

Anatomisches Institut
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Gratzl)

**Plättchenfunktion- und morphologie bei Patienten mit *hyper-* und
hyporeaktivem Hämostasesystem und bei
Membranrezeptorblockade**

Jens D. Agneskirchner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Techni-
schen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. L. J. Wurzinger,
Ludwig Maximilian Universität München

2. Univ.-Prof. Dr. F.- J. M. Neumann

3. Univ.-Prof. Dr. M. Gratzl,
Ludwig Maximilian Universität München

Die Dissertation wurde am 31.3.2000 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am
06.12.2000 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung und Fragestellung	1
2 Material und Methode	8
2.1 Untersuchte Personengruppen	8
2.1.1 Patienten mit arterieller Verschlusskrankheit (AVK)	
2.1.2 Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI)	8
2.1.3 Patienten mit Blutungsneigung und Verdacht auf von Willebrand´sche Erkrankung (vWD)	9
2.1.4 Gesunde Kontrollpersonen	9
2.2 Herstellung und Präparation der Plasmaproben	12
2.2.1 Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP)	12
2.2.2 In vitro - Inhibition von Plättchenmembranrezeptoren	12
2.2.3 Therapeutische Inhibition von Plättchenmembranrezeptoren bei AMI-Patienten	13
2.3 Das Staupunkt-Adhäsio-Aggregometer (SPAA) als experimentelles Strömungsmodell	14
2.3.1 Aufbau des SPAA	14
2.3.2 Beströmte Oberflächen	17
2.3.3 Strömungsexperimente mit dem SPAA	17
2.3.4 Quantifizierung der Plättchenadhäsion	18
2.4 Morphometrie der Plättchenadhäsion	20
2.4.1 Fixierung und Färbung der Präparate	20
2.4.2 Auswahl einer repräsentativen Stichprobe der adhärenenten Thrombozyten	21
2.4.3 Interferenzreflexionskontrastmikroskopie (IRCM)	22
2.4.4 Rechnergestützte interaktive Morphometrie	24
2.4.5 Verwendung der inversen Circularität ($1/C$) als Shape Index (SI) zur morphologischen Charakterisierung der Plättchen	25
2.5 Statistische Auswertung	26

3	Ergebnisse	27
3.1	Shape Index (SI) als quantifizierbarer Adhäsionsparameter bei AVK - Patienten und gesunden Kontrollpersonen	27
3.2	Korrelation morphologischer und funktioneller Parameter der Adhäsion	33
3.2.1	Korrelation von Shape Index (SI) und Plättchenadhäsivität	33
3.2.2	Shape Index (SI) und Adhäsivität im Vergleich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe	34
3.3	Einzelkorrelation von Shape Index (SI) und Risikofaktoren der Atherosklerose	35
3.3.1	Shape Index (SI) vs Fibrinogen	35
3.3.2	Shape Index (SI) vs Cholesterin	36
3.3.3	Shape Index (SI) vs Low Density Lipoprotein (LDL)	37
3.3.4	Shape Index (SI) vs High Density Lipoprotein (HDL)	38
3.3.5	Shape Index (SI) vs Triglyzeride	39
3.4	Korrelation der Kombination verschiedener Atherosklerose-Risikofaktoren für den Shape Index (SI)	40
3.4.1	Fibrinogen und Cholesterin vs Shape Index (SI)	40
3.4.2	Fibrinogen und Triglyceride vs Shape Index (SI)	41
3.4.3	HDL und LDL vs Shape Index (SI)	42
3.4.4	LDL und Fibrinogen vs Shape Index (SI)	43
3.4.5	HDL und Fibrinogen vs Shape Index (SI)	44
3.5	Einfluss der in vitro-Inhibition von Plättchenmembranrezeptoren auf funktionelle und morphologische Parameter der Adhäsion	46
3.5.1	Einfluß des Tetrapeptids RGDS	46
3.5.2	Einfluß spezifischer Gp IIbIIIa-Rezeptorblockade durch das Peptidanalogen Ro 43-8857	48
3.5.3	Einfluß des chimären Antikörperfragments c7E3-Fab	49

3.6	Plättchenadhäsion bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI)	50
3.6.1	Adhäsion im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen	51
3.6.2	Einfluß des therapeutischen Einsatzes von c7E3-Fab auf die Plättchenadhäsion	52
3.7	Das SPAA als Screeningmethode bei Patienten mit Blutungsneigung und Verdacht auf von Willebrand´sche Erkrankung	56
4	Diskussion	59
5	Zusammenfassung	69
6	Literaturverzeichnis	71
	Danksagung und Widmung	77
	Lebenslauf	78

1 Einleitung und Fragestellung

Seit der Entdeckung der Blutplättchen 1882 durch Bizzozero hat die Erkenntnis ihrer physiologischen Bedeutung wie auch ihrer Beteiligung an zahlreichen pathophysiologischen Prozessen stetig zugenommen. Physiologischerweise sind die Blutplättchen oder Thrombozyten an der Blutstillung oder Hämostase beteiligt. Ihre Aufgabe ist es, durch Anhaften (=Adhäsion) an Gefäßläsionen und nachfolgende Aggregation, d.h. Bildung von Plättchenkonglomeraten, das Gefäßlumen zur Umgebung hin abzudichten und die aus der Verletzung resultierende Blutung zum Stillstand zu bringen. Daneben steht die pathophysiologische Bedeutung der Blutplättchen im Zusammenhang mit Fehlfunktionen des hämostatischen System in den letzten Jahrzehnten im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses.

So wird die Ausbildung einer Thrombose mit einer Hyperreaktivität der Blutplättchen in Zusammenhang gebracht. Thrombose ist definiert als das krankhafte Auftreten von Blutpfropfen (=Thromben) in einem intakten Gefäßsystem. Die Thromben können dabei sowohl im arteriellen als auch im venösen Gefäßschenkel auftreten. Man spricht dementsprechend von arterieller oder venöser Thrombose. Thromboseneigung bedeutet die individuell gesteigerte Bereitschaft Thromben auszubilden.

Noch vor der Entdeckung der Thrombozyten legte Virchow die Grundlagen für die Thromboseforschung. Für ihn, der Thrombenbildung noch mit Blutgerinnung gleichsetzte, war es die Trias aus den Systemen Blut, Strömung und Gefäßwand, die sowohl per se als auch in Interaktion ursächlich an Blutstillung und Thromboseentstehung teilnahmen⁶⁴.

In Anlehnung an Virchows Hypothese, daß eine erhöhte Gerinnungsbereitschaft des Blutes verantwortlich für die Pfropfbildung sei, führten Eberth und Schimmelbusch 1885 den Begriff der „viscösen Metamorphose“¹⁹ der Thrombozyten ein. Sie meinten damit eine „klebrige Veränderung“¹⁹ der Plättchen, die notwendig für „die Verschmelzung eines im Blut vorhandenen Zellgebildes“¹⁹ ist. Sie machten damit zum ersten Mal dezidierte Aussagen über eine aktive Teilnahme der Blutplättchen am thrombotischen Geschehen und untermauerten experimentell die These, daß die Blutplättchen bei Hämostase wie auch Thrombose in einen Aktivierungsprozeß eingebunden sind, eine Anschauung, die auch die heutigen Forschungsansätze bestimmt.

Eberth und Schimmelbusch unterschieden darüber hinaus als erste die Vorgänge Adhäsion und Aggregation. Sie formulierten, daß „unter Umständen sich ein Thrombus bildet, der erst in Gestalt einer einfachen Blutplättchenschicht die verletzte Stelle der Gefäßwand überzieht, dass an diese neue Plättchen antreiben und festkleben und der Thrombus so durch Apposition sich mehr und mehr vergrößert“²⁰. Diese Untersuchungen bilden die Grundlage für den heute bekannten Mechanismus der Entstehung des primären Plättchenthrombus: Thrombozyten haften (adhärieren) zunächst über Zytoplasmfortsätze (Pseudopodien) an durch Gefäßwandverletzung freigelegten subendothelialen Strukturen (z.B. Kollagen) und breiten sich dann großflächig darauf aus, was als „spreading“ bezeichnet wird. Das Anhaften zusätzlicher Plättchen an den bereits haftenden wird dann als Aggregation bezeichnet und führt zur Ausbildung des Plättchenthrombus⁵⁵.

Zudem erkannten Eberth und Schimmelbusch schon damals die Bedeutung des plasmatischen Gerinnungssystems und vor allem die Unterscheidung dessen von der Plättchen-vermittelten Hämostase²⁰. Für die Bildung eines Thrombus postulierten sie allerdings die Involvierung beider Systeme: „Nach unseren Befunden beteiligen sich die Blutplättchen und das Fibrin in wesentlicher Weise an dem Aufbau eines Pfropfes ...“²⁰.

Die strömungsmechanische Hypothese Virchows erfuhr eine Renaissance in der Weise, daß sie nicht einfach als Stase und nachfolgender Gerinnungsprozeß zu interpretieren sei, sondern daß bestimmte Strömungskonstellationen erforderlich für die Entstehung von Blutplättchenthromben seien. Solche nämlich, „an denen der axiale Charakter des Blutstromes durch Wirbelbildung gestört sei“²⁰ und wo Strömungsverhältnisse bestünden, an denen „die Blutplättchen an die verletzten Gefäßwände etc. herangeworfen werden“²⁰, also an Gefäßregionen mit Krümmungen, Verzweigungen und Stenosen, die zu Wirbelbildungen in der Strömung führen.

Der dritte Bestandteil der Trias, die Gefäßwand, ist bei der Thromboseentstehung mit dem zweiten, der Strömung, engstens verknüpft: Stenosen mit nachfolgender Wirbelbildung entstehen bevorzugt an Stellen, an denen das regelmäßige rohrförmige Lumen des Blutgefäßes durch degenerative Veränderungen der Gefäßwand unterbrochen ist und damit eine Störung der laminaren Strömung eintritt. Von großer Wichtigkeit ist in diesem Zusammenhang auch die Umwandlung der Gefäßwand selbst. Die große Bedeutung der Wechselwirkungen zwischen Blutplättchen und atherosklerotisch alterierter Gefäßwand und die enge Verknüpfung der Atherosklerose mit der Thrombose ist heute unbestritten. Schon Rokitanski brachte 1842 die Entstehung atherosklerotischer Plaques mit der Ablagerung von Blutbestandteilen in Verbindung. Virchow dagegen vertrat im Widerspruch zu dieser Ablagerungshypothese die An-

sicht, daß die Plaques nicht vom Lumen her auf der Gefäßintima entstünden, sondern als Folge degenerativer Prozesse in der Gefäßwand selbst.

