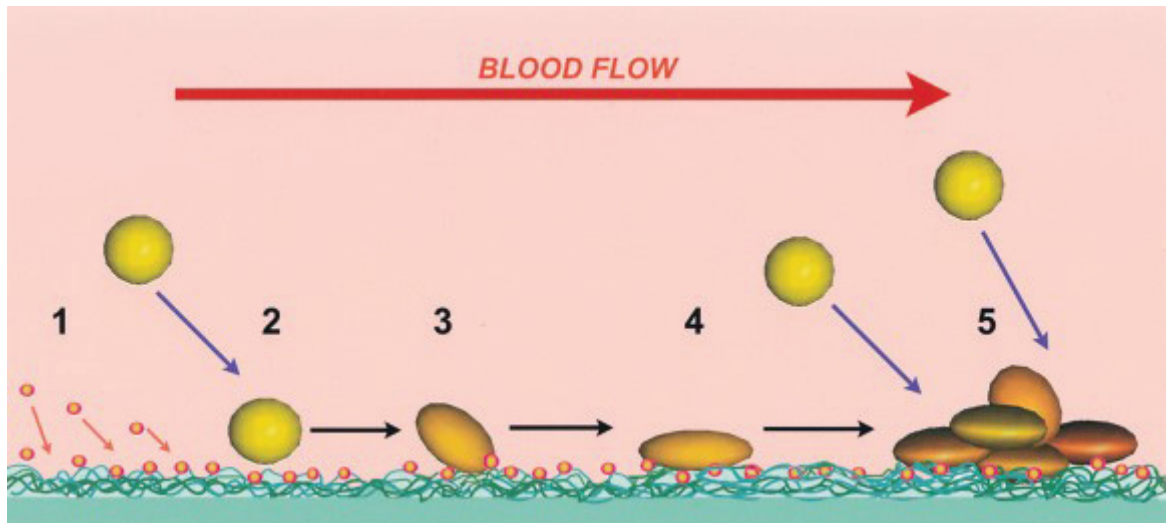


Abb.2. 1.) vWF bindet an Kollagen  
 2.) Thrombozyten haben Kontakt mit vWF oder Kollagen über verschiedene Rezeptoren, wie z.B. GPIb-V-IX, GP VI oder Integrin  $\alpha_2\beta_1$   
 3.-4.) Festes Adhärenz der Thrombozyten u.a. über Aktivierung von Integrin  $\alpha_2\beta_1$   
 5.) Ausbildung eines Thrombus  
 Aus Jung /Moroi: Activation of the Platelet Collagen Receptor Integrin  $\alpha_2\beta_1$  (17)

Dieses Tethering verringert die Geschwindigkeit zirkulierender Thrombozyten (80). Allerdings ist die Affinität der Bindung von von Willebrand Faktor (vWF) und dem Glykoprotein GPIb-V-IX nicht hoch genug, um ihnen eine permanente Adhäsion zu vermitteln (22).

Die Thrombozyten werden entweder abgerissen und strömen weiter im Blut oder bewegen sich weiter an der thrombogenen Oberfläche (80). Diese Bewegung wird einerseits hervorgerufen durch aktive Vorgänge des Thrombozyten (24, 80, Kap 1.3.2) und andererseits durch die auf ihn einwirkenden Scherkräfte.

Da dieser Vorgang nur unzureichend mit Adhäsion oder Tethering beschrieben wird, wird diese Bewegung in dieser Arbeit als Micromobilität bezeichnet.

### 1.3.2. Thrombozytenformveränderung unter Scherstress

Der Kontakt mit thrombogenen Oberflächen insbesondere unter Flussbedingungen hat enorme Auswirkungen auf die Form eines Thrombozyten. Der Glykoprotein GPIb-V-IX-Rezeptor spielt eine Schlüsselrolle in der Adhäsion von Thrombozyten an Stellen von Gefäßschäden. Der Rezeptor bindet über seine A1-Domäne an immobilisiertem vWF (80). Diese Verbindung im Englischen „Bond“ genannt, hat nur eine kurze Halbwertszeit und kann keine irreversible Adhäsion bewerkstelligen. Durch die Scherkräfte des Blutes wird der Thrombozyt abgeschert und weiter über die thrombogene Oberfläche transportiert, bis eine stabile Adhäsion durch andere Rezeptoren, die durch die verschiedene Signalwege aktiviert worden sind (siehe Kapitel 1.3.1), zustande kommt (7).

Dieser initiale Anker der Thrombozytenmembran wurde von Reininger et al. als Discrete Adhesion Point, abgekürzt DAP, beschrieben (26). Diese DAP's bleiben stationär, während

der Rest des Thrombozytenkörpers weiter abgeschert wird, ähnlich einem landenden Flugzeug auf dem Flugzeugträger (Abb.3).



Abb.3 Tethering („Festhaken“) am Modell eines landenden Kampffjets (F-18) auf einem Flugzeugträger. Quelle: NASA/USA

Dies führt zu Ausbildungen von so genannten Tethers (81). Dies sind Ausziehungen der Thrombozytenmembran.

Weiterhin besitzt der GPIIb-V-IX-Komplex die Fähigkeit, nach Kontakt mit vWF, welches auf immobilisierten Kollagen fixiert ist, ein zytoskeletales Remodelling des Thrombozyten auszulösen (24). Im Thrombozyten bildet sich ein kontraktiles Element aus Aktin und Myosin, in dem beide Proteine polymerisieren. Dieses Gel umgibt zunächst die Zellorganellen und bewirkt die zentrale Zusammenlagerung der Organellen (103). Dieses zytoskeletale Remodelling wird vor allem durch zwei Proteinstrukturen hervorgerufen, einerseits Aktinstrukturen und andererseits Myosinstrukturen (103, 104). Aktin liegt zu 40% in Form von Filamenten in der Zelle vor. Nach Aktivierung formieren sich durch Polymerisierung zwei Aktinstrukturen, die filopodialen Bündel und die lamellipodialen Netzwerke (103). Die filopodialen Bündel sind Bündel von langen Filamenten, welche sich in die Spitzen der Filopodien erstrecken. Lamellipodien sind Ausläufer der Zellmembran. Die lamellipodialen Netzwerke bestehen aus orthogonal angeordneten kurzen polymerisierten Aktinfilamenten, welche die Lamellipodien netzwerkartig ausfüllen (103). Nach Aktivierung des Thrombozyten wird die leichte Kette des Myosins phosphoryliert, welches auf zwei Wegen geschehen kann: einerseits über einen  $\text{Ca}^{2+}$  /Calmodulinmedierten Weg und andererseits über einen  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Weg, welcher eine Rho-Kinasenaktivierung involviert (105).

Zusammenfassend kann man sagen, dass es zwei Komponenten sind, die die thrombozytäre Gestaltänderung hervorrufen. Einerseits die aktiven Vorgänge, unter anderem über die Aktin- und Myosinstrukturen und die Interaktion von vWF und GPIIb-V-IX und andererseits das passive Abscheren, hervorgerufen durch die Strömung. Die einwirkenden Scherkräfte setzen unter anderem intrazelluläres Calcium frei, was ebenfalls die zytoskeletale Reorganisation beeinflusst (26, 84). Der vormals diskusförmige Thrombozyt wird sphärisch, und es werden Filopodien und Tether ausgebildet (81). Diese Formveränderung hat Auswirkung auf die Fortbewegungsdynamik. Während z.B. flache diskusförmige Zellen nicht ideal für Rotationsbewegungen (z.B. Rollen) sind, sind sie geeignet für ein Gleiten. Durch die

Ausbildung von Pseudopodien wird die Geschwindigkeit des Thrombozyten stark reduziert (81). Dies führt zu weiteren adhäsiven Bindungen des Thrombozyten an der thrombogenen Oberfläche. Des Weiteren führt die Oberflächenvergrößerung zu einer Zunahme der Kontaktflächen des Thrombozyten, mit denen er dann mit Reaktionspartnern, wie z.B. adhäsive Proteine, subendothelialen Strukturen oder anderen zirkulierenden Thrombozyten interagieren kann (11).

Kuwahara et al. (49) belegen durch elektronenmikroskopische Aufnahmen diese Veränderung des Thrombozyten unter dem Einfluss Scherkräften (Abb.4).

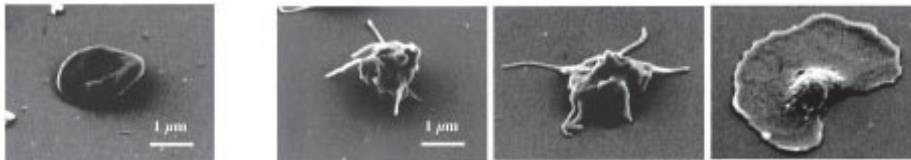


Abb. 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Bewegung eines Thrombozyten bei einer Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$  an immobilisiertem vWF. Aus Kuwahara et al. 2002 (49).

#### 1.4. Integrin $\alpha_2\beta_1$

Integrine sind heterodimere, transmembranäre Moleküle, welche aus nicht kovalent gebundenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheiten bestehen. Jede Untereinheit enthält typischerweise einen relativ großen extrazellulären Anteil (Kopfteil) und einen kurzen cytoplasmatischen Anteil (Schwanz) (Abb.5).

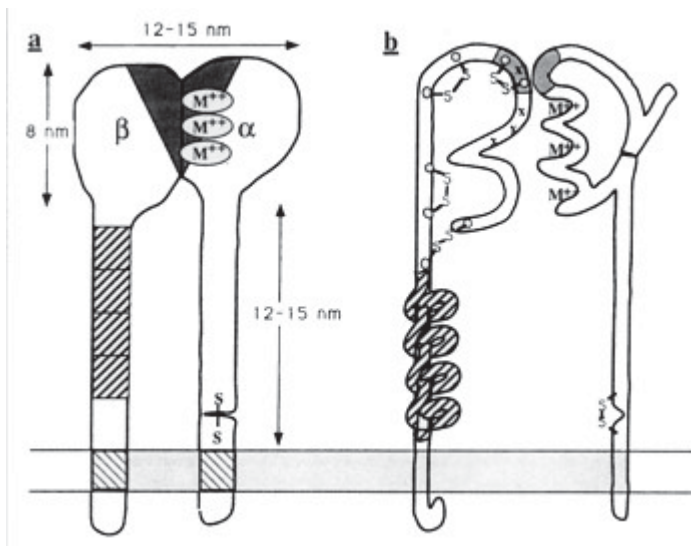


Abb.5: Integrinaufbau. **a** zeigt eine Repräsentation des Aufbaus, wie er elektronenmikroskopisch aufgedeckt worden ist: die Cystin-reichen repeats der  $\beta$ -Untereinheit (schraffiert) und die Metallbindungsstellen in der Untereinheit ( $M^{++}$ ). Der schwarz markierte Bereich repräsentiert die Liganden-Bindungsregion, die von beiden Untereinheiten gebildet wird. **b** zeigt den chemischen Aufbau der Polypeptid-Ketten. Nach Hynes (73).

Integrine vermitteln Zell-Zell- und Zellmatrixadhäsionen (74). Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten sind Produkte verschiedener Gene und werden auf der Membranoberfläche als eine funktionelle Einheit verbunden (77). Der Integrin  $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptor (auch GPIIb/IIIa genannt) für Kollagen findet sich auf verschiedenen Zelltypen, wie z.B. Megakaryozyten, Endothelzellen und Thrombozyten (74). Integrine können durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert

werden, wie z.B. Interaktion mit Kollagen, und können Signale von außen nach innen (Outside-in) und von innen nach außen übertragen (77). Der Ligand (z.B. Kollagen) kann, wenn er an den extrazellulären Anteil bindet, zu einer Aktivierung von intrazellulären Reaktionswegen führen. Dasselbe kann auch durch Adenosinphosphat (ADP), dort über thrombozytäre ADP-Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 geschehen (27, 16, 77, 100, 101).

Jung und Moroi (17, 75, 79, 100) haben die Mechanismen der Aktivierung des Integrin  $\alpha_2\beta_1$  genauer beschrieben. So wird das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  durch verschiedene intrazelluläre Signalmechanismen, welche die beiden ADP-Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 beinhaltet, von dem unten beschriebenen Zustand I, in dem der Integrinrezeptor nur niedrig gegenüber seinem Liganden ist, in den Zustand II aktiviert, in dem der Integrinrezeptor intermediär affin seinem Liganden gegenüber ist, welches keine Freisetzung von zyttoplasmatischem Kalzium erfordert und somit unabhängig ist von der Kalziummobilisierung (101). Die weitere Aktivierung des Integrin  $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptors vom Zustand II in den Zustand III, in dem der Integrinrezeptor hochaffin seinem Liganden gegenüber ist, erfolgt dann über eine weitere intrazelluläre Signalwege, welche z.B. PKC, Src kinasen, Phosphoinositid 3-Kinase oder eine Tyrosinphosphorylierung beinhalten (101, 102).

Der Integrin  $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptor selbst kann auch über die intrazellulären Signalwege, die z.B. über eine Tyrosinphosphorylierung laufen, aktivieren (5, 102). Dieser weitere Aktivierungsweg kann auch über eine extrazelluläre Interaktion mit Kollagen Typ I geschehen. Beide Mechanismen führen beim Integrin  $\alpha_2\beta_1$  zu einer Konformationsänderung. Dies wurde durch die Beobachtung unter experimentellen Bedingungen deduziert, dass die Thrombozyten in unterschiedlichem Maße Kollagen zu binden vermögen, abhängig von der aktivierenden Substanz. In in-vivo hängt die Kollagenbindungsfähigkeit von verschiedenen Faktoren ab, wie z.B. Anzahl der Integrin  $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptoren und anderen Kollagenrezeptoren wie z.B. Glykoprotein VI (27) So war die Menge an löslichen Kollagen, welches an Thrombozyten gebunden wurde größer, wenn die Thrombozyten durch Thrombin aktiviert worden waren im Vergleich zur Aktivierung durch ADP (77). Diese Veränderung führt zu drei verschiedenen Aktivierungszuständen (I-III), welche sich voneinander in einer unterschiedlichen Affinität für Kollagen (79, 77) unterscheiden.

- I. Geschlossener (niedrig affinerer) Zustand. Das Integrin kann den Liganden nicht binden, kann aber durch den Liganden aktiviert werden.
- II. Ein erweiterter (intermediär affiner) Zustand mit einem geschlossenen Kopfteil, mit einem wenig Ligandenaffinen Zustand.
- III. Der Kopfteil ist geöffnet und das Integrin ist hochaffin für seinen Liganden.

#### ***1.4.1. Polymorphismus des $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptors***

Aufgrund der zentralen pathophysiologischen Rolle der Thrombozyten bei kardiovaskulären Ereignissen (z.B. Myokardinfarkt, Apoplexie) stellen genetische bedingte Polymorphismen und die daraus resultierenden Varianten der Thrombozyten potentielle hereditäre Risikofaktoren dar.

Ein Polymorphismus ist eine stabile Variation der DNA-Sequenz, die bei mehr als 1% der Bevölkerung vorkommt (76). Diese DNA-Polymorphismen werden als „stumm“ bezeichnet, wenn sie keine Veränderung der Aminosäuresequenz hervorrufen. Sie können allerdings eine veränderte Expression des betreffenden Proteins bewirken.

Nieuwenhuis et al. beschrieben 1985 (98) und 1986 (99) einen Patienten, dessen Thrombozyten nicht auf Kollagen reagierten, jedoch durch andere Agonisten zur Aggregation

gebracht werden konnten. Diese Thrombozyten zeigten auch ein vermindertes Spreading. Klinisch fand sich bei den Patienten eine Blutungsneigung. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich auf der Thrombozytenmembran der Patientin kein Glykoprotein Ia befand, ergo die  $\alpha_2$ -Untereinheit (98).