Der Grundstein für die heute gültige Ansicht zur Atheroskleroseentstehung wurde Anfang des 20. Jahrhunderts von Marchand gelegt, der die Entstehung atherosklerotischer Plaques als Insudation von Lipiden in die Gefäßintima und nachfolgende fibröse Proliferation ansah. Die Bildung von Thromben auf dem Boden dieser strukturellen und chemischen Veränderung der Gefäßwand wurde dabei als sekundärer Prozeß aufgefaßt³⁷.

Die Bedeutung eines der wichtigsten atherogenen Risikofaktoren, eines erhöhten Cholesterinspiegels im Plasma, wurde schon zu Anfang dieses Jahrhunderts von Anitschkow und Chalatow erkannt, denen es im Tierexperiment gelang, durch eine stark Cholesterin-haltige Nahrung eine atherosklerotische Gefäßumstrukturierung zu produzieren³⁷. Heute ist bekannt, daß insbesondere eine Erhöhung des Plasmaspiegels von Low Density Lipoprotein (LDL) die atherosklerotische Plaqueentstehung in der Gefäßwand fördert¹⁸, während dem High Density Lipoprotein (HDL) ein gefäßprotektiver Effekt zugeschrieben wird¹⁸. Eine im Detail noch offene Frage ist, in welcher Weise Thrombozyten im Hinblick auf Thromboseentstehung in atherosklerotisch alterierten Gefäßen mit erhöhten Plasmaspiegeln von Cholesterin bzw. LDL zusammenhängen. Beschrieben ist zum einen, daß die bekanntermaßen unmittelbar atherogene Wirkung von Cholesterin bzw. LDL auf die Gefäßwand^{11,23} ausreicht, um im Falle einer Plaqueruptur ein Anhaften von Blutplättchen herbeizuführen, was mit der nachfolgenden Aggregation den initialen Schritt für die Thrombusbildung darstellt^{33,38}. Es existieren im Gegensatz zu diesen Befunden, die Veränderungen der Plättchenfunktion selbst nicht berücksichtigen, andererseits aber auch Studien, die einen direkten Zusammenhang zwischen hyperreaktiven Thrombozyten und erhöhten Cholesterinspiegeln herstellen^{17,34,57}. Die daraus resultierende Spekulation, daß hyperreaktive Thrombozyten allein ausreichen könnten, um über den initialen Schritt der Thrombusentstehung - die Plättchenadhäsion - ohne eine zusätzlich vorhandene Gefäßwandalteration die Gerinnelbildung hervorzurufen, wird durch Befunde von Reininger et al. unterstützt, die Plättchenadhäsion auf einer intakten Endothelzellschicht nachwiesen, die durch eine Aktivierung der Thrombozyten unter Strömungsbedingungen auszulösen war⁴³. Eine Hyperreaktivität von Thrombozyten als Ursache von Thrombosen erscheint daher durchaus vorstellbar.

Aber auch der gegenteilige Reaktivitätszustand von Plättchen ist bekannt und in einer Reihe von klinischen Krankheitsbildern manifest. Das heißt, eine Hyporeaktivität von Thrombozyten kann die Ausbildung einer Blutungsneigung (hämorrhagischen Diathese) zur Folge haben.

Ursachen für hyporeaktive Zustände von Thrombozyten sind unter anderem ein Fehlen oder abnormes Funktionsverhalten von Plättchenmembranrezeptoren⁵⁵. Eine Erkrankung, bei der die Hyporeaktivität durch vollständiges Fehlen, einen Mangel oder eine fehlerhafte Funktion des Membranrezeptorkomplexes Glykoprotein (Gp) IIB/IIIa verursacht wird, ist die Glanzmann-´sche Thrombasthenie, die sich klinisch durch lebensbedrohliche Blutungen manifestieren kann.

Es sind heute eine Reihe von Plättchenmembranrezeptoren bekannt, die verschiedenen Klassen angehören, wie den Integrinen, der Immunglobulin-Superfamilie oder den Rezeptoren, die durch Leucin-reiche Motive charakterisiert sind. Integrine, die sich ubiquitär auf allen Zellen finden, sind dadurch charakterisiert, daß sie aus zwei Untereinheiten, der α - und der β -Kette, bestehen, die transmembranös in der Zellmembran verankert sind⁵¹. Das Glykoprotein (Gp) IIB/IIIa - mittlerweile häufiger als Integrin α IIB β 3 bezeichnet - ist der häufigste auf der Plättchenmembran vorkommende Rezeptor¹². Als physiologische Liganden für Gp IIB/IIIa dienen sogenannte adhäsive Proteine wie Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin oder von Willebrand Faktor (vWf)^{15,55}. Von Willebrand Faktor, der auch an Gp Ib bindet, kommt in Endothelzellen, Plättchen, im subendothelialen Gewebe und im Blutplasma vor. Gebunden an Gp Ib oder Gp IIB/IIIa kann er bei einer Endothelverletzung und damit verbundenen Offenlegung subendothelialen Kollagens die molekulare Verbindung zwischen Plättchenmembran und Subendothel herstellen und damit den initialen Schritt der Hämostase, die Plättchenadhäsion, vermitteln⁵⁵. Bei der von-Willebrand-´schen Erkrankung (von Willebrands Disease, vWD) wird eine Hyporeaktivität des Hämostasesystems, die klinisch zu lebensbedrohlichen Blutungen führen kann, durch quantitatives oder qualitatives Fehlverhalten des von-Willebrand-Faktors (vWf) verursacht²¹.

Die wachsenden Kenntnisse über Plättchenmembranrezeptoren und die klinischen Folgen, die bei Fehlen oder fehlerhafter Expression dieser Rezeptoren resultieren, wurden bei der Entwicklung antithrombogener Medikamente genutzt. Die Idee dabei war, im Sinne einer „therapeutischen Thrombasthenie“ die Anzahl funktionsfähiger Rezeptoren auf der Plättchenmembran herabzusetzen, was die Bindung von adhäsiven Proteinen an die Thrombozyten und damit die abnorm gesteigerte Plättchenadhäsivität inhibieren sollte¹⁴. Vor allem bei Patienten mit einem hohen Risiko thromboembolischer Ereignisse, z.B. Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) oder arterieller Verschußkrankheit (AVK) sollte so die Gefahr ischämischer Ereignisse vermindert werden¹. Im Rahmen dieser Plättchenrezeptorinhibierung wurde eine Reihe von Substanzen entwickelt. Man nutzte dabei die Entdeckung, daß das aus drei Amino-

säuren bestehende Motiv Arginin-Glycin-Asparagin (RGD) in fast allen physiologischen Liganden des GpIIbIIIa -Rezeptors vorkommt und daß synthetische Peptide, die diese RGD-Sequenz enthalten, in der Lage sind, die Bindung adhäsiver Proteine an den GpIIbIIIa-Rezeptor kompetitiv zu blocken ¹⁴. Da auf der RGD-Sequenz basierende Inhibitoren nicht spezifisch am GpIIbIIIa Rezeptor binden, sondern auch an andere Integrine, wurden außerdem mit sogenannten Pseudopeptiden wie zum Beispiel dem Ro 43-8857 hochselektive GpIIbIIIa-Blocker entwickelt ². Eine weitere Gruppe sehr potenter antithrombozytärer Therapeutika sind Antikörperfragmente gegen den Gp IIbIIIa Rezeptor, von denen c7E3 die größte klinische Bedeutung erlangt hat. Er wurde von Collier et al. als rekombinante chimäre Fab -Version (c7E3 -Fab) modifiziert, d.h. die variable Region des Antikörpers Fab stammte von der Maus, die konstante Region Fc vom Menschen ¹³. c7E3-Fab befindet sich als abciximab (Reopro ^R) bereits im klinischen Einsatz und wird dort bei Gefahr von ischämischen Ereignissen nach Angioplastie bei akutem Myokardinfarkt eingesetzt. Großangelegte Studien haben gezeigt, daß durch die Therapie mit c7E3-Fab thromboembolische Komplikationen im Rahmen von interventionellen Eingriffen im koronaren Gefäßsystem signifikant reduziert werden ⁶⁰.

Zur Beurteilung der Plättchenfunktion bei Patienten mit *hyperreaktivem* sowie (intrinsisch oder therapeutisch herbeigeführtem) *hyporeaktivem* Hämostasesystem sind unterschiedliche Testsysteme im Einsatz. Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete System Stau-punkt-Adhäsio-Aggregometer (SPAA) enthält alle drei Komponenten der Virchow'schen Trias - Blut, Strömung und Wand ⁴⁹. Der Grundgedanke des SPAA ist eine Modellierung der Bedingungen, wie sie an den Prädilektionsstellen thrombotischer Ablagerungen in vivo vorliegen, nämlich Transport von Blutkomponenten gegen eine Wand durch eine sogenannte Stau-punktströmung. Die Plättchen werden hierbei konvektiv gegen eine Glas-Oberfläche an-transportiert (siehe Abschnitt 2.3) und mit ihr in Kontakt gebracht, was zu ihrer Aktivierung führt. Der dadurch eingeleitete „Shape-change“ führt zur Ausbildung der Pseudopodien, über die sie an der Oberfläche adhärieren und hierauf zu spread Plättchen werden können (siehe oben). Die im SPAA mögliche unmittelbare Beobachtung und Dokumentation der Interaktion der Plättchen mit der beströmten Oberfläche unter dem Mikroskop unter individuell wählbaren Versuchs- und Strömungsbedingungen ⁴⁹ erlaubt eine Quantifizierung der Kinetik dieser Ablagerungsvorgänge, was die Beurteilung der gesamten Bandbreite von Reaktivitätszuständen von Thrombozyten von hyporeaktiv (hämorrhagische Diathesen) bis hyperreaktiv (Thromboseneigung) gestattet.

Fragestellung:

Vor dem Hintergrund der oben geschilderten großen pathophysiologischen Relevanz der Blutplättchen bei der Entstehung von Thrombosen und Blutungsneigungen sollte die vorliegende Arbeit zur Klärung folgender Fragen beitragen:

1. Lassen sich durch morphologische Untersuchungen adhärerender Plättchen mittels eines Shape Index Rückschlüsse auf ihre Reaktivität ziehen?
2. Gibt es Zusammenhänge zwischen der Morphologie haftender Plättchen und den Plasmaspiegeln bekannter Atheroskleroserisikofaktoren?
3. Welchen Einfluß auf Plättchenfunktion und -morphologie hat eine Inhibition von Membranrezeptoren?
4. Führt eine klinische Blutungsneigung bzw. manifeste von Willebrand'sche Erkrankung zu quantitativen bzw. qualitativen Veränderungen der Plättchenadhäsion?

ad 1. Plättchen von Patienten mit arterieller Verschußkrankheit (AVK) weisen eine gesteigerte Adhäsivität im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen auf⁴⁶. Darauf aufbauend sollte geklärt werden, ob sich zusätzlich zu diesem bekannten funktionellen Unterschied das morphologische Verhalten der haftenden Plättchen bei AVK-Patienten und gesunden Kontrollen unterscheidet (siehe Abschnitt 3.1). Außerdem sollte geklärt werden, inwieweit die Adhäsivität und ein als Shape Index (SI) eingeführter morphologischer Parameter korrelieren (siehe Abschnitt 3.2).

ad 2. Zahlreiche Studien beschreiben einen Zusammenhang zwischen Plättchenadhäsivität und Risikofaktoren von Atherosklerose. Im Gegensatz dazu existieren bedeutend weniger Analysen, die nach einem Zusammenhang dieser Faktoren mit der Morphologie der haftenden Plättchen suchen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, ob und in welcher Weise die Plasmaspiegel von Fibrinogen, Cholesterin, Triglyzeriden, LDL und HDL mit unserem morphologischen Parameter, dem Shape Index (SI), korrelierten. Um den Effekt jedes der genannten Risikofaktoren gesondert zu analysieren, wurde der Shape Index (SI) zum einen einzeln mit den jeweiligen Konzentrationen im Blutplasma korreliert (siehe Abschnitt 3.3). Außerdem wurde der Frage des wechselseitigen Einflusses der Kombination zweier Risikofaktoren auf den Shape Index (SI) nachgegangen.

ad 3. Die Abhängigkeit von Plättchenadhäsion und „spreading“ vom Membranrezeptorkomplex Gp IIb/IIIa ist in der Literatur unbestritten⁵⁵. Blockade dieses Rezeptors führt in vitro zu einer Verminderung der Plättchenadhäsion an Subendothel, was in vivo zur Thrombose-therapie und -prophylaxe ausgenutzt wird. Dabei sind die Einflüsse einer Rezeptorblockade auf die Morphologie der haftenden Plättchen bisher weitgehend unbekannt. Aus diesem Grund sollte die vorliegende Arbeit durch Einsatz dreier verschiedener GpIIb/IIIa-Blocker unter anderem die Morphologie - ausgedrückt durch den Shape Index (SI) - adhärenter Plättchen unter Rezeptorinhibition erforschen. Bei den Experimenten mit dem Antikörperfragment c7E3-Fab sollte ferner insbesondere die Frage geklärt werden, ob eine c7E3-Fab-Therapie in der Tat eine Blockierung der Plättchenaggregation herbeiführt und die Plättchenadhäsion unbeeinflusst läßt^{15,61}.

ad 4. Bei der von Willebrand'schen Erkrankung (vWD) führt ein Fehlen oder eine qualitative Veränderung des von Willebrand Faktors (vWf) zu einer klinischen Blutungsneigung. Der vWf ist neben Fibrinogen, Fibronectin und Vitronectin als Ligand für GpIIb/IIIa bekannt⁵⁵ und kann insbesondere bei hohen Scherraten (über 800 s⁻¹) die Plättchenadhäsion vermitteln^{25,65}. Als weiterer Punkt wurde daher in der vorliegenden Arbeit die Plättchenadhäsion bei Patienten mit klinischer Blutungsneigung, bei denen unterschiedliche Plasmakonzentrationen des vWf vorlagen, analysiert. Die dazu durchgeführten ex vivo - SPAA-Experimente mit Plasmaproben dieser Patienten sollten zum einen untersuchen, ob sich bei unterschiedlichen vWf-Konzentrationen eine relevante Verminderung der Plättchenadhäsion nachweisen ließ und darauf aufbauend, ob das SPAA bei dieser Erkrankung diagnostisch sinnvoll eingesetzt werden kann.

2 Material und Methode

2.1 Untersuchte Personengruppen

2.1.1 Patienten mit Arterieller Verschlusskrankheit (AVK)

Insgesamt wurden 22 Patienten mit arterieller Verschlusskrankheit (AVK) untersucht, die in der Chirurgischen Klinik des Klinikums Innenstadt der LMU München behandelt wurden. Einschlusskriterium war hierbei eine angiographisch verifizierte symptomatische periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK). Patienten mit zusätzlichen anderen Systemerkrankungen sowie mit bereits eingetretenen Hautläsionen wurden aus der Untersuchung ausgeschlossen. Ebenso fanden keine Patienten mit akuten Verschlusserscheinungen Eingang in die Studie. Die Untersuchung erfolgte außerdem vor Beginn der Medikation.

Die Arbeitsgruppe von Frau Dr. C. Reininger führte im Klinikum Innenstadt Untersuchungen durch, die mit der Plättchenfunktionskonstante KPW ein Maß für die Plättchenadhäsivität ergaben (siehe Abschnitt 2.3). Die Bestimmung der Plasmaspiegel für Fibrinogen, Gesamtcholesterin, HDL, LDL und Triglyzeride wurden im Labor von Dr. M. Spannagl und Prof. Dr. Schramm von der Medizinischen Klinik Innenstadt der LMU durchgeführt.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über Alter, Adhäsionskonstante KPW (siehe Abschnitt 2.3), Plasmakonzentrationen von Fibrinogen, Gesamtcholesterin, HDL, LDL, und Triglyzeriden der untersuchten AVK-Patienten.

2.1.2 Patienten mit Akutem Myokardinfarkt (AMI)

Außerdem wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit 12 Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI), abermals Patienten der Medizinischen Klinik Innenstadt der LMU-Universität München, die durch perkutane transluminale coronare Angioplastie (PTCA) und Stentimplantation behandelt worden waren, untersucht. 7 von diesen Patienten (Alter 51 bis 61 Jahre) waren medikamentös mit 500 mg Acetylsalicylsäure (ASS) i.v. am Aufnahmetag (später dann 100 mg ASS oral pro Tag, zusätzlich low-dose Heparin) therapiert worden, zusätzlich hatten sie eine Behandlung mit dem Antikörperfragment c7E3-Fab (abciximab, ReoPro R) erhalten, das zunächst als Bolus (0,25 µg/kg Körpergewicht) und dann als 12-stündige Infusion (10 µg/min) verabreicht worden war (siehe auch Abschnitt 2.2.3).

Die anderen 5 Patienten mit Myokardinfarkt (Alter 42 bis 64 Jahre) hatten keine Therapie mit c7E3 - Fab erhalten, allerdings war bei ihnen nach Stentimplantation zusätzlich zu 100 mg ASS pro Tag Ticlopidin in einer Dosierung von zwei mal 250 mg pro Tag appliziert worden.

2.1.3 Patienten mit Blutungsneigung und Verdacht auf von Willebrand'sche Erkrankung (vWD)

Eine weitere Patientengruppe waren 9 Patienten (Alter 27 bis 85 Jahre) mit klinisch manifester Blutungsneigung, bei denen daher eine von Willebrand'sche Erkrankung (von Willebrand's Disease, vWD) vermutet wurde. Auch sie waren Patienten der Medizinischen Klinik Innenstadt der LM-Universität München. Alle Patienten hatten mindestens zehn Tage vor der Blutabnahme keine Medikamente eingenommen. Die Quantifizierung des von Willebrand Faktors bei diesen Patienten erbrachte in einem Fall das Vorliegen einer schweren von Willebrand'schen Erkrankung, in vier weiteren Fällen leichtere Ausprägungen der Krankheit, bei den restlichen vier Patienten konnte laborchemisch eine vWD ausgeschlossen werden.

Tabelle 2 gibt Aufschluß über die Plasmakonzentrationen von Faktor VIII, Faktor VIII Antigen (von Willebrand Faktor, vWf) und den jeweiligen Wert der Ristocetin induzierten Aggregation.

2.1.4 Gesunde Kontrollpersonen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei getrennte Kontrollgruppen verwendet: bei den morphometrischen Analysen (Vergleich AVK-Patienten mit gesunden Kontrollpersonen, siehe Abschnitt 2.4) waren die Kontrollpersonen 21 freiwillige Spender aus dem Klinikpersonal des Klinikums Innenstadt der LMU München . Das Vorhandensein von AVK wurde durch Befragung der Kontrollpersonen ausgeschlossen. Außerdem wurde sichergestellt, daß die Spender mindestens zehn Tage vor Blutabnahme keine Medikamente eingenommen hatten.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über Alter, Adhäsionskonstante KPW sowie die Plasmakonzentrationen von Fibrinogen, Gesamtcholesterin, HDL, LDL und Triglyzeriden dieser Kontrollgruppe .