Die Arbeitsgruppe um Kunicki et al. fand Polymorphismen im ITGA-Gen. Die DNA-Sequenzvarianten beinhalten zwei stumme Mutationen in der Aminosäuresequenz codierenden Region der  $\alpha_2$ -Einheit bei Nucleotid 807 und 873 (19).

Das Allel 1 (807T/837T/873A/Brb) abgekürzt  $\alpha_2$ -807T, ist mit einer erhöhten Dichte des Integrin  $\alpha_2\beta_1$  auf der Thrombozytenoberfläche assoziiert. Allel 2 (807C/837T/873G/Brb) und Allel 3 (807C/837C/873G/Bra), abgekürzt  $\alpha_2$ -807C, sind mit einer geringeren Dichte des  $\alpha_2\beta_1$ -Integrins assoziiert (19).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die homozygoten Genotypen als  $\alpha_2$  807 CC und  $\alpha_2$  807 TT bezeichnet.

#### **1.4.2. Grundlagenstudien**

Kunicki et al. berichteten bereits 1993 von einer interindividuellen Variabilität der Integrin  $\alpha_2\beta_1$ -Dichte auf der Membran von Thrombozyten. Diese kann unter gesunden Individuen um den Faktor 10 variieren (19). Die Adhäsion von Thrombozyten im Vollblut unter hohen Scherraten ist proportional zur Dichte des  $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptors (19). Nun ist die Frage, ob die erhöhte Adhäsivität der Thrombozyten des TT-Genotypens klinische Auswirkungen hat. Klinische Studien zur Auswirkung dieses Polymorphismus sind widersprüchlich. In Tabelle 1 sind diese aufgeführt.

Santoso et al. (29) verglichen in Assoziationsstudien die Häufigkeit der Allele des  $\alpha_2$ -Gens mit dem Risiko einer koronaren Herzkrankheit (KHK) und eines Myocardinfarktes (MI). Die DNA von 2237 männlichen Patienten, die eine Koronarangiographie, aufgrund einer vermuteten oder bestätigten KHK erhielten, wurden analysiert. Eine starke Assoziation zwischen dem Allel 807T des  $\alpha_2$ -Gens und nichttödlichem MI für Patienten unter 62 Jahren wurde gefunden (n=1057; odds ratio 1,57; p=0,004), und eine noch stärkere Assoziation bestand bei Patienten zwischen den jüngsten 10 % der Studie (<49 Jahre; n=233; odds ratio 2,61; p=0,009). Moshfegh et al. (30) zeigten bei 177 Patienten und 89 Kontrollen eine Assoziation zwischen dem Allel 807-T und einem MI (16.4% vs. 5.6%, p=0.022), insbesondere unter Rauchern.

Es zeigte sich allerdings keine Assoziation zwischen dem Allel 807T des  $\alpha_2$ -Gens und einer KHK (87). Carlsson et al. zeigten eine Assoziation dieses Allels mit einer cerebralen Apoplexie bei Patienten unter 50 Jahren (32). Diese Studie hatte allerdings nur 227 Patienten insgesamt. Die Metaanalyse von Nikolopoulos et al. (85) untersuchte 7 Studien mit maximal 774 und Fällen und 1074 Kontrollpatienten und konnte keine Assoziation zwischen dem 807-T-Allel und Patienten mit einer cerebralen Apoplexie finden.

Die Gründe dafür können vielfältig sein. So wurden einige Studien nur mit Patienten durchgeführt, die eine transitorische ischämische Attacke hatten und in anderen Studien wurden lediglich Patienten mit einem persistierenden neurologischen Defizit eingeschlossen.

Ein gänzlich anderes Bild zeigt sich bei den Studien bei Patienten mit einer Thrombose der tiefen Venen der Beine und Becken.

Die erhöhte Rezeptordichte des  $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptors ist kein Risikofaktor für die Entwicklung einer venösen Thrombose (3687).

Erhöhte Rezeptordichte des  $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptors. Ein Risikofaktor ?

Ja	Nein
Myocardinfarkt	
Moshfegh et al.(30) (OR: 3,3)	Croft et al. (88)
Santoso et al. (29) (OR: 2,6)	Morita et al. (89)
Roest et al. (31) (OR: 2,2)	Anvari et al. (90)
Zotz et al. (114)	Tsantes et al. (96)
Apoplexie/cerebrale vaskuläres Ereignis	
Carlsson et al. (32) (OR: 3,0)	Corral et al. (34)
Sacchi et al. (91) (OR: 3,0)	
Reiner et al. (92) (OR 2,0)	
Diabetische Retinopathie	
Matsubara et al. (33)	
Koronare Herzkrankheit	
	Santoso et al. (29)
	Corral et al. (34)
Tiefe Venenthrombose	
	Corral et al. (34)
	Hessner et al. (93)
	Carlsson et al. (32)
Restenose nach Stentimplantation	
	Von Beckenrath et al. (94)

Tab.1: Übersicht der Polymorphismusstudien nach Kunicki (95)

### ***1.5. Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit***

Der Polymorphismus des  $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptors im Nucleotid 807 bewirkt eine unterschiedliche Dichte dieses Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche (19, 28). Dies hat auch funktionelle Konsequenzen (7). So bewirkt eine erhöhte Dichte eine erhöhte Adhäsion (87).

Klinische Studien ergaben allerdings widersprüchliche Resultate (Tab.1). Die Gründe hierfür können mannigfaltig sein, z.B. Studienpower, Zusammensetzung der Studienpopulation etc.. Zudem ist die Thrombusbildung und das daraus resultierende Krankheitsbild durch viele weitere Faktoren beeinflusst.

In einem In-vitro-System lassen sich die Bedingungen kontrollieren und reproduzieren, wie in diesem Fall eine Strömungskammer, wo definierte Strömungsbedingungen hergestellt werden können. Zudem kann die thrombogene Oberfläche standardisiert werden. Auf dieser thrombogenen Oberfläche adhären Thrombozyten und werden dann, wie unter Kapitel 1.3.2 beschrieben, fortbewegt.

Die erhöhte Adhäsivität des TT-Genotypen sollte zu einer veränderten Laufstrecke des Thrombozyten an der thrombogenen Oberfläche führen. Die erhöhte Klebrigkeit des Thrombozyten könnte auch dazu führen, dass die Thrombozyten des  $\alpha_2807$ -TT Genotypen länger an der thrombogenen Oberfläche haften bleiben. Aufgrund der Micromobilität sollten die Thrombozyten des  $\alpha_2 807$  TT -Genotypen in ihrer Ausdehnung größer werden als die des  $\alpha_2807$ -CC-Genotyps.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Führt die erhöhte Adhäsivität des  $\alpha_2 807$  TT-Genotyps zu einer veränderten Micromobilität der Thrombozyten an einer thrombogenen Oberfläche?
2. Lassen sich mittels bildverarbeitender Techniken und Auswertung der der dadurch entstandenen Daten in einer In-vitro-Untersuchung Unterschiede in der Micromobilität von Thrombozyten zwischen den beiden homozygoten Genotypen des  $\alpha_2 807$  C/T Polymorphismus,  $\alpha_2 807$ -CC und  $\alpha_2 807$ -TT, finden?



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Herkunft des Bildmaterials

Die zur Berechnung verwendeten Bilder stammten aus Flussexperimenten der Arbeitsgruppe der experimentelle Hämostaseologie des Instituts für Hämostaseologie, Hämotherapie und Transfusionsmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Im Weiteren beschreiben wir die angewendeten Methoden und Materialien.

#### 2.1.1. Probanden

60 regelmäßige Blutspender der Blutspenderzentrale des Instituts für Hämostaseologie, Hämotherapie und Transfusionsmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erklärten sich damit einverstanden, dass zusätzlich zu ihrer Blutspende maximal 50 ml Blut zu Forschungszwecken verwendet wurden. Alle unterschrieben eine entsprechende Erklärung (Informed Consent gemäß der Deklaration von Helsinki). Das mittlere Alter betrug 40,5 Jahre (24-67 Jahre), mit einer Standardabweichung von 10,9 Jahren 45 dieser Spender waren männlich.

Alle Probanden verneinten die Einnahme jeglicher Medikamente bis 14 Tage vor der Blutentnahme. Probanden mit anamnestischen Hinweisen auf das Vorliegen akuter oder chronischer Erkrankungen wurden ausgeschlossen. Nicht teilnehmen konnten insbesondere Probanden mit Nikotinabusus, Adipositas und bei weiblichen Personen solche mit Hormonmedikation wie Kontrazeptiva oder Hormonersatztherapie. Zum Ausschluß führte ferner eine positive Eigen- oder Familienanamnese (Erkrankungen vor Erlangen des 45. Lebensjahres erstgradiger Verwandter) für Erkrankungen des arteriellen und venösen Gefäßsystems wie z.B. arterielle Gefäßverschlüsse aller Art oder venöse Thrombembolien. Bei jeder Blutprobe wurden zahlreichen Parameter der Hämostaseologie und klinischen Chemie bestimmt und lagen bis auf wenige Ausnahmen im normalen Bereich. Eine TXB<sub>2</sub>-Bestimmung zum sicheren Ausschluss einer Acetylsalicylsäureeinnahme wurde nicht durchgeführt.

Die Probanden waren bereits im Vorfeld mittels allelspezifischer Restriktionsenzymanalyse im Hinblick auf den Polymorphismus des Integrins  $\alpha_2$ -807 genotypisiert worden. **44 von diesen Probanden hatten den Genotypus  $\alpha_2$  807 CT, 7 Probanden den Genotypus  $\alpha_2$  807 TT und 9 Probanden den Genotypus  $\alpha_2$  807 CC. Im Rahmen dieser Dissertation wurden lediglich die Proben der beiden homozygoten Genotypgruppen  $\alpha_2$  807 TT und  $\alpha_2$  807 CC verwendet. Von jedem dieser Spender wurde jeweils eine Probe verwendet und analysiert.**

Ein positives Votum der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf liegt vor.

#### 2.1.2. Flusseexperimente

Die Blutgerinnung wurde durch den Thrombininhibitor PPACK (D-Phenylalanyl-L-Prolyl-L-Arginin Chloromethyl Keton), mit einer Konzentration von 1  $\mu$ l pro ml Blut, inhibiert. Das PPACK (Bachem Distribution Systems, Weil am Rhein) wurde in Hepespufer in einer Konzentration von 1 mmol in 20 mM Hepespufer (N-(2-Hydroxyethyl)piperazin- N'-(2-ethansulfonsäure, pH 7,3, Sigma, Taufkirchen) gelöst. Dieses Tripeptid ist ein irreversibler und spezifischer Thrombininhibitor. Vorteil dieser Methode ist, dass die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration

der Probe im Gegensatz zur Verwendung von EDTA oder Citratblut unverändert bleibt.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wiederum sind im Rahmen der gesamten Hämostase essentiell.

Die Plättchenmarkierung erfolgte unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Mepacrin (N4-(6-chloro-2-methoxy-9-acridinyl)-N1, N1-diethylpentan-1,4-diamin, Sigma Chemicals, St.Louis, MO, USA). Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 440 nm, die Emission erfolgte bei einer Wellenlänge von 505 nm. Der Farbstoff besitzt eine hohe Affinität zu ATP und wird entsprechend der intrathrombozytären Verteilung von ATP selektiv in den dichten Granula der Blutplättchen, aber auch in leukozytären Granula akkumuliert (89).

Das so präparierte Vollblut wurde mittels einer Perfusorpumpe (B.Braun Melsung) in eine Strömungskammer eingebracht.

Die Strömungskammer war quaderförmig konfiguriert und maß 64 x 38 x 12 mm.

Über die am Perfusor eingestellten Flussraten konnten nun in der Kammer verschiedene Scherkräfte generiert werden, wobei  $13 \text{ s}^{-1}$  venöse Strömungsverhältnisse und  $1500 \text{ s}^{-1}$  arterielle Strömungsverhältnisse, bzw. solche in Arteriolen und Gefäßen mit mäßiger arteriosklerotischer Lumeneinengung, repräsentieren. Die jeweils notwendigen Flussraten lassen sich mit der Formel  $\gamma = 6xQ/(bxh^2)$  berechnen ( $\gamma$  = Scherrate,  $Q$  = Strömungsrate (ml/s),  $b$  = Breite des Strömungsbereiches der Kammer, entsprechen 15 mm,  $h$  = Höhe der Strömungskammer (50  $\mu\text{m}$ ) berechnen.

Als thrombogene Oberfläche wurden beschichtete Deckgläser verwendet. Auf diese Deckgläser wurde vorher mittels eines Airbrushsystems Kollagen vom Typ 1 (Kollagen Typ S, Kollagen Typ I: 95 %, Typ III: 5%, wässrige Lösung (3mg/ml), pH 3,0 (nach Extraktion mit 0,5 M Essigsäure pH 2,5) (Roche, Mannheim) aufgebracht.

Durch das Airbrushsystem, mit  $\text{CO}_2$  als Treibmittel, wurde das gelöste Kollagen homogen auf der Glasoberfläche verteilt, wie es in der Literatur schon beschrieben worden ist (44).

Collagen S wurde in PBS-Puffer ((Phosphate Buffer Saline)-Puffer, pH 7,3 Serag-Wiessner GmbH & Co. KG, Naila) 1:5 verdünnt und davon pro Deckglas 0,25 ml aufgebracht.

Die stabile Fixation des Kollagens geschah in einem Inkubator. Die Deckgläschen wurden für 60 Minuten in Petrischalen, die in einem Inkubator ( $\text{CO}_2$ -AUTO-ZERO, Heraeus) bei  $37^\circ$  in wassergesättigter Atmosphäre mit fünfprozentigem  $\text{CO}_2$ -Anteil eingebracht wurden inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Proteinbindung an die Oberfläche.

Nach Spülung mit PBS-Puffer und 1%igem BSA-Puffer (Bovine serum albumin), zur Entlüftung, um nicht adhärente Proteine zu entfernen, wurde das präparierte Blut durch die Flusskammer eingebracht.

Das Blut floss über die, wie oben beschriebenen, präparierten Deckgläser.

Zu definierten Zeitpunkten wurden Bildstapel aufgenommen, nämlich nach 15 sek., nach 1 min. und nach 5 min. Flussdauer.

Für die weiteren Auswertungen wurden diese Zeitpunkte als Zeitpunkt (ZP)

ZP 0 = Aufnahme nach 15 sek.

ZP 1 = Aufnahme nach 1 min.

ZP 5 = Aufnahme nach 5 min.

definiert.