Nummer	Alter (Jahre)	KPW (%)	Fibrino- gen (mg/dl)	Cholest- erin (mg/dl)	Triglyce- ride (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
1	64	1,64	300	226	126		100
2	70	1,6	352	240	200	37	170
3	54	1,44	372	250	157		
4	51	1,4	302	302	173	30	233
5	63	1,64	360	262	255	42	169
6	69	1,14	367	177	85	31	122
7	58	1,48	777	207	209	28	137
8	52	1,25	391	243	185	34	173
9	54	1,2	590	203	250	24	129
10	70	1,25	456	156	78	37	113
11	44	1,33					
12	52	1,95	380				
13	53	1,5	367	216	115	33	
14	62	1,24	447	280	171		
15	72	1,54	300	184	226	37	121
16	40	1,54		234	220	29	161
17	58	1,8	466	326	193	47	240
18	56	1,3					190
19	58	1,33	296	207	111	45	140
20	48	1,3	296	246	127	32	189
21	82	1,6	428	245	191	36	130
22	65	0,78	275	193	206	29	123
Mittelwert	58,864	1,42	395,895	231,421	172,526	34,438	155,294
St-abw.	9,982	0,249	120,785	42,701	52,816	6,3137	40,603
Median	58	1,42	367	234	185	33,5	140

Tabelle 1

Patienten mit arterieller Verschlusskrankheit (AVK)

Patient	Alter [Jahre]	FVIII [%]	FVIIIa [%]	Rist.-ind. Aggregation [%]	vWD
1	27	84	62	93	(+)
2	33	100	105	80	-
3	31	40	65	45	(+)
4	48	100	130	62	-
5	47	100		88	-
6	55	85	63	58	(+)
7	36	92	68	80	(+)
8	85	100	130	73	-
9	45	3	1	18	+
Mittelwert	45,22	78,22	78	66,33	
Std-abw.	16,52	32,12	40,02	22,3	
Median	45	92	66	73	

Tabelle 2

Patienten mit Blutungsneigung und Verdacht auf von Willebrand'sche Erkrankung (vWD). Das Vorliegen einer manifesten von Willebrand'schen Erkrankung (vWD) in Abhängigkeit vom vWf-Wert wird in der letzten Spalte angegeben. +: schwere vWD, (+): fragliches Vorliegen einer vWD, -: Ausschluß einer vWD

Nummer	Alter (Jahre)	KPW (%)	Fibrino- gen (mg/dl)	Cholest- erin (mg/dl)	Triglyce- ride (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
1	36	0,45	239	258	154	35	193
2	42	0,7	335	191	142	28	142
3	26	0,28	218	218	137	36	162
4	50	0,81	374	209	125	43	141
5	22	0,54	260	183	95	60	108
6	26	0,89	355	230	68	59	70
7	24	0,67	299	178	61	43	123
8	27	0,4		203	36	47	149
9	50	0,69	371	204	74	42	71
10	58	0,69	317	218		39	65
11	35	0,51	368	149	157	30	88
12	63	0,22	220	120	55	52	91
13	46	0,83	278	183	127	44	112
14	68	0,85	477	267	171	34	200
15	28	0,78	273	166	100	43	104
16	24	0,77	251	221	110	50	149
17	52	1,12	395	240	120	44	163
18	23	0,75	217	247	152	41	176
19	31	0,85	253	173	306	34	78
20	56	0,35	177				
21	20	0,26	149				
Mittelwert	38,429	0,639	291,3	203,053	121,667	42,316	125,526
Standard- abweich.	15,128	0,241	81,953	37,719	60,513	8,737	42,513
Median	35	0,69	275,5	204	122,5	43	123

Tabelle 3

Gesunde Kontrollpersonen

Eine zweite Gruppe von gesunden Kontrollpersonen - sie wurde bei den Vergleichen mit den AMI - und vWD- Patienten (siehe Abschnitt 2.1.2 und 2.1.3) sowie zur Testung des Effekts der in vitro- (siehe Abschnitt 2.2.2) und ex vivo- (siehe Abschnitt 2.2.3) Membranrezeptorblockade auf die Plättchenfunktion herangezogen - bestand aus 5 gesunden freiwilligen Spendern (Alter 24 bis 39 Jahre, sämtlich Mitarbeiter des Anatomischen Instituts der TU München). Die Personen dieser Kontrollgruppe hatten wenigstens 2 Wochen vor Blutabnahme keine Medikamente eingenommen.

2.2 Herstellung und Präparation der Plasmaproben

2.2.1 Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP)

Hierzu wurde bei den Patienten bzw. Kontrollpersonen eine Kubitalvene punktiert und das Blut durch eine Stahlkanüle mit langsamem Zug am Spritzenstempel in eine 10 ml-Spritze gesaugt, in der das als Antikoagulans verwendete Na-Citrat (3,8%) bereits enthalten war (Monovette, Sarstedt, Ulm, Germany). Das Antikoagulans wurde mit dem Blut sofort nach der Entnahme durch vorsichtiges Schwenken der Spritze vermischt (Verhältnis Blut / Citrat 10:1). Für die Herstellung von PRP wurde das Blut vorsichtig von den Spritzen in Zentrifugenröhrchen umgefüllt, anschließend für zehn Minuten bei 260 g zentrifugiert. Der Überstand, das plättchenreiche Plasma, wurde dann mittels einer weiteren Spritze und einem daran befestigten Silikonschlauch abgesaugt, wobei sorgfältig darauf geachtet wurde, keine sedimentierten Erythrozyten mit aufzusaugen. So erhielten wir die für jedes Experiment notwendigen 5 ml PRP. Es wurde bis zum Experimentbeginn bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.2.2 In vitro - Inhibition von Plättchenmembranrezeptoren

Das Glykoprotein (Gp) IIb/IIIa - auch als Integrin α IIb/ β 3 bezeichnet - stellt die plättchenseitige Bindungsstelle für die adhäsiven Proteine Fibrinogen, von Willebrand Faktor (vWf), Fibronectin und Vitronectin¹⁵ dar und gilt als der primär für Aggregation und zusammen mit dem GpIb Rezeptor auch für Adhäsion verantwortliche Plättchenrezeptor¹⁵. Das aus den drei Aminosäuren bestehende Motiv Arginin-Glycin-Asparagin (RGD) stellt u.a. die von Gp IIb/IIIa erkannte Bindungssequenz dieser Adhäsionsproteine dar. Synthetische Peptide, die die RGD-Sequenz enthalten, inhibieren kompetitiv die Bindung der oben genannten adhäsiven Proteine an die Plättchenmembran und damit GpIIb/IIIa-vermittelte Plättchenfunktionen²⁴.

In der vorliegenden Arbeit testeten wir den Einfluss der in vitro- Blockade des GP IIb/IIIa Rezeptors durch das Tetrapeptid RGDS (Arginin-Glycin-Asparagin-Serin) auf Plättchenadhäsion und -morphologie. Das von uns verwendete RGDS (Sigma, Germany) wurde in den Endkonzentrationen 200 μ mol/l (n=2), 400 μ mol/l (n=2), und 600 μ mol/l (n=3) im PRP eingesetzt. Unmittelbar vor Beginn jedes Strömungsexperiments wurde die bereits vorbereitete RGDS - Lösung in die entsprechende bereits mit PRP gefüllte Perfusorspritze aufgezogen und durchmischt. Anschließend wurde sofort mit dem Strömungsexperiment in der bereitstehenden

Strömungskammer (siehe Abschnitt 2.3) begonnen. Die Einwirkzeit des Tetrapeptids auf die Thrombozyten betrug dabei 2-3 Minuten.

Außerdem untersuchten wir durch den Einsatz des Peptidanalogs Ro 43-8857 (freundlicherweise von der Firma Knoll GmbH, Germany, zur Verfügung gestellt) den Einfluß einer spezifischen Gp IIb/IIIa - Blockade auf Plättchenadhäsion und -morphologie. Die im PRP verwendeten Endkonzentrationen des Peptidanalogs lagen bei 0,05 $\mu\text{mol/l}$ (n=1), 0,1 $\mu\text{mol/l}$ (n=1), 0,2 $\mu\text{mol/l}$ (n=1) und 0,3 $\mu\text{mol/l}$ (n=1). Auch hier wurde das PRP unmittelbar vor Beginn eines jeden Experiments mit der vorbereiteten Lösung der Inhibitionssubstanz zusammengebracht, so dass die Einwirkzeit auf die Thrombozyten bei 2-3 Minuten lag.

Als dritte Substanz wurde die *in vitro* - Einflußnahme von c7E3-Fab, einem chimären Maus/Mensch-Antikörperfragment gegen Gp IIb/IIIa (Geschenk von Barry S. Coller, Mount Sinai Hospital, New York, USA) auf die Plättchenfunktion untersucht. c7E3-Fab wurde dabei in Konzentrationen von 5 $\mu\text{g/ml}$ (n=4 Experimente) und 10 $\mu\text{g/ml}$ (n=3 Experimente) 30 Minuten vor Beginn der Strömungsexperimente dem PRP zugesetzt.

Als Kontrolle zu allen Experimenten mit Rezeptorblockern dienten 12 Strömungsexperimente mit Plasmaproben gesunder Kontrollpersonen ohne Zusatz von Blockierungssubstanzen.

2.2.3 Therapeutische Inhibition von Plättchenmembranrezeptoren bei AMI-Patienten

Bei 7 Patienten mit Akutem Myokardinfarkt (AMI), bei denen eine PTCA und Stentimplantation durchgeführt worden war (siehe Abschnitt 2.1.3), wurde der Einfluss der therapeutischen Plättchenrezeptorblockade durch das Fab-Fragment c7E3 (als ReoPro^R (abciximab) im klinischen Einsatz) auf die Plättchenfunktion untersucht. c7E3-Fab war dabei unmittelbar vor Stentimplantation als Bolus (0,25 $\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht) und nachfolgende Infusion über 12 Stunden (Dosierung 10 $\mu\text{g/min}$) appliziert worden.

Unmittelbar vor den SPAA - Strömungsexperimenten wurde dann bei diesen Patienten 10 Milliliter Blut abgenommen (antikoaguliert in Citrat 1:10) und auf oben beschriebene Weise plättchenreiches Plasma (PRP) hergestellt. Wir führten Experimente 3 Stunden (n=7) und 30 Stunden (n=7) nach Ende der c7E3-Fab- Infusion durch.

2.3 Das Staupunkt-Adhäsio-Aggregometer (SPAA) als experimentelles Strömungsmodell

Das Staupunkt-Adhäsio-Aggregometer (SPAA)^{45,49} ist eine Versuchseinheit, die on-line die Beobachtung und Quantifizierung der Kinetik von primärer Plättchenadhäsion und sekundärer Aggregation an Oberflächen in einer symmetrischen Staupunktströmung erlaubt.

In der vorliegenden Arbeit wurde das SPAA als experimentelles Strömungsmodell zum Vergleich der Plättchenfunktion der Patienten mit AVK, mit AMI, den Blutungspatienten und den gesunden Kontrollpersonen verwendet.

2.3.1 Aufbau des SPAA

Das SPAA (Abbildung 1) besteht aus einer Strömungskammer, die sich in der Objektebene eines Dunkelfeldmikroskops befindet. Kernstück ist ein Kammereinsatz aus Plexiglas, der eine zylindrische Bohrung (Durchmesser $D=0,65$, Länge $L=20$ mm) aufweist, durch den Plasma einströmen kann. Das Plasma strömt senkrecht gegen eine 0,4 Millimeter von der Öffnung des Einströmrohrs entfernte gläserne Stauplatte, auf die die im Plasma suspendierten Thrombozyten auftreffen. Durch die Dunkelfeldbeleuchtung streuen Thrombozyten, die sich unmittelbar über der Glasstauplatte befinden und an ihr anhaften, Licht und werden so als helle Punkte auf dunklem Untergrund sichtbar. Plättchen, die sich in weiterer Entfernung von der Staufläche befinden und nicht adhäreren, geben dagegen kein Signal im Dunkelfeld.

Ein Perfusorsystem leitet über einen Zuführungsschlauch, der in der optischen Achse eines im Bereich der Zentralblende durchbohrten Dunkelfeldkondensors verläuft, das Plasma in die Strömungskammer. Da die achsennahen Strahlen bei Dunkelfeldkondensoren ausgeblendet sind, resultiert dadurch keine wesentliche Änderung des Strahlengangs. Das SPAA-System erlaubt so die direkte Beobachtung der Strömung und Plättchen-Glasstauplatte-Interaktion.

Im Strömungssystem des SPAA sind Geschwindigkeitskomponenten parallel und senkrecht zur Wand enthalten. Im Zentrum der Staupunktströmung wird das Maximum der zur Staufläche senkrecht stehenden Geschwindigkeitskomponente erreicht und die wandparallele Komponente ist null. Mit zunehmendem Abstand vom Zentrum kehren sich diese Verhältnisse um, d.h. die wandparallele Komponente wird immer größer, während der zur Staufläche senkrecht stehende Geschwindigkeitsvektor abnimmt. Es werden so Wandscherraten mit maximalen Werten von 170 s^{-1} erreicht.

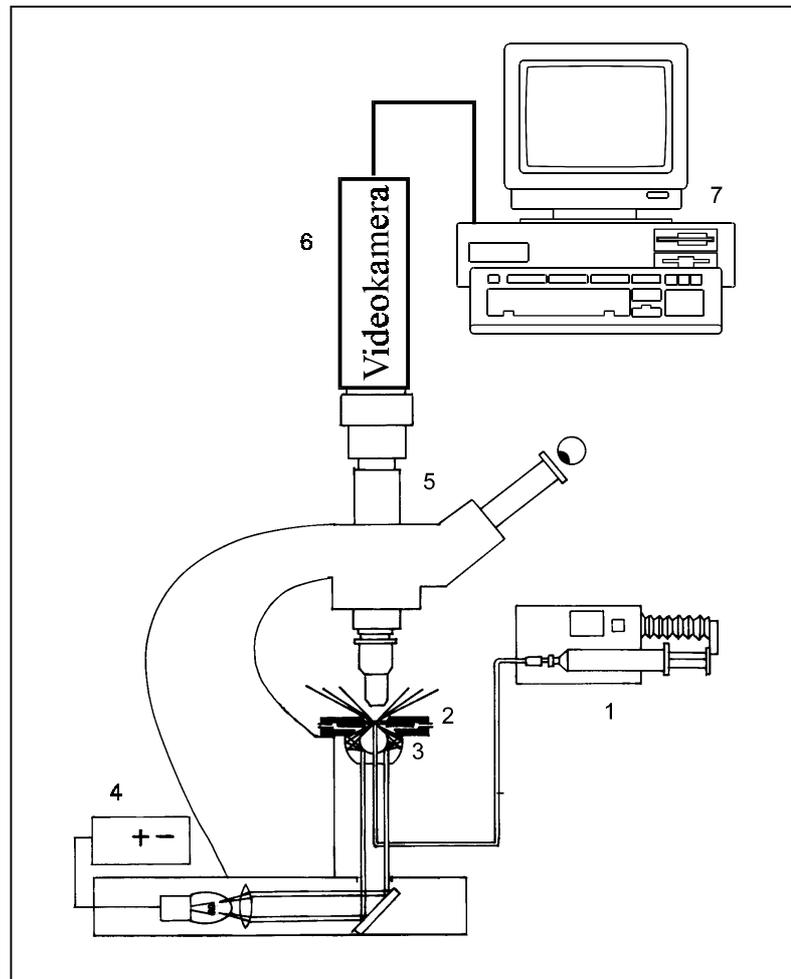


Abbildung 1

Schematische Darstellung des Staupunkt-Adhäsio-Aggregometers (SPAA) bestehend aus

- 1 Perfusor zur Infusion von PRP,*
- 2 Staupunktkammer in der Objektebene des Dunkelfeldmikroskops*
- 3 Dunkelfeldkondensor mit zentraler Bohrung*
- 4 Mikroskoplampe*
- 5 Mikroskop*
- 6 Videokamera zur Echtzeitregistrierung*
- 7 Videorekorder bzw. Computer zur Dokumentation und Auswertung der Bilddaten*

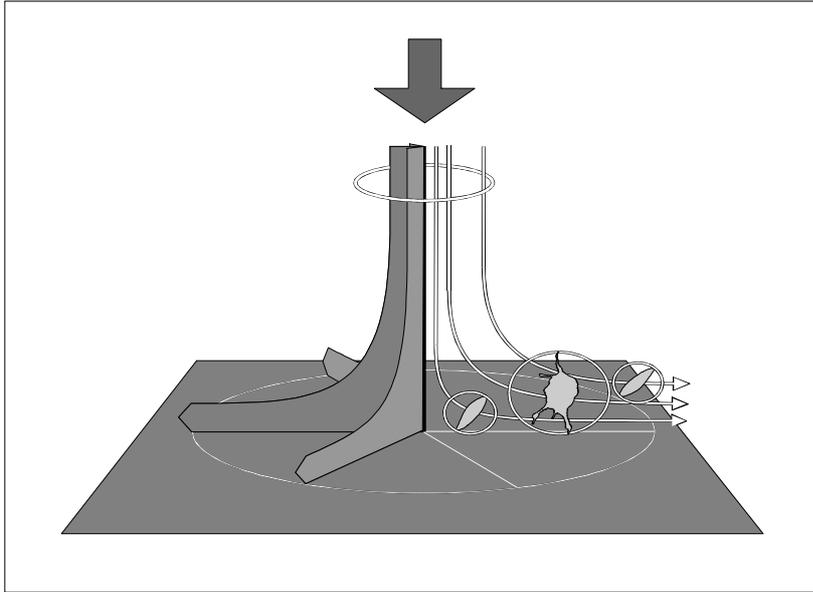


Abbildung 2

Schematische Darstellung der Staupunktströmung, Strömungsrichtung links, Stromlinien rechts. Die schematisch gezeichneten Thrombozyten rechts sind nicht maßstabsgetreu gezeichnet. Nur Plättchen, die nahe genug an die Oberfläche antransportiert werden, daß sie die Oberfläche berühren, können adhärieren. Dabei haben stimulierte Plättchen mit ihren Pseudopodien einen größeren Durchmesser und damit höhere Chancen, die Oberfläche zu berühren.

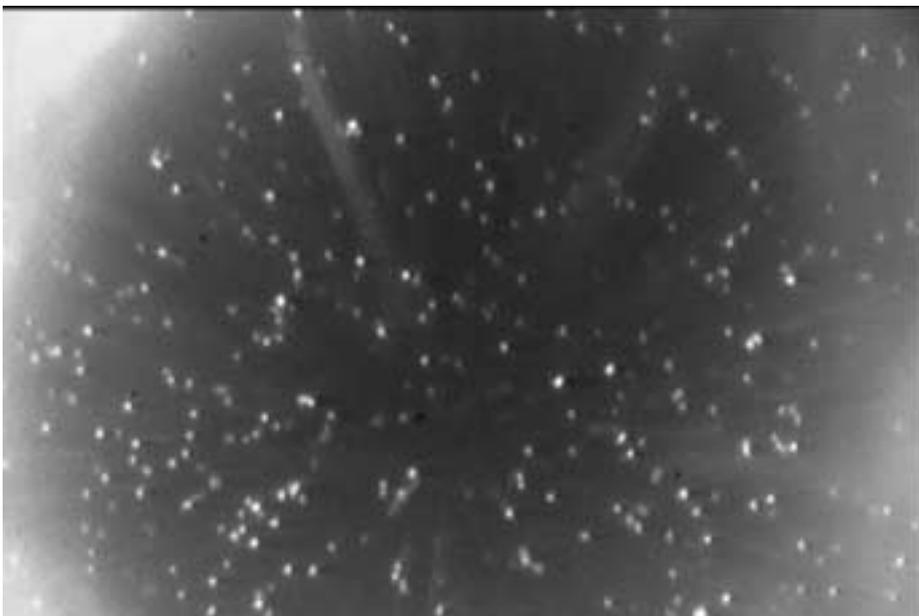


Abbildung 3

Dunkelfeld-Mikrophotographie eines realen SPAA-Strömungsexperiments. Die hellen Punkte entsprechen einzelnen Plättchen, die sternförmig um den zentralen Staupunkt, der an der Grenze zwischen unterem und mittlerem Drittel liegt, an der Glasoberfläche adhärieren.

2.3.2 Beströmte Oberflächen

Als beströmte Stauflächen wurden in der vorliegenden Arbeit runde Glasdeckplättchen (Firma Kindler, Germany) mit einem Durchmesser von 22 und einer Dicke von 0,1 Millimeter verwendet.