### **2.1.3. Bildakquisition**

Die Experimente wurden mit Hilfe eines Axiovert 100 M Laserscannmikroskops (Carl Zeiss, Oberkochen) durchgeführt, dessen Argonlaser mit den Wellenlängen 458, 488 und 514 nm jede beliebig einstellbare Ebene im Untersuchungsobjekt mikrometergenau fokussieren konnte. Die Laserleistung wurde hierbei bei maximal 25 mW auf 50 % eingestellt, im Fluoreszenzkanal ein Pinhole von 1000  $\mu\text{m}$ , entsprechend 13,92 airy units Durchmesser,

ein detector gain von 1000 und ein Amplifier offset und gain von -1,995, respektive 1 gewählt. 100% Exzitation lagen bei einer Wellenlänge von 458 nm vor. Ein weiterer Kanal war als einfacher Durchlichtkanal nur zum Fokussieren der Bildebene wichtig. Bei hundertfacher Vergrößerung mittels Zeiss Neofluar 10x/0,3 Objektive wurde so ein Bereich von 980x980  $\mu\text{m}$  erfasst, indem der Laser diese Ebene zeilenweise Pixel für Pixel mit einer Geschwindigkeit von 0,88  $\mu\text{s}$  pro Pixel ablas. Parallel zu dieser Bildebene wurden in einem Abstand von jeweils 0,1  $\mu\text{m}$  und somit 0,7 sek. noch vier weitere Bilder aufgenommen, so dass Bildstapel ergaben, die einen Bereich von 980x980x0,5  $\mu\text{m}$  erfassten. Diese 5 Bilder hatten zusammen somit einen maximalen Abstand von 0,5  $\mu\text{m}$  von der Deckgläschenoberfläche, so dass adhärenzte Thrombozyten erfasst wurden, welche stabil oder in Bewegung sein konnten.

## **2.2. Bildverarbeitung**

Zur weiteren Verarbeitung von Daten aus den erstellten Bildstapeln (Stack) wurden diese zunächst von der mikroskopeigenen Software in ein anderes Dateiformat überführt. Es wurden bei der weiteren Bearbeitung nur die Bilder des fluoreszenzrelevanten Kanals, also nicht des Durchlichtkanals verwendet.

Diese Software speicherte die Bilder, die einen Bilderstapel bildeten, in Form von TIF-Dateien (tagged image files), welche eine Form von 8 Bit Schwarz-Weiß-Aufnahmen mit 512x512 Pixeln hatten.

Zur Auswertung diente das Programm ImageJ Version 1.29 von Wayne Rasband (National Institute of Health in den USA).

Die Bilder wurden zunächst binärisiert, das bedeutet, dass es in den Bildern nur noch Punkte oder weissen Hintergrund gab. Dazu wurde ein Threshhold zwischen Null und Eins gesetzt, so dass ein maximaler Kontrastunterschied (schwarz-weiß) zwischen Hintergrund (schwarz) und Fluoreszenzpunkte Lichtpunkt (weiß) entstand. Dieses Bild wurde invertiert und abgespeichert, so dass die ehemalg Mepacrin-gefärbten, adhärenzten Plättchen nun als schwarze Punkte zu erkennen waren.

Die Bilder in einem Bildstapel wurden in einem zeitlichen Abstand 900 ms aufgenommen. Es wurden 5 Bilder, die nun mehr einen Bilderstapel bildeten, in 4,5 sek. akquiriert. Da sich die Thrombozyten während der Bildgewinnung an der Oberfläche des Deckgläschens weiterbewegten, stellen die 5 Bilder eines Bilderstapels auch eine Verlaufsbeobachtung über 4,5 sek. dar. Um diese zeitlichen Verlauf zu erfassen wurde die „ADD“-Funktion von ImageJ (National Institute of Health/USA) benutzt.

Dieses führte zu einem einzigen Bild, welches ein Summationsbild eines Bildstapels darstellte und aufgrund der Entstehungsgeschichte auch eine Verlaufsbeobachtung darstellte.

Somit hatte wir für die Zeitpunkte 0,1 und 5 und für die Scherraten 50, 500 und 1500  $\text{s}^{-1}$  getrennt nach Probanden und nach Genotypen jeweils ein einziges Summationsbild.

Mittels ImageJ wurden Kennzahlen der Bildobjekte, welche sich auf den addierten Bildern befinden, berechnet. Diese Kennzahlen waren die Länge, die Höhe und Area. Hierbei ist zu beachten, dass sich diese Kennzahlen auf das 2-dimensionale Bild beziehen. So das die Höhe, wie in Abb. 5, sich auf die horizontale Ausdehnung der Objekt im Bild bezieht und nicht auf die tatsächliche dreidimensionale Höhe. Die Weite auf die vertikale Ausdehnung und die Area die Anzahl der Bildpunkte.

Alle Werte wurden in Pixel angegeben. Ein Pixel entsprach 1,9  $\mu\text{m}$  x 1,9  $\mu\text{m}$ .

Abb. 6 zeigt ein Summationsbild.

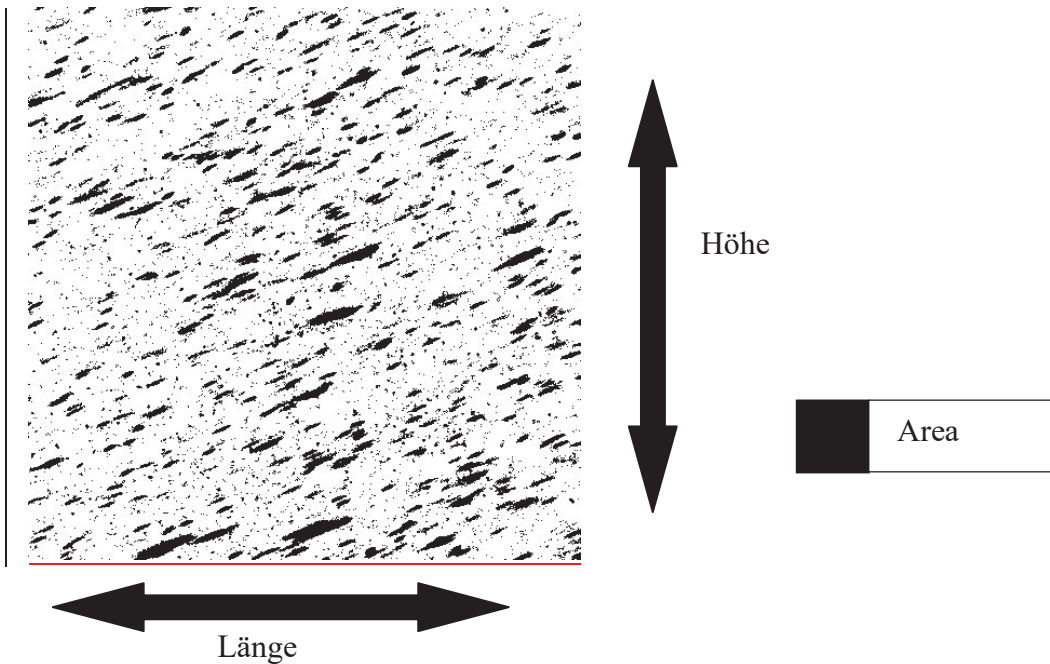


Abb.6 : Länge, Höhe und Area in einem summierten „Stackbild“. Aufgenommen beim Zeitpunkt 0 und einer Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$ . Als Area ist die Summe der zusammenhängenden, schwarzen Bildpunkte definiert. (ca.100fache Vergrößerung)

Diese Kennzahlen (Länge, Höhe und Area) wurden mittels „Copy“-Funktion zunächst in das Programm Microsoft-Excel und dann in das Programm SPSS importiert. Diese SPSS- Daten wurde als Grundlage für alle späteren Berechnungen genommen.

Zudem erlaubt es ImageJ, Plug-Ins zu verwenden. Plug-Ins sind Ergänzungsprogramme, die in ImageJ integriert werden können. Eines davon ist das Tool Multitracker (6). Um dieses plugin in ImageJ zu verwenden, wurde folgendes Makro in ImageJ implementiert:

```
call("MTrack2_.setProperty", "minSize", "2");
call("MTrack2_.setProperty", "maxSize", "20");
call("MTrack2_.setProperty", "minTrackLength", "3");
call("MTrack2_.setProperty", "maxVelocity", "4");
call("MTrack2_.setProperty", "saveResultsFile", "false");
call("MTrack2_.setProperty", "showPaths", "true");
call("MTrack2_.setProperty", "showPathLengths", "true");
call("MTrack2_.setProperty", "showLabels", "false");
call("MTrack2_.setProperty", "showPositions", "true");
call("MTrack2_.setProperty", "skipDialogue", "true");
```

Ziel war es die Wegstrecke, die die Thrombozyten zurücklegen, zu berechnen und in einem späteren Schritt einen Unterschied zwischen den beiden Genotypen zu prüfen.

### 2.3. Statistik

Um einen Unterschied zwischen den Genotypen  $\alpha_2807CC$  und  $\alpha_2807TT$  zu erkennen, wurden die gewonnenen Daten unterschiedlichen Tests unterzogen. Die statistische Beratung erfolgt durch Dr. rer. nat. Strassburger (Institut für Biometrie und Epidemiologie/ Deutsches Diabetes-Zentrum/ Düsseldorf) Wie oben erläutert, hatte jedes Objekt auf einem Bild mehrere Kennzahlen. Grundlagen der statistischen Tests waren die Parameter Width/Länge, Height/Höhe und Area/Fläche. Im Weiteren werden nur noch die deutschen Begriffe verwendet.

Aus theoretischen (17, 22) und praktischen Gesichtspunkten beschränkten wir uns in den Auswertungen auf die Daten der Versuche bei der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$  zum Zeitpunkt „0“. Wir verglichen die beiden Genotypen miteinander.

Das Signifikanzniveau wurde bei allen statistischen Tests auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Dies bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit eine Hypothese fälschlicherweise abzulehnen, kleiner als 5 % ist.

### **2.3.1. Auswertung der Multitrackerergebnisse**

Zur statistischen Prüfung der Unterschiede zwischen den beiden Genotypgruppen wurde auch der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test („U-Test“) ein nicht-parametrisches Testverfahren zum Vergleich zweier unverbundener Stichproben verwendet. **Zur Überprüfung ob es einen Unterschied zwischen den beiden Genotypgruppen gab wurden die Daten, in den Online Mann-Whitney U Test (<http://elegans.som.vcu.edu/~leon/stats/utest.html>) eingegeben und verglichen.**

### **2.3.2. Regressionsgeradenauswertungen**

Grundlage war die Überlegung, dass sich die beiden Genotypen  $\alpha_2807CC$  und  $\alpha_2807TT$  in ihrer Laufstrecke und / oder in ihrer Laufbahn unterscheiden müssten. Wie auf der Abb.6 zu erkennen ist, verläuft die Strömung nicht perfekt horizontal, sondern zeigt eine leichte vertikale Abweichung.

Wie unter Kapitel 2.2 erläutert, hatte jedes Objekt auf einem Summationsbild mehrere Parameter, unter anderem Länge und Höhe. Diese wurden mit Hilfe eines für jedes Summationsbild erstellten Koordinatensystems ermittelt. Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen den Längen und den Höhen der Objekte wurde für die Daten jedes Summationsbildes eine lineare Regressionanalyse durchgeführt und die Regressionsgerade nach der Methode der kleinsten Quadrate berechnet. Zudem wurde das Bestimmtheitsmaß B berechnet. Das Bestimmtheitsmaß ist ein dimensionsloses Maß, welches beschreibt, wie „gut“ diese Regressionsgerade die Punktwolke beschreibt.

In Kapitel 1.3.2 werden die grundsätzlichen Abläufe eines Weges eines Thrombozyten beschrieben, zunächst kommt es zum Tethering, dann zu einer instabilen Adhäsion. Diese instabile Adhäsion führt in Kombination von Scherkräften und des zytoskeletalen Remodelings des Thrombozyten zur Mikromobilität, bis es dann zu einer stabilen Adhäsion des Thrombozyten kommt. Dabei kann es natürlich auch, bis zur stabilen Adhäsion, auch noch zum Abreißen und zum Weitertransport des Thrombozyten kommen. Diese Thrombozyten kommen allerdings in dieser Auswertung nicht zur Darstellung.

Nun war die Überlegung, dass aufgrund der unterschiedlichen Laufwege der Thrombozyten der beiden Genotypen sich auch die Punktwolken unterscheiden müssten und damit auch die Regressionsgeraden. Anhand der Steigung dieser Geraden sollte ein Unterschied der beiden Genotypen geprüft werden.

### **2.3.3. Chi-Quadrattests**

Die Unterschiede zwischen den Verteilungen von Länge/Höhe/Fläche zwischen den Genotypgruppen wurden mittels eines Chi-Quadrat-Tests überprüft.

Der Chi-Quadrat-Test ist ein statistischer Test zur Prüfung der Unabhängigkeit zweier kategorialer bzw. klassierter Merkmale. Mit ihm lässt sich prüfen, ob zum Beispiel die Häufigkeiten unterschiedlicher Ereignisse (z.B. bestimmte Werte der Länge/Höhe/Area) von der Gruppenzugehörigkeit (in unserem Fall die beiden Genotypgruppen  $\alpha_2807CC$  und  $\alpha_2807TT$ ) unabhängig sind. Zur Durchführung des Tests wurden die Anzahl der Längen,

Höhen bzw. Area (1, 2, 3 etc...) der beiden Genotypen  $\alpha_2807CC$  und  $\alpha_2807TT$  gemittelt, um die differente Anzahl der Probanden in den beiden Genotypengruppen zu berücksichtigen.

#### ***2.3.4. Die empirische Verteilungsfunktion***

Die empirische Verteilungsfunktion  $F(t)$  (auch Summenhäufigkeitsfunktion oder Verteilungsfunktion der Stichprobe genannt) ist definiert als die relative Anzahl von Beobachtungswerten eines quantitativen Merkmals  $X$ , welche kleiner oder gleich  $t$  sind.

#### ***2.3.5. Auswertung der geometrischen Mittel mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests***

Zur statistischen Prüfung der Unterschiede zwischen den beiden Genotypgruppen wurde auch der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test („U-Test“) ein nicht-parametrisches Testverfahren zum Vergleich zweier unverbundener Stichproben verwendet. Dieser Test wurde auf die für jeden Probanden aus dem Summationsbild berechneten geometrischen Mittelwerte der Längen/Höhen/Flächen angewendet.

Wie das arithmetische Mittel ist auch das geometrische Mittel ein Maß, mit dem sich die Lage der Verteilung eines quantitativen Merkmals einer Stichprobe beschreiben lässt. Besitzt die Stichprobe den Umfang  $n$ , so ist das geometrische Mittel definiert als die  $n$ -te Wurzel des Produkts aller Merkmalswerte. In der Statistik wird das geometrische Mittel insbesondere bei schief (z.B. log-normal) verteilten Daten als beschreibender Lageparameter verwendet.

Angewendete Programme :

Das Programm SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) (SPSS Inc., USA) wurde in der Version 15.0 verwendet. Das Programm SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute, USA) wurde in der Version 9.0 verwendet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Grundlagen

Grundlagen für alle weiteren Untersuchungen waren, die wie unter Kapitel 2. beschrieben akquirierten und bearbeiteten Bilder. Durch die Aufnahme- und Bearbeitungstechnik repräsentiert ein Bildstapel auch eine zeitliche Verlaufsaufnahme von 4,5 sek.. Durch die Aufnahme- und Bearbeitungstechnik kamen störende Leukozyten oder Erythrozyten nicht zur Darstellung.

Auf den Aufnahmen, welche nach 1 min. und nach 5 min. angefertigt wurden, zeigt sich eine Zunahme der stabil adhärierten Thromben. Die Auswertung wird durch diese Thromben beeinflusst, da sie andere Thrombozyten überlagern. Abb. 7-9 zeigt repräsentative Bilder dieser Verläufe.