Die Reinigung der gläsernen Stauplättchen erfolgte zunächst in einer Laborspülmaschine, anschließend wurden die Stauplättchen bei $+80^{\circ}\text{C}$ luftgetrocknet. Hierauf wurde jedes einzelne Glasplättchen von Hand mit fussel freiem Kimwipe R und Aceton, anschließend mit Äther nochmals abgewischt, um eventuell noch anhaftende Fettreste zu entfernen.

Die fertig gereinigten Deckgläschen wurden dann bis zum Experiment staubfrei aufbewahrt.

2.3.3 Strömungsexperimente mit dem SPAA

Sämtliche der Arbeit zugrunde liegenden Strömungsexperimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Unmittelbar vor Beginn jedes Strömungsexperiments wurde das zu untersuchende PRP vorsichtig in eine 25 ml Perfusorspritze aufgezogen. Anschließend wurde die Spritze mit einem Perfusorschlauch verbunden, der durch den durchbohrten Dunkelfeldkondensator geführt wurde und am Einstromrohr der Strömungskammer befestigt war. Ein Perfusorsystem (Braun, Melsungen, Germany) lieferte den konstanten Volumenstrom von 30 Milliliter pro Stunde. Die Strömungszeit betrug jeweils 12 Minuten.

Für jedes Experiment wurde ein neues gereinigtes gläsernes Stauplättchen in die Strömungskammer gelegt. Das gereinigte Glasplättchen wurde dann in das Zentrum des Strahlengangs des Mikroskops gebracht und in der Objektebene fokussiert.

Die durch den Volumenstrom senkrecht gegen das Glasplättchen antransportierten Thrombozyten waren sowohl über die Mikroskopokulare als auch auf einem Bildschirm zu sehen, der mit einer auf das Mikroskop aufmontierten CCD- Videokamera (Sony, Japan) verbunden war. Das ermöglichte so zudem die kontinuierliche Aufzeichnung der Strömung auf einem Videoband, wie sie für die im folgenden beschriebene modifizierte Art der Adhäsionsanalyse benötigt wurde.

2.3.4 Quantifizierung der Plättchenadhäsion

Für die frühere Art der Adhäsionsanalyse, die bei den AVK-Patienten eingesetzt worden war und aus der sich die Funktionskonstante KPW (Konstante Plättchen Wand) ergeben hatte, war das Streulicht der adhärennten Plättchen mit einem Photomultiplier verstärkt und in einem Personal Computer in Abhängigkeit von der Zeit als Wachstumskurve aufgezeichnet worden. Mathematische Ableitungen aus diesen Wachstumskurven hatten ergeben für jedes Strömungsexperiment die Plättchenfunktionskonstante KPW^{59} ergeben, ein Maß für die individuelle Plättchenadhäsivität.

Bei den Untersuchungen zur Plättchenadhäsion bei den an akutem Myokardinfarkt erkrankten Patienten und bei denen mit Blutungsneigung wurde eine neue, modifizierte Art der Registrierung und Adhäsionsanalyse der SPAA - Strömungsexperimente eingesetzt. Die Strömungsexperimente wurden während der gesamten Strömungsdauer kontinuierlich mittels Framgrabber und s/w- Videokamera (Sony, Japan) auf einem VHS-Videorekorder (Panasonic, Japan) aufgezeichnet und außerdem auf einem separaten Bildschirm mitverfolgt. Dies ermöglichte zum einen die direkte Beobachtung und Registrierung der Plättchen - Stauplatte - Interaktionen, außerdem aber konnten so die Strömungsexperimente lückenlos dokumentiert werden. Die Aufzeichnung auf Video erlaubte zudem die Auswertung der Strömungsexperimente zu einem beliebigen späteren Zeitpunkt.

Wir verwendeten für die Registrierung ein 32' Long Distance Objektiv (Leitz, Germany). Der verwendete Vergrößerungsfaktor erlaubte zum einen die Betrachtung der Interaktion einzelner Plättchen mit der beströmten Staupfläche, ausserdem aber wurde sichergestellt, daß eine genügend große Fläche des Ablagerungsfeldes für die Auswertung zur Verfügung stand.

Eine Standardisierung der Auswertung wurde dadurch erreicht, dass für jedes Experiment ein identischer Ausschnitt aus dem Ablagerungsfeld gewählt wurde, der so eingestellt wurde, dass sich das Zentrum der Staupunktströmung exakt in der linken unteren Ecke des Bildschirmes befand (siehe Abbildung 4).

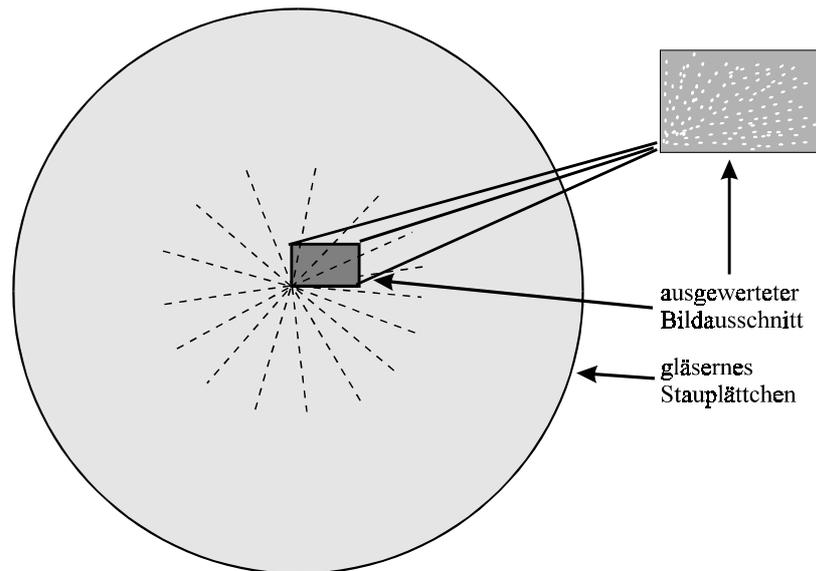


Abbildung 4

*Schematische Darstellung des mit PRP beströmten gläsernen Stauplättchens. Die haftenden Plättchen sind sternförmig entlang den Stromlinien an der Oberfläche angeordnet. Zur Quantifizierung der Adhäsionskinetik wurde in einem definierten Flächenausschnitt ($0,013 \text{ mm}^2$, **Inset rechts oben**) die Zahl adhärenter Plättchen zu festgelegten Zeitpunkten bestimmt.*

Zur Bestimmung der Adhäsion wurden die am vordefinierten Ausschnitt der Staufläche adhärenierenden Plättchen gezählt. Dazu wurde zu definierten Zeitpunkten des Strömungsexperiments das per Video aufgezeichnete Bild in einen 486 IBM kompatiblen Computer übertragen und gespeichert. Die Größe des Meßfeldes betrug $0,013 \text{ mm}^2$. Die Auswertung erfolgte zu den Zeitpunkten 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 420 Sekunden ab Beginn des Strömungsexperiments. In einer Bildauswertungssoftware (Rumitz Elektronik, Germany) erfolgte dann die Zählung der zum jeweiligen Zeitpunkt im Meßfeld der Staufläche adhärenierenden Plättchen.

Die Wachstumskinetik der Plättchen-Anhaftungsvorgänge pro Zeit- und Flächeneinheit ist dabei natürlicherweise von der Anzahl der an der Staufläche ankommenden Thrombozyten abhängig, die wiederum der im jeweiligen PRP vorliegenden Plättchenkonzentration folgt. Um auszuschließen, daß bei den Experimenten unterschiedliche Plättchenkonzentrationen Einfluß auf die erhobenen Plättchenfunktionsbefunde nahmen, wurde in einer Reihe von Kontrollexperimenten ($n=12$) untersucht, ob sich der Einfluß einer unterschiedlichen Thrombozytenkonzentration auf die Anhaftungskurven rechnerisch ausgleichen ließ. Es wurden bei dieser Versuchsreihe PRP-Konzentrationen von $98.000/\mu\text{l}$ bis $398.000/\mu\text{l}$ erreicht. Dabei zeigte

sich, daß durch Multiplikation der Adhäsionswerte mit einem Faktor, der sich aus dem Quotienten der jeweils vorliegenden Plättchen-Konzentration und der normierten Konzentration von 250.000/ μl ergab, die entstandenen Adhäsionskinetiken während der ersten 5 Minuten des Experiments fast vollständig übereinstimmten. Da im Verlaufe eines 12-minütigen Strömungsexperiments die Staufläche zunehmend von anhaftenden Thrombozyten bedeckt wird, wird die Adhäsion weiterer Plättchen durch die zum großen Teil schon mit Thrombozyten belegte Fläche möglicherweise behindert. Für den Vergleich der jeweils vorliegenden Zahlen von haftenden Plättchen wurden daher die Adhäsionswerte nach einer Strömungszeit von $t=2,5$ Minuten verwendet, da hier die Anhaftungskurven noch keine Sättigung zeigten.

Für den Vergleich der Adhäsionswerte wurden folglich sowohl die bei den Patienten wie auch den Kontrollpersonen gemessenen Adhäsions-Daten entsprechend auf eine Konzentration von 250.000 Plättchen/ μl umgerechnet. Der bei diesen Kontrollversuchen vorliegende Varianzkoeffizient lag bei 6,7 % (relativer Varianzkoeffizient = Standardabweichung/Mittelwert/Wurzel von $n \cdot 100$).

2.4 Morphometrie der Plättchenadhäsion

Die im SPAA durchgeführten Strömungsexperimente hatten die Adhäsionskinetik der Thrombozyten unter den gegebenen Bedingungen ergeben. In der vorliegenden Arbeit wurde darauf aufbauend eine morphometrische Analyse durchgeführt, die des Ausbreitungsverhaltens („spreading“) nach dem initialen Kontakt der Plättchen mit der Stauplatte erfaßte.

2.4.1 Fixierung und Färbung der Präparate

Für die morphometrische Auswertung der an der Glasfläche adhärierenden Thrombozyten wurden die aus dem SPAA- Strömungssystem erhaltenen Stauplättchen unmittelbar nach der standardisierten Strömungszeit von 12 Minuten vorsichtig aus der Kammer entfernt. Anschließend wurden die Stauplättchen in PBS-Puffer gewaschen, um nicht haftende Plättchen und Plasmareste zu entfernen. Dann wurden die adhärierenden Plättchen in 2,5%igem Glutaraldehyd fixiert, nachfolgend nach Giemsa gefärbt und die Glasplättchen als Dauerpräparate für die morphometrische Auswertung auf Glasobjektträger aufgezogen.