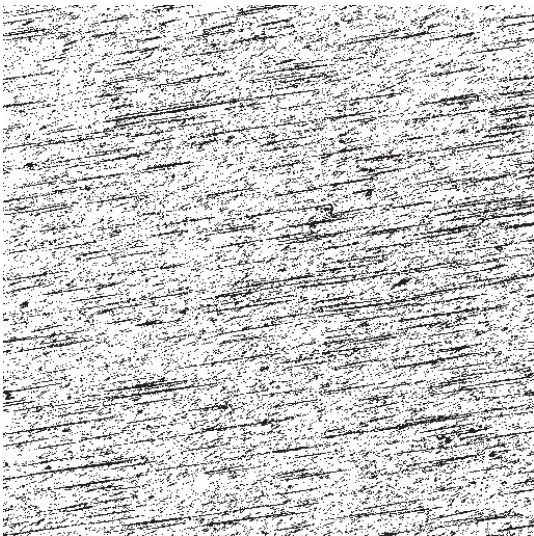


Abb. 7 Summationsbild nach 15 sek. ( $ZP = 0$ ) bei einer Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$  (ca.100fache Vergrößerung)

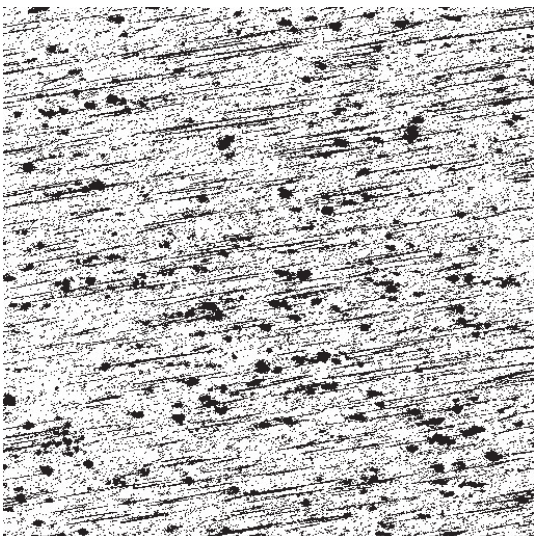


Abb. 8 Summationsbild nach 1 min. ( $ZP = 1$ ) bei einer Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$  (ca.100fache Vergrößerung)

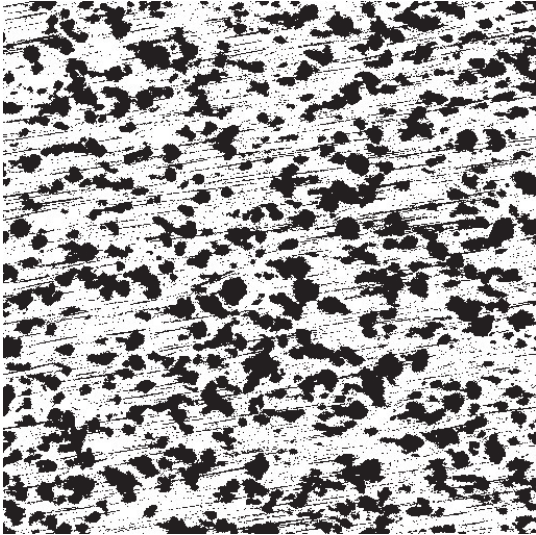


Abb. 9 Summationsbild nach 5 Minuten ( $ZP = 5$ ) bei einer Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$  (ca.100fache Vergrößerung)

Weiterhin kann man erkennen, dass die Thrombozyten gleichmäßig auf dem Bild verteilt waren und dass die Strömung nicht perfekt horizontal verlief.

In den repräsentativen Bildern Abb. 10 und 11 ist ein Unterschied in der Konfiguration der Objekte zu sehen. In Abb. 10 sind die größeren Objekte eher rundlich, während in Abb.11 die größeren Objekte vermehrt länglich sind.

Bezüglich der Scherrate sieht man in den repräsentativen Bildern in Abb. 10 und 11, dass es zu einer Zunahme der Länge der Objekte, also damit der abgebildeten Thrombozyten kam.

Im direkten Vergleich von Abb. 10 und Abb. 11 sieht man Aufnahmen vom selben Probanden bei zwei verschiedenen Geschwindigkeiten. Abb.10 zeigte die Aufnahme bei  $50 \text{ s}^{-1}$  und Abb.11 die Aufnahme bei einer Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$ .

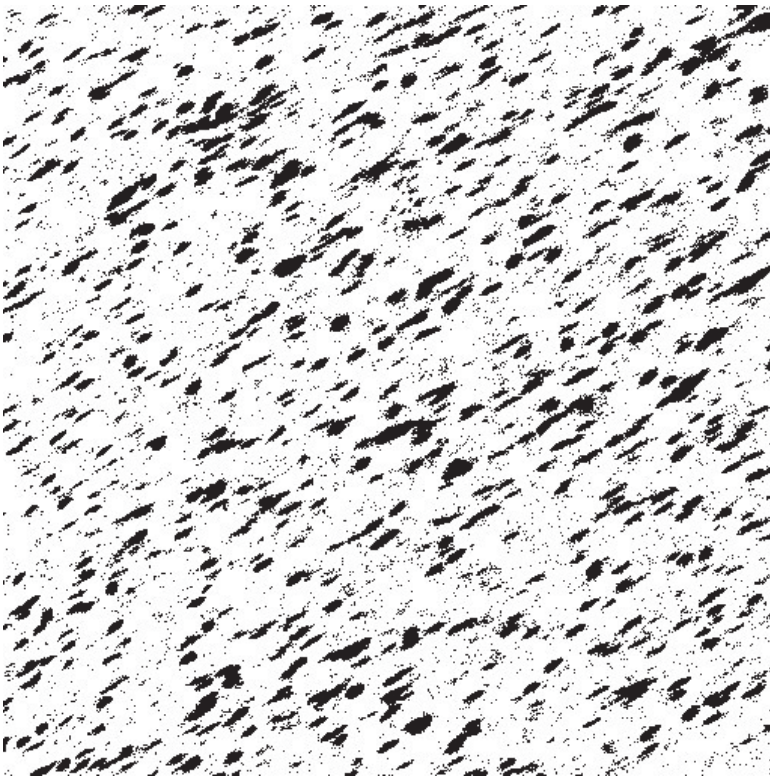


Abb. 10 Summationsbild nach 15 sek. ( $ZP = 0$ ) bei einer Scherrate von  $50 \text{ s}^{-1}$  (ca.100fache Vergrößerung)



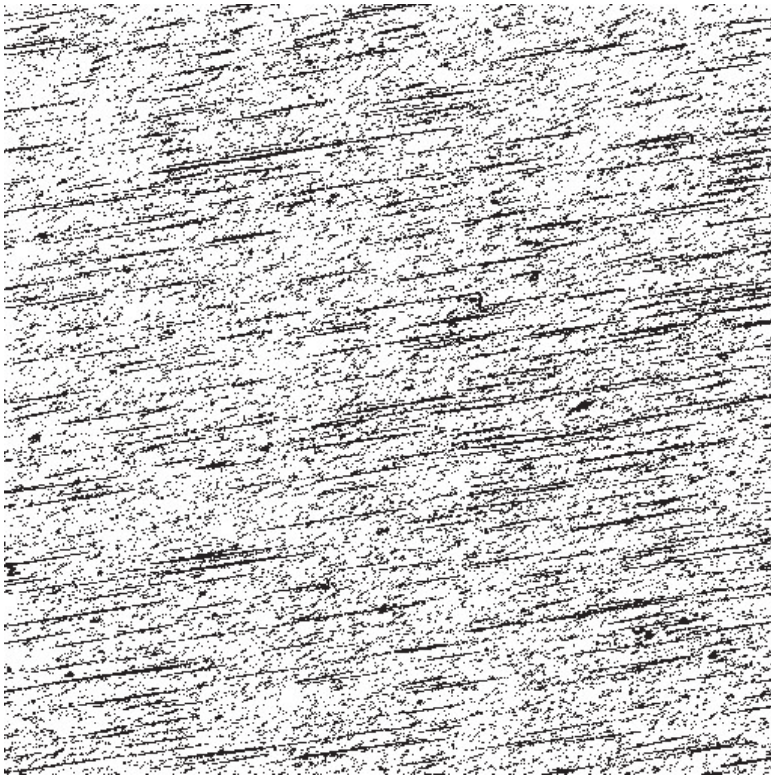


Abb.11 Summationsbild nach 15 Sek ( ZP = 0) bei einer Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$  (ca.100fache Vergrößerung)

Im visuellen Vergleich zeigen sich bei der höheren Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$  vermehrt längere Objekte, welche bewegende oder adhärenente Thrombozyten repräsentieren.

### ***3.2. Ergebnisse des Multitrackerprogramms***

Ein Bildstapel bildet mit seinen fünf Bildern auch einen zeitlichen Verlauf dar. In die Bildverarbeitungssoftware ImageJ kann ein Plug-In installiert werden, also ein Modul, das eingebunden werden kann, um die Funktionalität von zu ImageJ erweitern. Im ImageJ-Programm gibt es die Funktion „Particle Analyzer“, welche Objekte in einem Bild, welches binarisiert worden ist, erfassen kann.

MultiTracker benutzt ImageJ's Particle Analyzer -Funktion um die Bewegung von Objekten über mehrere Bilder zu berechnen. Damit ist es möglich Objekte durch einen Stack zu verfolgen und ihre Wegstrecke zu berechnen.

Das Tool Multitracker wurde auf die Bilder der Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$  und für den Zeitpunkt 0 verwendet.

Zur Überprüfung ob es einen Unterschied zwischen den beiden Genotypgruppen gab wurden die Daten, in den Online Mann-Whitney U Test (<http://elegans.som.vcu.edu/~leon/stats/utest.html>) eingegeben und berechnet.

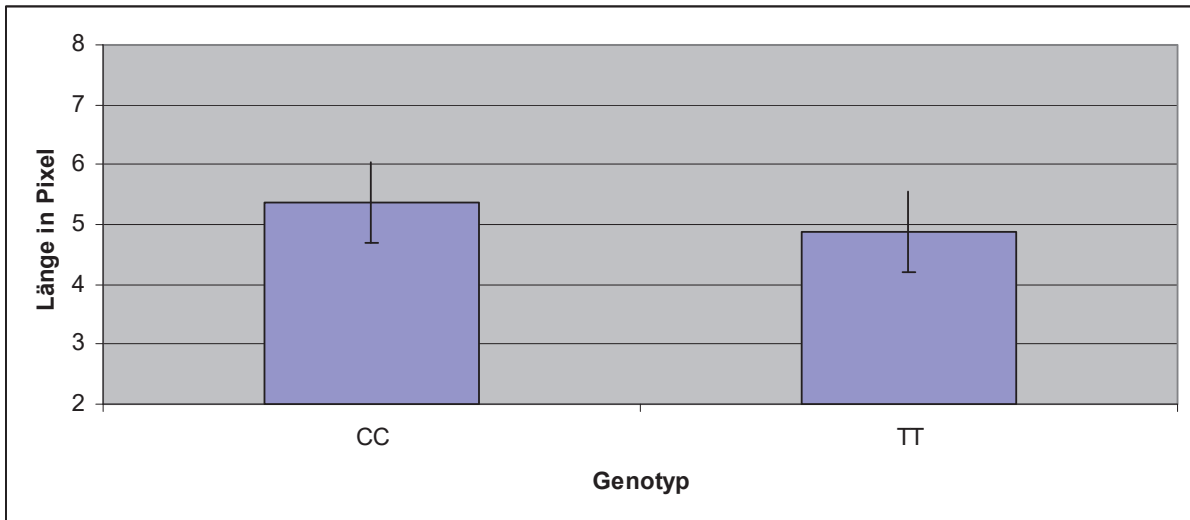


Abb.12 Ergebnisse der Auswertung des MultiTracker  
 Dargestellt sind die Mittelwerte (Länge in Pixel) und Standardabweichung, aufgeteilt nach Genotypgruppe ( $\alpha 2$ -807TT und  $\alpha 2$ -807CC). Ein Pixel entspricht 1,9  $\mu\text{m}$ .

Genotyp/Proband	Länge	Genotyp/Proband	Länge
CC-1	5,36	TT-1	4,35
CC-2	4,63	TT-2	5,35
CC-3	5,58	TT-3	3,69
CC-4	5,19	TT-4	5,48
CC-5	5,54	TT-5	5,45
CC-6	5,5	TT-6	5,117
CC-7	5,41	TT-7	4,75
CC-8	5,6	Mittelwert	4,88
CC-9	5,44		
Mittelwert	5,36		

Mittelwert CC-Gruppe = 5,36 Standardabweichung CC-Gruppe = 0,30

Mittelwert TT-Gruppe = 4,88 Standardabweichung TT-Gruppe = 0,66

Tab. 3: Ergebnisse der Auswertung des MultiTrackers. Länge in Pixel. Ein Pixel entspricht 1,9  $\mu\text{m}$ . Aufgeteilt nach Genotypgruppe ( $\alpha 2$ -807TT und  $\alpha 2$ -807CC)

### U Test Ergebnis

$n_1$	$n_2$	U	p (zweiseitig)
9	7	49.0	0.0711

Die beiden Genotypgruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ( $p \geq 0.05$ , zweiseitiger Test)

Tab. 4: Ergebnisse des Mann-Whitney U Test. Vergleich der Längenergebnisse des Multitrackers zwischen den beiden Genotypgruppen ( $\alpha 2$ -807TT und  $\alpha 2$ -807CC)

Der Unterschied zwischen den beiden Genotypgruppen ist **knapp** nicht signifikant ( $p = 0.0711$ ) (Tab.4).

### 3.3. Regressionsgeradenberechnung

Die Messergebnisse der einzelnen Objekte in einem Summationsbild wurden in ein Koordinatensystem eingetragen. Dabei repräsentiert die X-Achse die Länge und die Y-Achse die Höhe. Es ist zu beachten, daß sich dies auf das Bild bezieht und nicht auf die physische Höhe des Objektes.

Somit repräsentiert ein Punkt im Koordinatensystem ein Objekt auf dem Bild. Aus diesen Daten kann nun eine Regressionsgerade berechnet werden. Nun wurden zunächst alle Objekte in einem Summationsbild in die Berechnungen einbezogen. Da aber Objekte mit einer Länge von über 200 Pixel oder unter 2 Pixel, ergo unter  $3,8 \mu\text{m}$  oder über  $380 \mu\text{m}$  keinen einzelnen Thrombozyten darstellt, der gerade im Prozess der Mikromobilität ist, wird diese bei den weiteren Berechnungen nicht berücksichtigt.

Im Vergleich der beiden Genotypen sollten Unterschiede in der Länge und/oder der Höhe der Objekte, welche ja adhärierende Thrombozyten repräsentierten, nachweisbar sein. Dies sollte sich in der Punktwolke und der berechneten Regressionsgerade nachweisen lassen.

Die Analyse der Regressionsgeraden zeigt, dass einerseits mit der Beschränkung der Höhen und Längen, das Bestimmtheitsmass  $R^2$  kleiner wird und somit die Regressionsgleichung die Punkte nur unzureichend beschreibt.

Je näher der Wert des Bestimmtheitsmaßes bei 1, desto präziser wird die Streuung durch die Regressionsgeradengleichung beschrieben.

Es zeigen sich weder signifikante Unterschiede, noch ist ein stabiles Muster erkennbar. Am Regressionskoeffizienten nach Pearson lässt sich in der Regressionsanalyse der Beitrag einer unabhängigen Variablen (Regressor) für die Erklärung oder Prognose der abhängigen Variable ablesen.

In der Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Regressionsgeradenanalyse aufgeführt. Abb.13 zeigt exemplarisch eine Grafik der Regressionsgerade und der Punktwolke.

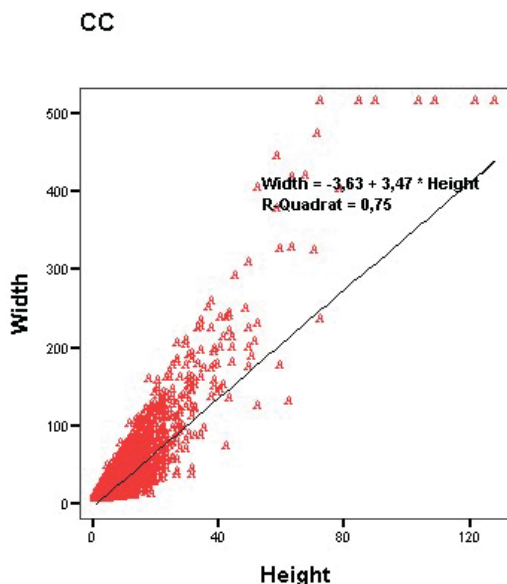


Abb. 13 Regressionsgeradenauswertung.

Ein Punkt im Koordinatensystem repräsentiert ein Objekt auf einem Summationsbild.

X-Achse: Höhe in Pixel. Y-Achse: Länge in Pixel. Ein Pixel entspricht  $1,9 \mu\text{m}$ . Rechts oben sieht man die berechnete Regressionsgerade.

	$\alpha_2$ 807 TT	$\alpha_2$ 807 CC
ZP : 0 min SR : 50	1,42	1,43
ZP : 0 min SR: 500	1,67	2,14
ZP : 0 min SR: 1500	3,78	3,58
ZP : 1 min SR: 50	1,04	1,02
ZP : 1 min SR: 500	2,12	2,01
ZP : 1 min SR: 1500	3,74	3,24
ZP : 5 min SG : 50	1,05	1,02
ZP : 5 min SG : 500	1,85	1,86
ZP : 5 min SG : 1500	1,91	2,32

Tabelle 5.

Regressionsgeradenauswertung. Im Vergleich zwischen den beiden Genotypgruppen

Mittlere Steigung der Regressionsgeraden im Vergleich zwischen den Genotypen CC ( n=3) und TT ( n=3)

Mittleres Bestimmtheitsmaß ist B = 0,83.

Legende:

ZP Zeitpunkt

SR Scherrate

### 3.3.1. Modifizierung der Berechnungsgrundlagen

Grundlage für die Modifizierung der Berechnungsgrundlage war die Überlegung, daß durch die Einschränkung der Höhen und Längen störende Objekte nicht mehr in die Berechnung eingehen würden.

Wie man an den Ergebnissen der Scherrate  $50 \text{ s}^{-1}$  und für die Zeitpunkte 1 und 5 in Tab. 4 erkennt, erweisen sich dort keinerlei Unterschiede. Erst für eine Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$  zeigten sich größere Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Dabei sind die Ergebnisse allerdings uneinheitlich. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Es ist allerdings dabei auch kein stabiles Muster oder Trend erkennbar.

Bei den übrigen Berechnungen lag das Bestimmtheitsmaß bei 0,15-0,2. Diese Daten werden hier nicht weiter aufgeführt.

#### Berechnungsmodifikationen

Keine Einschränkung	CC = 3,47 (0,71)	TT = 3,31(0,75)
H < 50	CC = 2,86 (0,68)	TT = 3,21(0,71)
H < 50 und w > 4	CC = 4,03 (0,69)	TT = 4,31 (0,69)
W > 2	CC = 3,63 (0,70)	TT = 3,44 (0,76)

Tabelle 6. Mittlere Steigung der Regressionsgeraden im Vergleich zwischen den Genotypgruppen  $\alpha_2$ -807TT (n=7) und  $\alpha_2$ -807CC (n=9). In Klammern das mittlere Bestimmtheitsmass.

Legende :

H = Höhe

W=Länge

### 3.4. Ergebnisse des Chi-quadrat-Test

Nun war die Überlegung, ob sich ein Unterschied in der Anzahl der Objekte im Genotypenvergleich bezüglich der Area, Weite und Höhe ergeben würde. Dazu wurden die Daten, wie in Kapitel 2 beschrieben, bearbeitet und in den Web-Chi-Square-Test ([http://hg.wustl.edu/info/linkage/web\\_chi/web\\_chi\\_form5.html](http://hg.wustl.edu/info/linkage/web_chi/web_chi_form5.html)) eingegeben und berechnet. In den Tabellen sind die Anzahl der Objekte mit z.B. der Weite = 1 aufgeführt.

Die Angaben der Area, Weite und Höhe sind in Pixel. Die Anzahl der Ereignisse sind als normalisierte Mittelwerte dargestellt.

Da aber Objekte mit einer Länge, Area/Fläche oder Höhe über 200 Pixel oder unter 2 Pixel, ergo unter 3,8 µm oder über 380 µm keinen Thrombozyten, der sich im Prozess der Mikromobilität, darstellten, wurden diese in weiteren Berechnungen nicht eingeschlossen.

#### 3.4.1. Area/Fläche

Genotyp/Area	1	2	3	4	5
TT	5546	1279	572	914	193
CC	6679	1595	724	412	255
Genotyp/Area	1-10	11-20	21-30	31-40	41-50
TT	7906	373	117	50	28
CC	9637	489	156	72	47
Genotyp/Area	1-20	21-40	41-60	61-80	81-100
TT	8280	167	48	19	12
CC	10127	228	79	35	22

Tab. 7: Die Unterschiede in der Verteilung zwischen den beiden Genotypgruppen sind nicht signifikant. Fläche/Area in Pixel. Ein Pixel entspricht 1,9 µm. In den Zeilen mit „Area“ ist die Fläche in Pixel des Objektes angegeben. In den Zeilen mit Genotyp TT/CC ist jeweils die Anzahl der Objekte angegeben.

#### 3.4.2. Höhe

Genotyp/Höhe	1*	2*	3*	4*	5*
TT	6972*	1051*	316*	109*	53*
CC	8393*	1373*	436*	162*	81*
Genotyp/Höhe	1-10	11-20	21-30	31-40	41-50
TT	8502	65	15	6	1
CC	10447	113	17	5	3
Genotyp/Höhe	1-20		21-40	41-60	
TT	8568		21	2	
CC	10560		22	3	

Tab. 8: (\*=p < 0,05 Unterschied in der Verteilung ist signifikant). Die anderen Unterschiede in der Verteilung zwischen den beiden Genotypgruppen sind nicht signifikant. Höhe in Pixel. Ein Pixel entspricht 1,9 µm. In den Zeilen mit „Höhe“ ist die Höhe des Objektes in Pixel angegeben. In den Zeilen mit Genotyp TT/CC ist jeweils die Anzahl der Objekte angegeben.

### 3.4.3. Länge

Genotyp/Länge	1	2	3	4	5
TT	5994	1388	543	235	116
CC	7193	1727	709	332	160
Genotyp/ Länge	1-10	11-20	21-30	31-40	41-50
TT	8318	187	46	22	11
CC	10123	266	70	39	24
Genotyp/ Länge	1-20*	21-40*	41-60*	61-80*	81-100*
TT	8466*	68*	20*	12*	7*
CC	10390*	39*	40*	19*	8*

Tab. 9: (\*=p<0,001. Unterschied in der Verteilung ist signifikant). Die anderen Unterschiede in der Verteilung zwischen den beiden Genotypgruppen sind nicht signifikant. Länge in Pixel. Ein Pixel entspricht 1,9 µm. In den Zeilen mit „Länge“ ist die Länge des Objektes angegeben. In den Zeilen mit Genotyp TT/CC ist jeweils die Anzahl der Objekte angegeben.

Wie zu erkennen ist, ergibt sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich der Anzahl der Längen im letzten Test (Tab.9). Dies zeigte ein Trend der Objekte des Genotypen  $\alpha_2$  807 CC zu längeren Weiten.

### 3.5. Ergebnisse der empirischen Verteilungsfunktion

Aufgrund von theoretischen Überlegungen, den Ergebnissen der Regressionsanalyse und der Chi-Quadrat-Test bzgl. der Länge wurden die weiteren Analysen nur noch für die Strömungsgeschwindigkeit  $1500 \text{ s}^{-1}$  und den Zeitpunkt 0 durchgeführt.

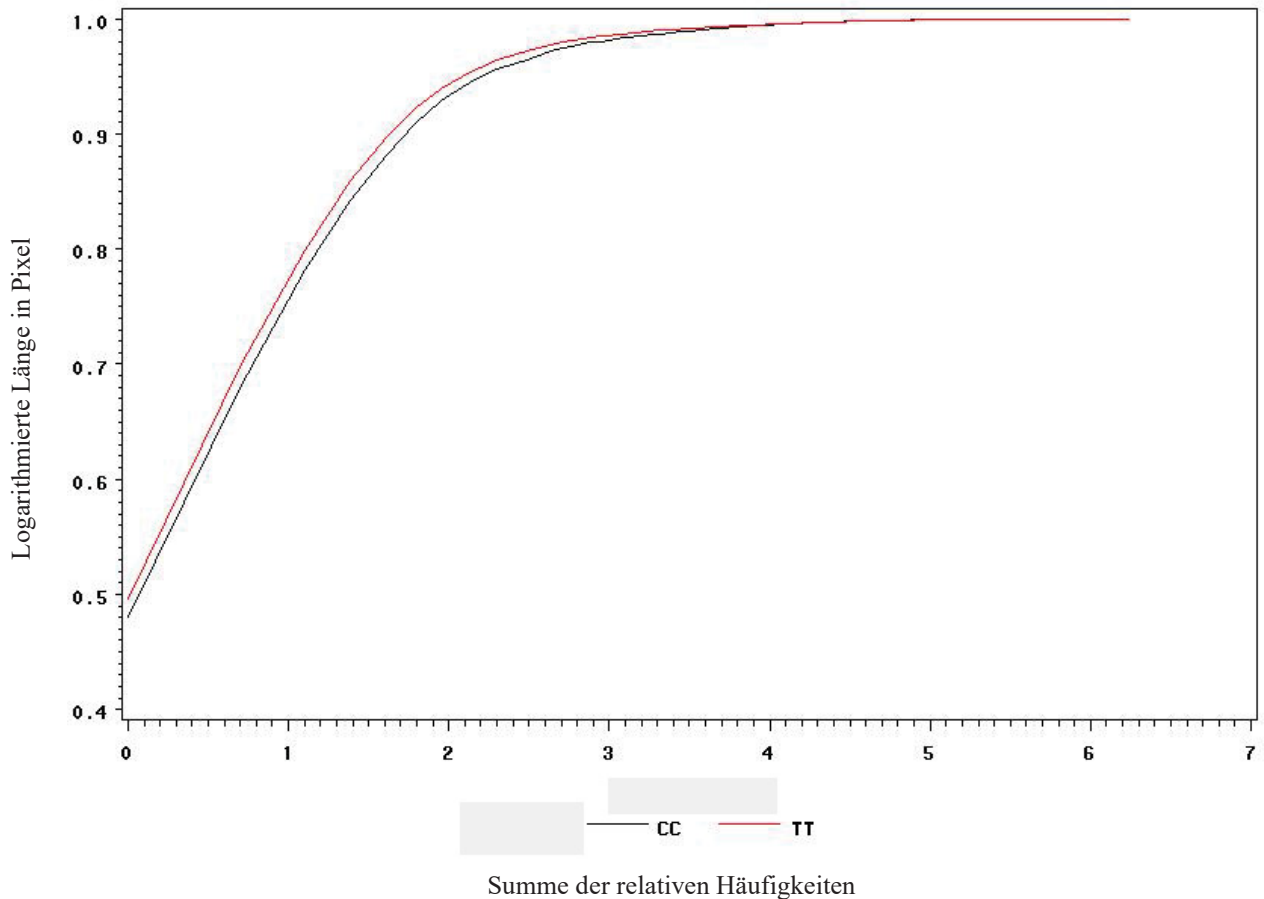


Abb.14: Empirische Verteilungsfunktion der Längen. Erklärung im Text von Kapitel 3.5. Ein Pixel entspricht  $1,9 \mu\text{m}$ .

Abb.14 stellt, in logarithmierter Darstellung, die summierten Daten von allen Probanden bzw. Versuchen dar. Auf der Y-Achse wurde die Länge in logarithmierter Darstellung aufgezeichnet, auf der X-Achse die Anzahl der Objekte. Somit sind an dem Ende der Kurve alle Objekte dargestellt.

Man erkennt in Abb.13, dass es einen Trend der TT-Genotyp-Gruppe zu kürzeren Längen gibt. Die Grafik ist folgendermaßen zu interpretieren: Bei einer Weite =1 (ln) sind ca. 70 % aller Objekt erfasst, allerdings ca. 75-80 % aller Objekte des Genotypus TT. Dies ist über die gesamte Kurve hinweg stabil. Somit zeigt sich ein Trend des Genotypus  $\alpha_{2807}$  TT zu kürzeren Weiten.

### 3.6 Ergebnisse des geometrischen Mittels

Es wurde das geometrischen Mittel für die einzelnen Probanden berechnet und die beiden Genotypgruppen miteinander verglichen. Aufgrund von theoretischen Überlegungen, der Ergebnissen der Regressionsanalyse und der Chi-Quadrat-Tests, wurde die Analyse auf die Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$  und auf den Zeitpunkt 0 beschränkt.

Die Fragestellung ist: Sind die geometrischen Mittel der Weiten in der TT-Genotypgruppe statistisch signifikant kürzer als in der CC-Genotyp Gruppe?

Die Werte sind in der Tab. 16 dargestellt und in Abb.15 abgebildet.

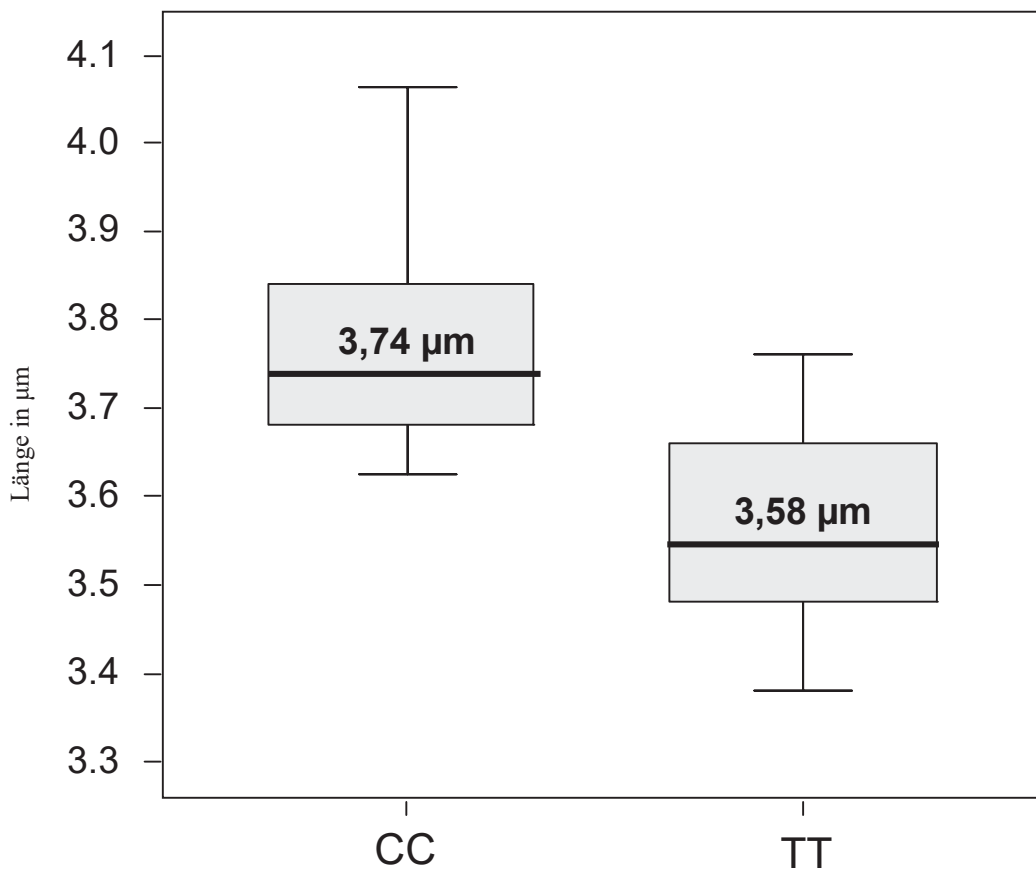


Abb.15. Grafische Darstellung der geometrischen Mittel der Längen der beiden Genotypgruppen ( $\alpha 2-807\text{TT}$  und  $\alpha 2-807\text{CC}$ ) in  $\mu\text{m}$ . Scherrate  $1500 \text{ s}^{-1}$ . (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test:  $p < 0,05$ ).