2.4.2 Auswahl einer repräsentativen Stichprobe der adhärenenten Thrombozyten

Plättchen, die gegen eine thrombogene Fläche geströmt werden, durchlaufen einen schrittweisen Aktivierungs- und Anhaftungsprozeß. Zunächst haften die Thrombozyten über Zytosplasmafortsätze (Pseudopodien) punktuell an der beströmten Fläche (siehe Abbildung 5, a). Nachfolgend werden diese zunächst sehr kleinen Kontaktstellen zwischen Glas und Plättchenmembran schrittweise immer ausgedehnter (siehe Abbildung 5, b): die Plättchenmembran „fließt“ zwischen die Pseudopodien. Zuletzt haften die Plättchen als flache, fast plane Scheiben am Glas (siehe Abbildung 5, c) und sehen einem Spiegelei ähnlich. Dieser Vorgang des Ausbreitens wird als „spreading“ bezeichnet.

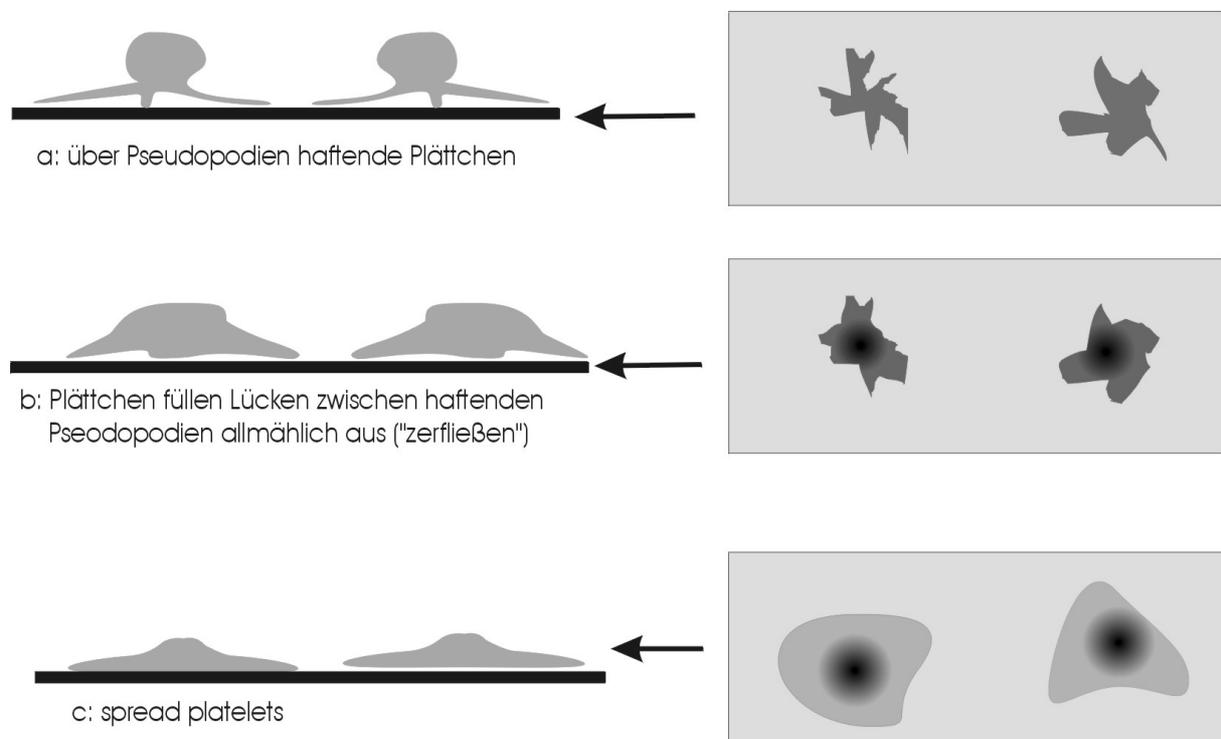


Abbildung 5

Schematische Zeichnung haftender Plättchen in verschiedenen „spreading“-Stadien in Seitensicht (links) und Aufsicht (rechts). Zunächst haften die Plättchen dendritisch über Pseudopodien an der Unterlage (a), im Zuge des Spreitens („spreading“) zerläuft gewissermaßen die Zytosplasmamembran zwischen die Pseudopodien (b), im Endstadium haften die Plättchen spiegeleiartig an der Unterlage (c).

Wird zu einem definierten Zeitpunkt des Experiments die Glasstafläche aus dem System entnommen und die adhärenen Thrombozyten fixiert, kommen alle Entwicklungsstufen des Adhäsionsablaufs vor: über Pseudopodien adhärenende Plättchen, in Zwischenstadien des spreading befindliche Thrombozyten und vollständig ausgebreitete, mit einer breiten Kontaktfläche haftende Plättchen. Die in der vorliegenden Arbeit nach zwölf Minuten Strömung ausgewerteten Plättchenpräparate stellen also eine Momentaufnahme des Adhäsionsprozesses dar.

Um eine möglichst genaue Aussage über die Morphologie der Thrombozyten bei jeder Plasmaprobe zu erhalten, wurde versucht, eine große Anzahl der spread platelets bei jeder Probe auszuwerten. Es wurden pro untersuchte Person mindestens 160 bis 180 Plättchen morphometrisch erfaßt. Das staupunktsymmetrische Ablagerungsfeld jedes Objektträgers wurde dazu in acht Sektoren aufgeteilt. In jedem dieser Sektoren wurden 20 bis 25 zufällig ausgewählte Plättchen analysiert. Auf diese Weise war gewährleistet, daß eine repräsentative Auswahl von Plättchen bei jeder PRP-Probe ausgewertet wurde.

2.4.3 Interferenzreflexionskontrastmikroskopie (IRCM)

Das Verfahren der Interferenzreflexionskontrastmikroskopie (IRCM) erlaubt die Visualisierung von Zelladhäsion an Oberflächen. Es handelt sich um ein Verfahren, bei dem Lichtreflexionen zwischen Grenzflächen mit unterschiedlichen optischen Brechungsindices n zur Darstellung gebracht werden⁶³. Wie Abbildung 6 zeigt, kommt es bei der Interaktion von Zellen mit einer Glasoberfläche zu Lichtreflexionen an Grenzflächen, die sich in unterschiedlichem Abstand von der Glasfläche befinden. Je nach Abstand der Grenzflächen vom Objektiv und je nach Brechungskonstante der beteiligten Strukturen resultierten unterschiedliche Lichtreflexionsintensitäten⁶³. Beim Zelladhäsionsverhalten werden im wesentlichen zwei Formen des Zell-Oberflächen-Kontakts mit jeweils unterschiedlicher Zellmembran-Oberflächen-Distanz unterschieden: "focal contacts" sind Kontaktstellen mit einem Abstand von etwa 10-15 nm zwischen Zellmembran und Glasfläche. Sie stellen sich als stark lichtreflektierende Anhaftungszonen dar. Bei "close contacts", der zweiten Kontaktform beträgt der Zellmembran-Glas-Abstand ca 30 nm und die Lichtreflexion ist weniger lichtintens.

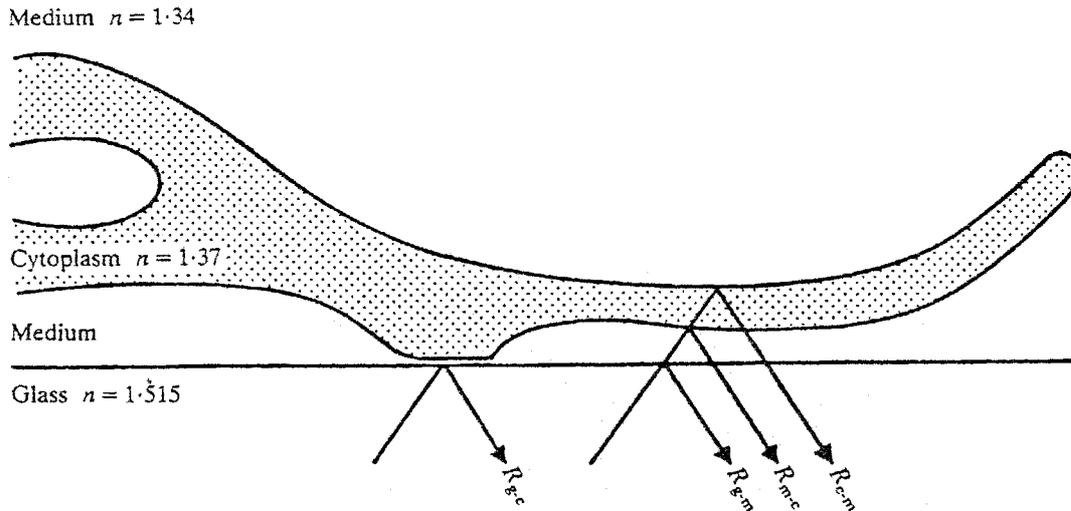


Abbildung 6

Schematische Abbildung einer an einer Glasfläche adhärenen Zelle. Dargestellt sind die an den verschiedenen Grenzflächen (Glas-Medium, Glas-Zellmembran, Zellmembran-Medium usw.) mit unterschiedlichen Brechungsindices n auftretenden Lichtreflexionen, die im IRC-Mikroskop zur Darstellung kommen.