Genotyp	ID	GM Länge	Mittelwert der Geometrischen Mittel der Längen der beiden Genotypen
CC	A-01	1.96	
CC	A-02	1.90	
CC	A-04	1.88	
CC	A-07	2.05	
CC	A-09	1.98	
CC	A-14	1.91	
CC	A-18	2.13	
CC	A-19	1.94	
CC	A-20	1.94	1,97. SA: 0,07
TT	A-03	1.79	
TT	A-05	1.87	
TT	A-06	1.81	
TT	A-10	1.97	
TT	A-13	1.86	
TT	A-17	1.98	
TT	A-21	1.87	1,88. SA: 0,06

Tab. 16: Auflistung der geometrischen Mittel in Pixel, aufgeschlüsselt nach Probanden und Genotypen. Unterschied zwischen geometrischen Mittel ist signifikant (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test:  $p < 0,05$ ). SA= Standardabweichung. Ein Pixel entspricht 1,9  $\mu\text{m}$ .

Somit ist das geometrische Mittel der Weiten in der  $\alpha_2$  807 TT-Genotyp Gruppe statistisch signifikant kürzer als in der  $\alpha_2$  807 CC-Genotyp Gruppe.

## 4. Diskussion

### 4.1 Grundsätzliche Überlegungen

Bezogen auf Morbidität und Mortalität der Bevölkerung spielen Erkrankungen des kardiovaskulären Systems eine herausragende Rolle (1). Blutplättchen sind in diesem Zusammenhang in vielerlei Hinsicht von Relevanz. Sie sind zentral an hämostaseologischen Vorgängen beteiligt, die die bei einer Verletzung der Gefäßwand durch Adhäsion und Aggregation den Blutverlust minimieren.

Auf der anderen Seite sind Thrombozyten an Krankheitsbildern beteiligt, welche häufige Entitäten im klinischen Alltag darstellen, hierzu zählen thrombembolische Erkrankungen des des arteriellen Systems, wobei als Krankheitsbilder insbesondere der Myokardinfarkt und die zerebrale Apoplexie genannt werden sollte. Mannigfaltige Ansätze der medikamentösen Therapie solcher Erkrankungen zielen auf die Inhibition der Thrombozytenfunktion hin, zahlreich finden Clopidogrel sowie Abciximab Anwendung (11). Ebenso kommen GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten wie Eptifibatid (106) und Tirofiban (107) zur Anwendung.

Die zugrunde liegenden Hämostaseprozesse sind teilweise plättchenvermittelt, jedoch sind auch die Vorgänge der plasmatischen Hämostase wesentlich und Angriffsziel der modernen Pharmakotherapie, sei es die Substitution einzelner Plasmabestandteile bei Mangelzuständen oder die Inhibition relevanter Vorgänge der Hämostase. Hier sind aus dem klinischen Alltag Phenprocoumon und Heparin zu nennen. Die Zusammenhänge zwischen der plättchenvermittelten und der plasmatischen Hämostase sind nur unvollständig bekannt. Durch Erforschung der Interaktionen zwischen thrombozytären Rezeptoren und ihren Liganden könnten neue Therapieansätze und Wirkmechanismen für oben genannte Krankheitsbilder evaluiert werden.

Die Analyse von hämostatisch wirksamen Genpolymorphismen und ihre Rolle bei thrombembolischen Erkrankungen haben ein neues Feld der Hämostaseologie eröffnet (20).

In klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass das  $\alpha_2$  807T-Allel des der  $\alpha_2$ -Untereinheit des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  zu einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkte bei Patienten unter 60 Jahren darstellt (21).

Dieses Allel zeichnet sich dadurch aus, dass es eine erhöhte Dichte des Integrins  $\alpha_2\beta_1$  auf der Oberfläche der Thrombozyten bewirkt (28). Nun fehlte ein experimenteller Beweis, das es zu mit der erhöhten Adhäsion des 807T-Allels zu einer veränderten Mikromobilität der Thrombozyten an einer thrombogenen, in diesem Fall Kollagen Typ I, Matrix kommt.

Mit einem Flusskammermodell, wo Plättchen unter definierten Bedingungen thrombogenen Matrices ausgesetzt werden können, bot sich in dieser Arbeit die Möglichkeit, diese Interaktionen zu evaluieren. Quantifiziert wurde diese Veränderung durch die Differenz in der zurückgelegten Wegstrecke der Thrombozyten.

Wir wählten folgende Spezifikationen für unsere Auswertungen aus: Da beschrieben worden ist, daß die Adhäsion am stärksten bei hohen Strömungsgeschwindigkeiten ist (7) und sich für die Zeitpunkte 1 min. und 5 min. vermehrt stabilere Thromben angelagert hatten wurden die Untersuchungen der Chi-Quadrat-Tests und das geometrische Mittel der Weiten und die empirische Häufigkeit nur noch für den Zeitpunkt 0 und für die Strömungsgeschwindigkeit  $1500 \text{ s}^{-1}$  durchgeführt.

Insbesondere die stabile Plättchenadhäsion, die in den späteren Zeitpunkten (ZP 1 min. und 5 min.) auftritt, machte eine Auswertung, da eine geringe Abweichung zu erwarten war, nicht möglich. In der Literatur wird diese Plättchenadhäsion als zeitabhängig beschrieben (18). Zu so einem frühen Zeitpunkt wurde noch keine stabile Adhäsion beschrieben, so dass es hier sich um einen ersten Kontakt der Thrombozyten mit der kollagenen und somit thrombogenen Oberfläche handelt, die zunächst nicht zu einer stabilen Adhäsion führt.

Dieses Vorgehen wurde, allerdings nur für eine stabile Adhäsion, durch andere Arbeiten der Arbeitsgruppe bestätigt (Dissertationen Volker Thomas und Sabine Hellmig, Universität Düsseldorf, Institut für Hämostaseologie, Hämotherapie und Transfusionsmedizin) bekräftigt. Die Frage war, ob sich der Genotyp auf die Wegstrecke der Thrombozyten auswirkt. Da in dieser Arbeit die gemessenen Weiten ausgewertet wurden, konnte nun gezeigt werden, dass es eine Auswirkung auf die Mikromobilität der Thrombozyten gibt.

#### ***4.2 Untersuchung mittels Multitracker***

Auch diese automatisierte Auswertung zeigt eine weitere Laufstrecke der  $\alpha_2$  807 CC-Genotypgruppe im Vergleich zur  $\alpha_2$  807 TT-Genotypgruppe. Die statistische Auswertung mittels des Wilcoxon-Mann-Whitney-Test war nicht signifikant. Es zeigte sich ein Trend. Die Gründe hierfür sind nicht ganz ersichtlich. Da das Programm sich automatisch Objekte zwischen den Bildern suchte und als ein einziges sich bewegendes Objekt definierte, könnte es auch hier zu Fehlberechnungen durch falsche Zuordnung der Objekte gekommen sein. Somit war diese Untersuchung ungeeignet für die Beantwortung der Fragestellung.

#### ***4.3 Untersuchung mittels der Regressionsgeradenberechnung***

Die Untersuchungen, die mit den modifizierten Daten durchgeführt wurden zeigten, dass das Bestimmtheitsmaß sank und somit die Regressionsgerade die Punktwolke nicht mehr ausreichend „gut“ beschrieb. Lediglich die Berechnung ohne Einschränkung und die Einschränkung für Länge > 2 Pixel ergab einen relevanten Unterschied von 4,7 % und 5,2%. Dies bedeutete das die Geraden der  $\alpha_2$  807 CC-Genotypen ein 4,7 % bzw. 5,2 % höhere Steigung als die der  $\alpha_2$  807 TT-Genotypen. Dies kann als Hinweis auf eine längere Wegstrecke der CC-Genotypen interpretiert werden.

#### ***4.4 Untersuchung mittels Chi-Quadratstest***

Anhand der Chi-Quadratstestungen (Tab 7, 8, 9) konnte man eine leichte Tendenz einer längeren Länge der  $\alpha_2$  807 CC-Genotypgruppe gegenüber der  $\alpha_2$  807 TT-Genotypgruppe erkennen (Tab. 9). Die Untersuchung der Flächenunterschiede zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen, was die Interpretation der späteren Untersuchungen der geometrischen Mittel unterstützt, dass es zu einer Verlängerung der Wegstrecke der Thrombozyten kommt und primär nicht zu einer verstärkten Thrombenbildung. Diese müsste sich ja dann in vergrößerten Flächen in der  $\alpha_2$  807 TT-Gruppe zeigen.

Die Bedeutung der Signifikanz der Höhenunterschiede (Tab.8) bleibt unklar.

Der Chi-Quadrat-Test zeigte nun einen qualitativen Unterschied zwischen den beiden Genotypgruppen.

#### ***4.5 Untersuchung mittels der empirischen Verteilungsfunktion***

Wie man in der Abb. 14 erkennt, zeigt sich ein Unterschied im Vergleich der Längen zwischen den Platten der beiden Genotypen  $\alpha_2$  807 TT und  $\alpha_2$  807 CC. So hat die  $\alpha_2$  807 TT-Gruppe eine Verteilung, die erkennen lässt, dass sie im Mittel eine kürzere Weite zurückgelegt haben.

#### ***4.6 Untersuchung mittels des geometrischen Mittels***

Das geometrische Mittel lässt auch sehr feine Unterschiede zwischen Vergleichsgruppen erkennen und kann quantifizierbare Ergebnisse bringen.

Hierbei wurden die beiden Genotypen auf ihre Weite verglichen und es zeigte sich ein Unterschied von ca. 5%. Dieser war signifikant.

Durch diese Untersuchung war es nun möglich, eine quantitative Aussage zu treffen. Aufgrund der nur geringen Unterschiede in der phänotypischen und klinischen Ausprägung des Polymorphismus bedarf es einer solchen Methode, die diese feine Unterschiede nachweisen kann. Somit unterstützt dieses Ergebnis auch die klinischen Studien in ihrer Feststellung, dass es lediglich einen geringen Effekt auf die Thrombogenität hat.

#### **4.7 Auswirkung des Polymorphismus auf die Mikromobilität der Thrombozyten**

Die Mechanismen des initialen Kontakts der Thrombozyten und die darauf folgende Transformation wurde vielfach geschildert (22-26). Es wird beschrieben, dass es zunächst zu einem „Tethering“ der Thrombozyten an der thrombogenen, in diesem Fall also der kollagenen Oberfläche kommt. Dieser initiale Kontakt ist zunächst nicht stabil und führt zu einem Formwandel der Thrombozyten. Sie bleiben über Rezeptoren, z.B. über den vWF- GP Ib –Mechanismus oder GP VI, an der kollagenen Oberfläche kleben. Dieser initiale Kontakt ist allerdings nicht stabil und führt zu einem Abreißen der Thrombozyten unter hämorrheologischen Bedingungen.

Allerdings resultiert dieser Kontakt in einer Aktivierung der Thrombozyten. Das Augenmerk lag nun darauf, ob sich diese Wegstrecke der Thrombozyten in Abhängigkeit von dem  $\alpha_2\beta_1$  – Polymorphismus verändert. Aus Adhäsionsstudien war bekannt, dass der  $\alpha_2$  807 TT- Genotyp zu einer verstärkten Adhäsion führt (19). Des Weiteren ist bekannt, dass der  $\alpha_2\beta_1$ - Rezeptor die initiale Phase der stabilen Thrombozytenadhäsion vermittelt. Die Bewegung der Thrombozyten bezeichneten wir als Micromobilität, da es weder eine stabile Adhäsion ist, die wir untersuchten, noch das Tethering. (45, 49). Die Kombination aus passiven Scherkräften und aktiven zytoskeletalen Prozessen (49, 24, 81) erzeugt die oben beschriebene Bewegung. In späteren Phasen kommt es allerdings zu einer stabilen Adhäsion über sekundäre und tertiäre Prozesse.

Die ersten Versuche mittels Regressionsgeradenberechnung und der Chi-Quadrat-Untersuchungen brachten den Hinweis, dass es eine Differenz zum ZP 0 und für die Scherrate  $1500\text{ s}^{-1}$  gibt. Allerdings konnte aus diesen Untersuchungen nur eine qualifizierende Aussage getroffen werden. Diese Ergebnisse deckten sich mit der Betrachtung der empirischen Verteilungsfunktion. Erst der Vergleich der geometrischen Mittel erlaubt eine Quantifizierung. So zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Wegstrecke der Thrombozyten in Abhängigkeit von den Genotypen  $\alpha_2$  807 TT und  $\alpha_2$  807 CC von  $0,16\text{ }\mu\text{m}$  ( $p < 0,05$ ).

Dies deckt sich mit der Beobachtung in klinischen Studien, die lediglich einen kleinen Unterschied, der signifikant war, feststellten (siehe Kap. 1.4.2).

Somit sind auch die hier beschriebenen Beobachtungen in Einklang mit der gegenwärtigen Studienlage in Einklang.

#### **4.8 Ausblick und klinische Relevanz der Ergebnisse**

Wie hier festgestellt wird, ist die  $\alpha_2$  807 TT-Variante des Integrinrezeptors  $\alpha_2\beta_1$  ein prothrombotischer Faktor. Die klinische Bedeutung ist eher als gering einzustufen, da es mehrere Kollagenrezeptoren gibt deren Blockierung größere Auswirkung auf die Hämostase haben. Dies zeigt sich unter anderem in den widersprüchlichen klinischen Studienergebnissen (Tab 1.) Da allerdings auch das Myocardinfarktrisiko und das Schlaganfallrisiko in der 807-TT-Gruppe erhöht war (29, 32) ist es denkbar, dass ein selektiver Blocker des Integrinrezeptors  $\alpha_2\beta_1$  hier das Risiko senken könnte bei einer geringen Erhöhung der Gefahr der Blutung (27). Interessanterweise ist die Dichte des Integrinrezeptors  $\alpha_2\beta_1$  kein Risikofaktor für eine venöse Thrombose (34, 36), so dass man hier ein Medikament hätte, welches selektiv prophylaktisch auf arterielle Erkrankungen mit okklusiven Thromben wirken würde. Studien diesbezüglich sind schon im Gange (37).

Ein Sulfonamidderivat kann die kollagenspezifische, metallionen abhängige Bindungsstelle der  $\alpha_2$ -Domäne erkennen und die Kollagenbindung von Zellen über den  $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptor inhibieren. In dieser Studie zeigt sich auch, dass es dieses Sulfonamidderivat namens BTT-3016 in-vitro die Plättchenaggregation bei Menschen stark hemmt und es bei Mäusen in vivo zu einer Inhibition der Thrombusbildung an einer arteriellen Blutung kommt. Dabei ist die Blutungszeit der Mausschwänze bei einer Verletzung unter Gabe des BTT-3016 vergleichbar wie unter der Gabe von Aspirin (37).

Nissinen et al. folgerten daraus, dass BTT-3016 zwar kollagenspezifische Plättchenaktivität hemmt und das Thrombuswachstum verringert, die primäre Hämostase allerdings nicht stärker beeinflusst als Aspirin (37).

Die Natur hat diese Idee schon vor uns realisiert (38). Die afrikanische Zeckenart *Ornithodoros Moubata* verwendet ein Protein, das im Verdacht steht den  $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptor zu blockieren.

Allerdings ist zu beachten, dass die hier ausgewählten Blutspender aus der kaukasischen Bevölkerung stammen und es Unterschiede zwischen den ethnischen Bevölkerungsgruppen geben kann, was die unterschiedliche Studienlage erklären könnte (33). Somit wäre auch hier ein weiterer Ansatzpunkt gegeben den Unterschied zwischen den beiden Genotypen experimentell genauer darzustellen.

In unseren Experimenten verwendeten wir Kollagen Typ I. Aus Untersuchungen, weiß man aber, dass der  $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptor auch mit anderen Kollagentypen reagieren kann, so dass hier auch eine Option der Untersuchung gegeben ist (39, 42).

Die hier angewendeten Verfahren könnte auch auf Fibrinogenrezeptoren-Polymorphismen angewendet werden (43, 44).

Sollten weitere Studien erhärten, dass sich die prothrombotische Eigenschaft des  $\alpha_2$  807 TT-Variante des Integrinrezeptors  $\alpha_2\beta_1$ , neben klassischen Risikofaktoren, ein weiterer Risikofaktor für eine arterielle thrombotische Erkrankung, wie z.B. ein Myokardinfarkt, sein, so könnte nach genetischer Determinierung eine prophylaktische Einnahme von Acetylsalicylsäure oder eines spezifischen Inhibitors des Integrinrezeptors  $\alpha_2\beta_1$ , wenn ein solcher zur klinischen Anwendung gelangt, angedacht werden.

## 5. Literaturliste

1. Statistisches Bundesamt (Hrsg.) Gesundheitswesen, Todesursachen Deutschland 2008. Fachserie 12 / Reihe 4, Kap. 2.1.3.
2. O'donell Framingham Heart Study : Genetic and enviromental contributions to platelet aggregation : the framingham Heart Study.
3. Moshfegh K1, Wuillemin WA, Redondo M, Lämmle B, Beer JH, Liechti-Gallati S, Meyer BJ. Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study. *Lancet*. 1999 Jan 30;353(9150):351-354.
4. Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Houdijk WP, Sixma JJ. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature*. 1985 Dec 5-11;318(6045):470-472.
5. Kamiguti A, Theakston R., Watson S.: Distinct contribution of glycoprotein VI and  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin to the Induction of platelet protein tyrosine phosphorylation and aggregation. *Arch.biochem.Biophys*. 2000, 374, 356-362.
6. <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/multitracker.html>.
7. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*. 1998. Sep 4;94(5):657-666.
8. Lorez HP, 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- Jan;89(1):200-206.
9. Read NG, Trist DG. The uptake of mepacrine by horse polymorphonuclear leucocytes in vitro. *J Pharm Pharmacol*. 1982. Nov;34(11):711-714.
10. Müller-Berghaus G, Pötzsch B. Hämostaseologie, molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik. 1999. Springer Berlin Heidelberg.
11. Gawaz M. Das Blutplättchen-Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung. 1999 Georg Thieme Verlag Stuttgart.
12. Ruggeri ZM. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemostas*. 1997; 78(1):611-616.
13. Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV. Platelets and shear stress. *Blood*. 1996. 88(5):1525-1541.
14. Ikeda Y, Handa M, Kawano K. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J clinical investigation*. 1991. 87(4):1234-1240.

15. Petersen DM, Stathopoulos NA. Shear-induced platelet aggregation requires von Willebrand factor and platelet membrane Ib and IIb-IIIa. *Blood*. 1987. 69(2):625-628.
16. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost*. 2001. 86:189-197.
17. Jung SM, Moroi M. Platelets interact with soluble and insoluble through characteristically different reactions. *J Biol Chem*. 1998. 273:14827-14837.
18. Verkleij M, Morton L, Knight C. Simple collagen-like peptides support platelet adhesion under static but not under flow conditions: interaction via  $\alpha_2\beta_1$  and von Willebrand factor with specific sequences in native collagen is a requirement to resist shear forces. *Blood*. 1998. May 15;91(10):3808-3816.
19. Kritzik M, Savage B, Nugent DJ, Santoso S, Ruggeri ZM, Kunicki TJ. Nucleotide polymorphisms in the  $\alpha_2$  gene define multiple alleles that are associated with differences in platelet  $\alpha_2\beta_1$  density. *Blood*. 1998. Oct 1;92(7):2382-2388.
20. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood*. 2000. 95:1517-1532.
21. Zotz RB, Scharf R. Thrombozytäre Rezeptorpolymorphismen und ihre Bedeutung bei kardiovaskulären Erkrankungen. *LaboratoriumsMedizin*. 2002. 26(11/12):584-593.
22. Mody N, Lomakin O, Dogget T. Mechanics of transient platelet adhesion to von Willebrand factor under flow. *Biophys J*. 2005. Feb;88(2):1432-1443.
23. Maxwell M, Westein E. Identification of a 2-stage platelet aggregation process mediating shear-dependent thrombus formation. *Blood*. 2007. Jan 15;109(2):566-576.
24. Yuan Y, Kulkarni B. The von Willebrand factor-Glycoprotein Ib/V/IX interaction induces Actin polymerization and cytoskeletal reorganization in rolling platelets and Glycoprotein Ib/V/IX-transfected cells. *J Biol Chem*. 1999. Dec 17;274(51):36241-36251.
25. Auger J, Kujipers M. Adhesion of human and mouse platelets to collagen under shear: a unifying model. *FASEB J*. 2005. May;19(7):825-827.
26. Reininger A, Heijnen HF. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood*. 2006. May 1;107(9):3537-3545.
27. Nieswandt B, Brakebusch C. Glycoprotein VI but not  $\alpha_2\beta_1$  integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J*. 2001. May 1;20(9):2120-2130.
28. Kunicki T, Orchowski R. Variability of integrin  $\alpha_2\beta_1$  activity on human platelets. *Blood*. 1993. Nov 1;82(9):2693-2703.

29. Santoso S, Kunicki TJ Association of the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients. *Blood*. 1999. Apr 15;93(8):2449-2453.
30. Moshfegh K, Wuillemin WA. Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study. *Lancet*. 1999. Jan 30;353(9150):351-354.
31. Roest M, Banga JD. 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. Oct 3;102(14):1645-1650.
32. Carlsson LE, Santoso S. The alpha2 gene coding sequence T807/A873 of the platelet collagen receptor integrin alpha2beta1 might be a genetic risk factor for the development of stroke in younger patients. *Blood*. 1999. Jun 1;93(11):3583-3586.
33. Matsubara Y, Murata M. Association between diabetic retinopathy and genetic variations in alpha2beta1 integrin, a platelet receptor for collagen. *Blood*. 2000. Mar 1;95(5):1560-1564.
34. Corral J, Gonzalez-Conejero R. Role of the 807 C/T polymorphism of the alpha2 gene in platelet GP Ia collagen receptor expression and function -effect in thromboembolic diseases. *Thromb Haemost*. 1999. Jun;81(6):951-956.
35. Carlsson LE, Potzsch B. The GPIa-C807T polymorphism on the platelet collagen receptor GPIa-IIa and the development of deep vein thrombosis. *Thromb Haemost*. 1999. 82 (suppl):254.
36. Dinauer DM, Friedman KD. Allelic distribution of the glycoprotein Ia (alpha2-integrin) C807T/G873A dimorphisms among caucasian venous thrombosis patients and six racial groups. *Br J Haematol*. 1999. Dec;107(3):563-565.
37. Nissinen L, Pentikäinen OT, Jouppila A. A small-molecule inhibitor of integrin alpha2 beta1 introduces a new strategy for antithrombotic therapy. *Thromb Haemost*. 2010. Feb;103(2):387-397.
38. Francischetti IM. Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. *Toxicon*. 2009. Dec 24.
39. Pischel KD, Bluestein HG, Woods VL Jr. Platelet glycoproteins Ia, Ic, and IIa are physicochemically indistinguishable from the very late activation antigens adhesion-related proteins of lymphocytes and other cell types. *J Clin Invest*. 1988. Feb;81(2):505-513.
40. Santoro SA, Rajpara SM, Staatz WD, Woods VL Jr. Isolation and characterization of a platelet surface collagen binding complex related to VLA-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988. May 31;153(1):217-223.
41. Takada Y, Wayner EA, Carter WG, Hemler ME. Extracellular matrix receptors, ECMRII and ECMRI, for collagen and fibronectin correspond to VLA-2 and VLA-3 in the VLA family of heterodimers. *J Cell Biochem*. 1988. Aug;37(4):385-393.



42. Saelman EU, Nieuwenhuis HK, Hese KM, de Groot PG. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood*. 1994. Mar 1;83(5):1244-1250.
43. Loncar R, Stoldt V, Hellmig S, Zotz RB, Mihalj M, Scharf RE. HPA-1 polymorphism of alphaIIb beta3 modulates platelet adhesion onto immobilized fibrinogen in an in-vitro flow system. *Thromb J*. 2007. Feb 19;5:2.
44. Loncar R, Kalina U, Stoldt V, Thomas V, Scharf RE, Vodovnik A. Antithrombin significantly influences platelet adhesion onto immobilized fibrinogen in an in-vitro system simulating low flow. *Thromb J*. 2006. Oct 13;4:19.
45. Mody NA, Lomakin O, Doggett TA, Diacovo TG, King MR. Mechanics of transient platelet adhesion to von Willebrand factor under flow. *Biophys J*. 2005. Feb;88(2):1432-1443.
46. Doggett TA, Girdhar G, Lawshé A, Schmidtke DW. Selectin-like kinetics and biomechanics promote rapid platelet adhesion in flow: the GPIb(alpha)-vWF tether bond. *Biophys J*. 2002. Jul;83(1):194-205.
47. Yuan Y, Kulkarni S, Ulsemer P, Cranmer SL. The von Willebrand factor-glycoprotein Ib/V/IX interaction induces actin polymerization and cytoskeletal reorganization in rolling platelets and glycoprotein Ib/V/IX-transfected cells. *J Biol Chem*. 1999. Dec 17;274(51):36241-36251.
48. Yuan Y, Dopheide SM, Ivanidis C, Salem HH, Jackson SP. Calpain regulation of cytoskeletal signaling complexes in von Willebrand factor-stimulated platelets. Distinct roles for glycoprotein Ib-V-IX and glycoprotein IIb-IIIa (integrin alphaIIb beta3) in von Willebrand factor-induced signal transduction. *J Biol Chem*. 1997. Aug 29;272(35):21847-21854.
49. Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, Matsui H, Mizuno T, Miyata S, Yoshioka A. Platelet shape changes and adhesion under high shear flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002. Feb 1;22(2):329-334.
50. Wu KK, Aleksic N. Platelet glycoprotein polymorphism and risk for coronary heart disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1999. Feb;10 Suppl 1:S63-65.
51. Malone PC, Agutter PS. The aetiology of deep venous thrombosis. *QJM*. 2006. Sep;99(9):581-593.
52. Chung I, Lip GY. Virchow's triad revisited: blood constituents. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2004. Dec;33(5-6):449-454.
53. Jerjes-Sanchez C. Venous and arterial thrombosis: a continuous spectrum of the same disease? *European Heart Journal*. 2005. 26, 3-4.
54. Prandoni P, Bilora F, Marchiori A. An association between atherosclerosis and venous thrombosis. *N Engl J Med* 2003;348:1435-1441.

55. Turitto VT. Blood viscosity, mass transport, and thrombogenesis. *Prog Hemost Thromb.* 1982. 6:139-177.
56. Chow TW, Hellums JD, Moake JL, Kroll MH. Shear stress-induced von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib initiates calcium influx associated with aggregation. *Blood.* 1992. Jul 1;80(1):113-120.
57. Goto S, Salomon DR, Ikeda Y, Ruggeri ZM. Characterization of the unique mechanism mediating the shear-dependent binding of soluble von Willebrand factor to platelets. *J Biol Chem.* 1995. Oct 6;270(40):23352-23361.
58. Badimon L, Badimon JJ, Penny W, Webster MW, Chesebro JH, Fuster V. Endothelium and atherosclerosis. *J Hypertens Suppl.* 1992. Apr;10(2):S43-50.
59. Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol.* 2000. Mar;89(3):160-167.
60. Ross R, Glomset J. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* 1973. 180 (93): 1332-1339.
61. Goldstein JL, Brown MS. Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism.* 1977. 26: 1257-1275.
62. Dancu MB, Berardi DE, Vanden Heuvel JP, Tarbell JM. Asynchronous shear stress and circumferential strain reduces endothelial NO synthase and cyclooxygenase-2 but induces endothelin-1 gene expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004. Nov;24(11):2088-2094.
63. Kimura S, Sawada T. Understanding the essential role of monocytes in atherosclerosis. *Circ J.* 2010. 74(7):1292-1293.
64. Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res.* 2004. Jun;45(6):993-1007.
65. Hansson, G. K. and P. Libby. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2006. 6(7): 508-519.
66. Lowe GD. Virchow's triad revisited: abnormal flow. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2004. Dec;33(455-7).
67. Clemetson KJ. Platelet activation: signal transduction via membrane receptors. *Thromb Haemost.* 1995. Jul;74(1):111-116.
68. Scharf RE: Thrombozytäres System. In: Ostendorf PC, Seeber S: *Hämatologie, Onkologie.* 1997, 1. Aufl., S 50-64, Urban & Schwarzenberg. München.
69. Löwenberg EC, Meijers JC, Levi M. Platelet-vessel wall interaction in health and disease. *Neth J Med.* 2010. Jun;68(6):242-251.

70. Colman RW, Hirsh J, George JN. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 2001. 4th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins.
71. Nurden AT, Nurden P. Advantages of fast-acting ADP receptor blockade in ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003. Feb 1;23(2):158-159.
72. Zhenyu Li; M. Keegan Delaney; Kelly A. O'Brien; Xiaoping Du .Signaling During Platelet Adhesion and Activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2010. 30:2341.
73. Hynes, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992. 69, 11–25.
74. Zutter MM, Santoro S. Widespread histologic distribution of the alpha 2 beta 1 integrin cell-surface collagen receptor. *Am J Pathol.* 1990. July; 137(1): 113–120.
75. Jung S, Moroi M. Activation of the Platelet Collagen Receptor Integrin  $\alpha 2\beta 1$  Trends in Cardiovascular Medicine. 2000. Volume 10, Issue 7, Pages 285-292.
76. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood.* 2000. Mar 1;95(5):1517-1532.
77. Van de Walle GR, Vanhoorelbeke K, Majer Z, Illyés E, Baert J, Pareyn I, Deckmyn H. Two functional active conformations of the integrin  $\alpha 2\beta 1$ , depending on activation condition and cell type. *J Biol Chem.* 2005. Nov 4;280(44):36873-36882.
78. Humphries MJ. Integrin structure. *Biochem Soc Trans.* 2000. 28(4):311-339.
79. Jung SM, Moroi M. Activation of the platelet collagen receptor integrin  $\alpha(2)\beta(1)$ : its mechanism and participation in the physiological functions of platelets. *Trends Cardiovasc Med.* 2000. Oct;10(7):285-292.
80. Savage B, Saldívar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell.* 1996. Jan 26;84(2):289-297.
81. Maxwell MJ, Dopheide SM, Turner SJ, Jackson SP. Shear induces a unique series of morphological changes in translocating platelets: effects of morphology on translocation dynamics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006. Mar;26(3):663-669.
82. Goldsmith HL, Mason SG. Axial Migration of Particles in Poiseuille Flow. *Nature.* 1961. 190, 1095 – 1096.
83. Goldsmith HL, Cokelet GR, Gaehtgens P. Robin Fåhræus: Evolution of his concepts in cardiovascular physiology. *Am J Physiol.* 1989. Sep;257(3 Pt 2):H1005-1015.
84. Mangin P, Yuan Y, Goncalves I, Eckly A, Freund M, Cazenave JP, Gachet C, Jackson SP, Lanza F. Signaling role for phospholipase C  $\gamma 2$  in platelet glycoprotein Ib  $\alpha$  calcium flux and cytoskeletal reorganization. Involvement of a pathway distinct from FcR  $\gamma$  chain and Fc  $\gamma$  RIIA. *J Biol Chem.* 2003. Aug 29;278(35):32880-32891.

85. Nikolopoulos GK, Tsantes AE, Bagos PG, Travlou A, Vaiopoulos G. Integrin, alpha 2 gene C807T polymorphism and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Thromb Res.* 2007.119(4):501-510.
86. Ye Z, Liu EH, Higgins JP, Keavney BD, Lowe GD, Collins R, Danesh J. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet.* 2006. Feb 25;367(9511):651-658.
87. Corral J, González-Conejero R, Rivera J, Ortuño F, Aparicio P, Vicente V. Role of the 807 C/T polymorphism of the alpha2 gene in platelet GP Ia collagen receptor expression and function--effect in thromboembolic diseases. *Thromb Haemost.* 1999. Jun;81(6):951-956.
88. Croft SA, Hampton KK, Sorrell JA, Steeds RP, Channer KS, Samani NJ, Daly ME. The GPIa C807T dimorphism associated with platelet collagen receptor density is not a risk factor for myocardial infarction. *Br J Haematol.* 1999. Sep;106(3):771-776.
89. Morita H, Kurihara H, Imai Y, Sugiyama T, Hamada C, Sakai E, Mori M, Nagai R. Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and myocardial infarction in Japanese. An approach entailing melting curve analysis with specific fluorescent hybridization probes. *Thromb Haemost.* 2001. Feb;85(2):226-230.
90. Anvari A, Janisiw M, Türel Z, Huber K, Fischer G, Panzer S. Platelet glycoprotein Ia gene dimorphism alpha2-807 in malignant arrhythmia in coronary artery disease. *Thromb Res.* 2000. May 15;98(4):281-286.
91. Sacchi E, Tagliabue L, Duca F, Landi G, Martinelli I, Mannucci PM. A C807T substitution in the coding sequence of the platelet collagen receptor integrin 1 as a genetic risk factor for stroke in young patients. *Thromb Haemost.* 1999. 82. (Suppl):848.
92. Reiner AP, Kumar PN, Schwartz SM, Longstreth WT Jr, Pearce RM, Rosendaal FR, Psaty BM, Siscovick DS. Genetic variants of platelet glycoprotein receptors and risk of stroke in young women. *Stroke.* 2000. 31:1628–1633.
93. Hessner MJ, Dinauer DM, Luhm RA, Endres JL, Montgomery RR, Friedman KD. Contribution of the glycoprotein Ia 807TT, methylene tetrahydrofolate reductase 677TT and prothrombin 20210GA genotypes to prothrombotic risk among factor V 1691 GA (Leiden) carriers. *Br J Haematol.* 1999. 106:237–239.
94. Von Beckerath N, Koch W, Mehilli J, Böttiger C, Schömig A, Kastrati A. Glycoprotein Ia gene C807T polymorphism and risk for major adverse cardiac events within the first 30 days after coronary artery stenting. *Blood.* 2000. Jun 1;95(11):3297-3301.
95. Kunicki TJ. The influence of platelet collagen receptor polymorphisms in hemostasis and thrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002. Jan;22(1):14-20.

96. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Vaiopoulos G, Travlou A. Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2007. May 31;118(2):189-196.
97. Chen J, Diacovo TG, Grenache DG, Santoro SA, Zutter MM. The alpha(2) integrin subunit-deficient mouse: a multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis. *Am J Pathol.* 2002. Jul;161(1):337-344.
98. Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Houdijk WP, Sixma JJ. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature.* 1985. Dec 5-11;318(6045):470-472.
99. Nieuwenhuis HK, Sakariassen KS, Houdijk WP, Nievelstein PF, Sixma JJ. Deficiency of platelet membrane glycoprotein Ia associated with a decreased platelet adhesion to subendothelium: a defect in platelet spreading. *Blood.* 1986. Sep;68(3):692-695.
100. Jung SM, Moroi M. Platelet collagen receptor integrin alpha2beta1 activation involves differential participation of ADP-receptor subtypes P2Y1 and P2Y12 but not intracellular calcium change. *Eur J Biochem.* 2001. Jun;268(12):3513-3522.
101. Inoue O, Suzuki-Inoue K, Dean WL, Frampton J, Watson SP. Integrin alpha2beta1 mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLCgamma2. *J Cell Biol.* 2003. Mar 3;160(5):769-780.
102. Suzuki-Inoue K, Yatomi Y, Asazuma N, Kainoh M, Tanaka T, Satoh K, Ozaki Y. Rac, a small guanosine triphosphate-binding protein, and p21-activated kinase are activated during platelet spreading on collagen-coated surfaces: roles of integrin alpha(2)beta(1). *Blood.* 2001. Dec 15;98(13):3708-3716.
103. Hartwig JH. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *J Cell Biol.* 1992. Sep;118(6):1421-1442.
104. Riondino S, Gazzaniga PP, Pulcinelli FM. Convulxin induces platelet shape change through myosin light chain kinase and Rho kinase. *Eur J Biochem.* 2002. Dec;269(23):5878-5884.
105. Gawaz M, Pötsch B, Madlener K. *Hämostaseologie.* 2010. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
106. Phillips DR, Teng W, Arfsten A, Nannizzi-Alaimo L, White MM, Longhurst C, Shattil SJ, Randolph A, Jakubowski JA, Jennings LK, Scarborough RM. Effect of Ca<sup>2+</sup> on GP IIb-IIIa interactions with integrilin: enhanced GP IIb-IIIa binding and inhibition of platelet aggregation by reductions in the concentration of ionized calcium in plasma anticoagulated with citrate. *Circulation.* 1997. Sep 2;96(5):1488-1494.
107. Egbertson MS, Chang CT, Duggan ME, Gould RJ, Halczenko W, Hartman GD, Laswell WL, Lynch JJ Jr, Lynch RJ, Manno PD. Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 2. Optimization of a tyrosine template as a mimic for Arg-Gly-Asp. *J Med Chem.* 1994. Aug 5;37(16):2537-2551.

108. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012. Aug;32(8):1777-1783.
109. Hamer JD, Malone PC, Silver IA. The PO2 in venous valve pockets: its possible bearing on thrombogenesis. *Br J Surg* 1981. Mar;68(3):166-170.
110. Brill A, Fuchs TA, Chauhan AK, Yang JJ, De Meyer SF, Köllnberger M, Wakefield TW, Lämmle B, Massberg S, Wagner DD. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood.* 2011. Jan 27;117(4):1400-1407.
111. von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Köllnberger M, Byrne RA. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med.* 2012. Apr 9;209(4):819-835.
112. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004. Mar 5;303(5663):1532-1535.
113. Goldsmith HL, Turitto VT. Thromb Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-Report--Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis. *Haemost.* 1986. Jun 30;55(3):415-435.
114. Zotz RB, Winkelmann BR, Müller C, Boehm BO, März W, Scharf RE. Association of polymorphisms of platelet membrane integrins alpha IIb(beta)3 (HPA-1b/PI) and alpha2(beta)1 (alpha807TT) with premature myocardial infarction. *J Thromb Haemost.* 2005. Jul;3(7):1522-1529.
115. Scharf RE (ed): *Acquired Platelet Function Defects: An Underestimated but Frequent Cause of Bleeding Complications in Clinical Practice. Progress and Challenges in Transfusion Medicine, Hemostasis and Hemotherapy.* 2008. pp 296-316.

## 6. Zusammenfassung

„Modell zur Charakterisierung der Mikromobilität von Thrombozyten an Kollagen I unter arteriellen Strömungsbewegungen in der Strömungskammer.“

Aufgrund der zentralen pathophysiologischen Rolle der Thrombozyten bei kardiovaskulären Ereignissen (z.B. Myokardinfarkt, Apoplexie) stellen Polymorphismen thrombozytärer Rezeptoren, welche die Thrombozyten betreffen, potentielle Einflußfaktoren dar. Kunicki et al. fanden Polymorphismen im Gen des Kollagenrezeptors (ITGA). Die DNA-Sequenzvarianten beinhalten zwei stumme Mutationen in Position 807 und 873. Der Polymorphismus des  $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptorgens in der Basenposition 807 bewirkt eine unterschiedliche Expressionshöhe dieses Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche, so korreliert die  $\alpha_2807TT$  Variante mit einer gesteigerten Zelloberflächen-Expression. Dies hat funktionelle Konsequenzen, da eine erhöhte Dichte eine erhöhte Adhäsion bewirkt. Klinische Studien zeigten jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Einige Studien beschrieben ein erhöhtes Risiko eines arteriothrombotisches Geschehens (wie z.B. MI). Dieses könnte auf eine erhöhte Adhäsivität des TT-Genotypen hinweisen, da in der Abfolge des Ereignisses nach einer Gefäßläsion die gesteigerte Adhäsivität des  $\alpha_2TT$ -Genotypen zu einer veränderten Laufstrecke der Thrombozyten an der thrombogenen Oberfläche führen könnte.

Ziel dieser Arbeit war, das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten im Vollblut an Kollagen unter flußdynamischen Bedingungen in vitro phänomenologisch und quantitativ zu beschreiben. Beim zeitlichen Verlauf dieser Adhäsion sollten Bewegungsphänomene identifiziert werden, die beim Vergleich zwischen  $\alpha_2807CC$  und  $\alpha_2807TT$  als mögliche Laufstreckendifferenz der Genotypen in Erscheinung treten könnten und somit eine funktionelle Beziehung zwischen gesteigerter Expression und Thrombogenität abbilden würden.

Die Thrombozyten in PPACK (D-Phenylalanyl-L-Prolyl-L-Arginin Chloromethyl Keton) antikoaguliertem Vollblut wurden mit Mepacrin fluoreszenzmarkiert, um sie bei der Bildakquisition im konfokalen Laserscanningmikroskop über ihre Fluoreszenzhöhe zu erfassen. Dazu wurden die Blutproben mittels einer Perfusorpumpe durch in eine kollagenbeschichtete (Kollagen Typ 1) Strömungskammer geleitet. Es wurden dabei Scherraten von  $50 - 1500 \text{ s}^{-1}$  appliziert, wobei eine Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$  arterielle Bedingungen repräsentiert. Die aufgenommenen Bilder wurden zu Bildstapeln zusammengefasst und erlaubten eine räumliche Analyse der Thrombogenese. Aufgrund des zeitlichen Abstands der Bilder stellte ein Bildstapel auch die Repräsentation eines zeitlichen Verlaufes dar.

Zur Beurteilung der Bewegung wurden die folgenden statistischen Methoden eingesetzt: Regressionsgeradenanalyse, Chi-Quadrat Testungen, empirische Verteilungsfunktion und die Berechnung des geometrischen Mittels. Des Weiteren wurde die Multitracker-Funktion in der Software ImageJ durch eine Anwenderoutine (Makro) weiterentwickelt, um in Anschluss der Bildauswertung die Genotypen durch den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zu vergleichen. Der Vergleich der geometrischen Mittel erlaubte letztendlich eine Quantifizierung der Bewegung und eine Bestimmung der Laufstreckendifferenz. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Wegstrecke der Thrombozyten in Abhängigkeit von den Genotypen  $\alpha_2807TT$  und  $\alpha_2807CC$  von  $0,16 \mu\text{m}$  ( $p < 0,05$ ) bei einer Scherrate von  $1500 \text{ s}^{-1}$ . Dieser Befund ist der erste Beleg für eine erhöhte Adhäsivität des TT-Genotyps.

Die in dieser Arbeit verwendeten und analysierten Strömungsbedingungen entsprechen denen, die in Arterien herrschen. Die erhöhte Adhäsivität des TT-Genotypus unter diesen Strömungsbedingungen passt in die klinische Studienlage, welche einen Einfluss des Genotypus auf Erkrankungen im Spektrum arteriell-thrombotischer Erkrankungen zeigen.

## 7. Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger E. Scharf für die freundliche Überlassung des Themas.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Volker Stoldt, der mir immer hilfreich zur Seite stand.

Vielen Dank an meinen Bruder und an meine Mutter für die Unterstützung , die sie mir immer gegeben haben.

Meiner Frau Nicole Hansen danke ich von ganzem Herzen für die hilfreichen Worte und Unterstützung, die sie mir jeden Tag gibt. Ich liebe dich von ganzem Herzen.



## 8. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
CD40L	CD40 Ligand
CI	Konfidenzintervall
COX 2	Cyclooxygenasen
Cys	Cystein
EGF	Endothelial Growth Factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK2	Extracellular Signal-regulated Kinase 2
GDP	Guanosindiphosphat
GIF	Graphics Interchange Format
GP	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
HPA-1	Human Platelet Antigen-1
IHTM	Institut für Hamostaseologie und Transfusionsmedizin
ITGA	Integrin alpha
ITGB3	Integrin Beta 3 Gen
JPEG	Joint Photographic Experts Group Format
KHK	Koronare Herzkrankheit
LIBS	Ligand Induced Binding Sites
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
Max	Maximum
MED	Median
MI	Myokardinfarkt
MIDAS	Metal-Ion-Dependent-Adhesion-Site
Min	Minimum

min.	Minute
MLCK	Myosin Light-Chain Kinase
MW	Mittelwert
Mm	mikrometer
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate Buffer Solution
PGI	Prostaglandin I
PLT	Plättchen
PNG	Portable Network Graphics
PKC	protein kinase C
pp125FAK	pp125 Focal Adhesion Kinase
PPACK	D-Phenylalanyl-L-Prolyl-L-Arginin Chloromethyl Keton
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
PTCA	Perkutane Transluminale Koronarangioplastie
P2Y1	P2Y purinoceptor 1
P2Y12	P2Y purinoceptor 12
RGD-Sequenz	Arginin-Glycin-Aspartat-Sequenz
SD	Standardabweichung
Sek,	Sekunde
SEM	Standardmessfehler
Src	Tyrosinkinase Src
TNF	Tumornekrosefaktor
TxA2	Thromboxan-Synthase
vWF	Von-Willebrand-Faktor

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Vor- und Nachname

2.7.2014 AKSEL HANSEN

Unterschrift

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Hansen', written in a cursive style.