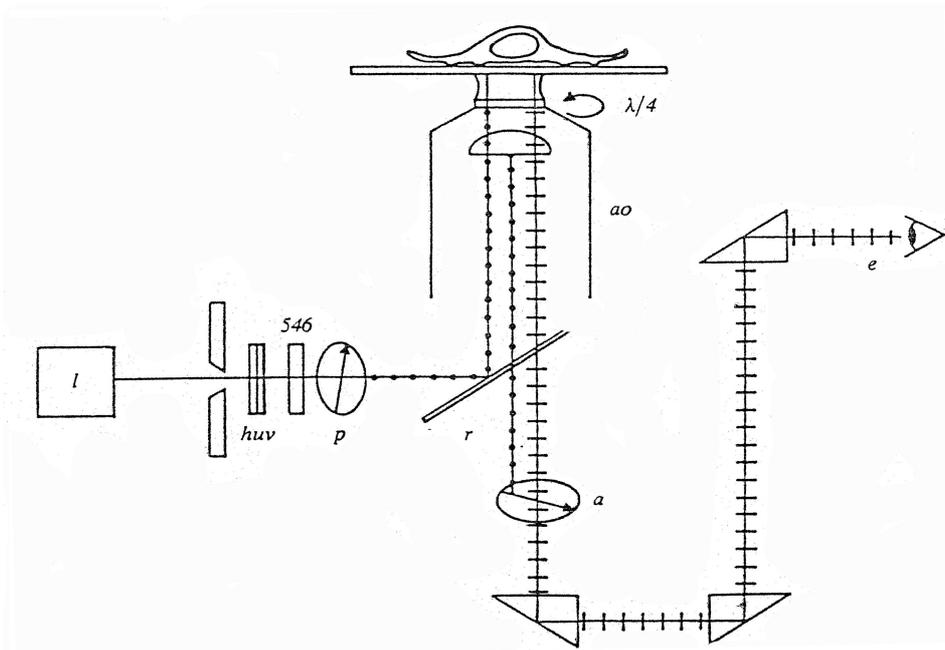


Abbildung 7

Schematische Zeichnung eines Interferenz-Reflexions-Kontrast-Mikroskops. Das an der Lichtquelle (l) entstehende Licht wird durch ein Bandfilter(546) monochromatisiert, polarisiert (p) und über einen Spiegel (r) ins Objektiv geleitet. Das an den Grenzflächen des Objekts reflektierte Licht passiert auf dem Rückweg durch das spezielle Antiflex-Objektiv ($\lambda/4$), wobei Streulicht durch den Analyzer (a) eliminiert wird und wird in das Mikroskopokular geleitet (e). (huv: Hitze- und UV-Filter).

Voraussetzung für die IRCM ist linear polarisiertes monochromatisches Auflicht (Epiillumination, Lichtquelle: Quecksilberlampe, Wellenlänge 546 nm, siehe Abbildung 7) und die Verwendung eines Ölimmersionsobjektivs. Streulicht, das nicht durch Reflexion an den Grenzflächen im Untersuchungsobjekt entsteht wird durch ein spezielles "Antiflex-Objektiv" und die Verwendung eines Licht-Analysers eliminiert (siehe Abbildung 7).

Dieses optische Prinzip erlaubt somit bei Plättchenadhäsion an Glasflächen eine semiquantitative Aussage über die Annäherung des "ventralen" Plasmalemms der Plättchen an die Glasfläche. Die Giemsa-Färbung der haftenden Plättchen intensivierte dabei das sichtbare Lichtsignal zusätzlich, so daß die Umrisse der Thrombozyten noch klarer und schärfer wurden und die verschiedenen spreading-Stadien erfaßt werden konnten. Eingang in die morphometrische Analyse fanden nur Plättchen, die im Ausbreitungsprozeß so weit fortgeschritten waren, daß ihrer Zellgrenzen einwandfrei erkennbar waren, die also eine genügend große Kontaktfläche mit dem Glas hatten.

2.4.4 Rechnergestützte interaktive Morphometrie

Der nächste Schritt war es, die durch die Interferenzkontrastmikroskopie sichtbar gemachten ausgebreiteten Plättchen morphometrisch zu erfassen. Dazu wurde jeweils ein entsprechender Ausschnitt des Mikroskopbildes (Mikroskop der Marke Zeiss Axiophot R, Germany) mit einem 63er Objektiv (Marke Zeiss, Germany) über eine CCD-Videokamera (Sony/Japan) aufgenommen, mittels eines Frame-Grabbers digitalisiert und in einen IBM-kompatiblen 486 Personal Computer übertragen. Dort wurde das Bild in einem Grafikprogramm (CorelDraw) gespeichert und anschließend der Umriß jedes einzelnen Plättchens auf dem Bildschirm mit dem Cursor in seiner genauen Ausdehnung umfahren. Man erhielt so eine zweidimensionale Nachzeichnung der Form und Fläche der ausgebreiteten Plättchen. In einem morphometrischen Bildauswertungsprogramm (Rumitz Elektronik, Germany) wurden dann Fläche A, Umfang P und der als Shape-Index verwendete Wert der Circularität (siehe Abschnitt 2.4.5) der so einzeln erfassten Plättchen quantifiziert.

2.4.5 Verwendung der inversen Circularität (1/C) als Shape Index (SI) zur morphologischen Charakterisierung der Plättchen

Der von Park und Mitarbeitern eingeführte Wert der Circularität ist definiert als:

$$C = P^2 / 4 \pi A \quad (C: \text{Circularität}, P: \text{Umfang}, A: \text{Fläche})^{41}$$

Wie aus der Formel zu ersehen wird der Circularitätswert mit steigendem Umfang und/oder fallender Fläche größer, umgekehrt wird er kleiner, je kleiner der Umfang bzw. größer die Fläche ist. Ein perfekter Kreis weist nach obiger Gleichung als geringst möglichen Wert eins auf.

Für die Morphologie der adhärierenden ausgebreiteten („spread“) Plättchen bedeutet das, je gezackter ein Plättchen ist, um so größer ist sein Umfang im Verhältnis zur Fläche. Ein eher rundes Plättchen dagegen weist einen geringeren Umfang im Verhältnis zur Fläche auf. Der Circularitätswert ist somit um so größer, je gezackter das Plättchen ist, und kleiner, je mehr sich das Plättchen einer runden Form annähert.

Plättchen, die an einer Oberfläche adhärieren, verändern ihre Form von relativ zackenförmig (mit Pseudopodien) - entsprechend relativ hohen Circularitätswerten - dann im Zuge des spreading zu einer immer runderen Form mit niedrigeren Circularitätswerten.

Zwischen Anfangszustand der Aktivierung, in dem die Plättchen mit ihrer durch die ausgestülpten Pseudopodien verursachten gezackten an Gestalt an der beströmten Fläche adhäreren, und dem darauffolgenden Prozess des schrittweisen Ausbreitens, in dem die Plättchen sich immer mehr einer runden Kreisform annähern, um schließlich im irreversiblen Endzustand der Aktivierung mit einer breiten Fläche und einer runden Form dem „Idealzustand“ des Kreises immer näher zu kommen, bestehen also fließende Unterschiede, die durch die Circularität quantitativ beschrieben werden können.

Sämtliche nach der obigen Formel errechneten Circularitätswerte C wurden für die folgenden Auswertungen invertiert (1/C), da hierdurch die zwischen den festen Grenzen 1 und 0 entstehenden Werte leichter vergleichbar und grafisch veranschaulicht wurden.

2.5 Statistische Auswertung

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten statistischen Tests wurden einerseits zur Feststellung etwaiger Unterschiede in der Circularität zwischen Patienten- und Kontrollgruppe eingesetzt, andererseits verwendeten wir statistische Analysemethoden zur Beurteilung von Korrelationen sowohl zwischen Fibrinogen, Cholesterin, HDL, LDL, Triglyzeriden und Shape Index 1/C.

Der Student t-test und die univariante Analyse wurden im Zusammenhang mit Unterschieden in der Circularität zwischen Kontrollpersonen und AVK-Patienten (siehe Abschnitt 3.1 und 3.2) eingesetzt, Korrelationen wurden mittels linearer Regressionsanalyse und univarianter Analyse überprüft. Nichtparametrische Kruskal-Wallis-Tests kamen bei der Evaluierung von Unterschieden des Shape Index 1/C der untersuchten Plättchen im Zusammenhang mit den 2X2 - Tafeln zum Einsatz (siehe Abschnitt 3.4).

Für den Vergleich der Adhäsion bei vWD-, AMI-Patienten und gesunden Spendern sowie für die Ergebnisse bei den Membranrezeptorblockierungen wurde der Student t-test eingesetzt.

Als Signifikanzniveau definierten wir bei allen Analysen einen p-Wert von 0.05.

3 Ergebnisse

3.1 Shape Index (SI) als quantifizierbarer Adhäsionsparameter bei AVK - Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Plättchen von an AVK erkrankten Patienten weisen im Vergleich zu gesunden Spendern ein signifikant gesteigertes Adhäsionsverhalten auf^{46,47}. Die Quantifizierung durch den Shape Index (SI) $1/C$ sollte zeigen, ob morphologische Parameter adhärenter Plättchen mit der gesteigerten Aktivierbarkeit der Plättchen bei AVK-Patienten korrelieren.

Es wurden bei den Circularitätsmessungen insgesamt 6932 Plättchen (53 % aus den Proben der AVK-Patienten, 47 % aus denen der gesunden Kontrollpersonen) ausgewertet. Der geringste gemessene Circularitätswert C_{\min} lag bei 1,246 ($1/C=0,803$), der höchste C_{\max} betrug 7,719 ($1/C=0,13$). Der Mittelwert aller gemessenen Circularitätswerte in Patienten- und Kontrollgruppe zusammen lag bei 2,253 ($\pm 0,695$). Der Mittelwert der invertierten C-Werte ($1/C$) betrug 0,479 ($\pm 0,121$). Die Daten zeigten eine symmetrische Verteilung. Abbildung 8a zeigt die Verteilung aller bei AVK-Patienten und Kontrollen erfassten $1/C$ -Werte. xxb zeigt charakteristische Morphologien adhärenter Plättchen, die den in xxa dargestellten Circularitätswerten entsprechen.

Auch die nach Patienten- und Kontrollgruppe getrennte Auftragung der Häufigkeitsverteilungen aller gemessenen SI - Werte ergab eine symmetrische Verteilung der beiden Wertemengen (siehe Abbildung 9). Der Vergleich der Häufigkeitsverteilungen zwischen Kontrollgruppe und AVK - Patienten ergab einen hochsignifikanten Unterschied ($p<0.0001$), wobei die Verteilung der $1/C$ -Werte in der Patientengruppe nach rechts zu erhöhten $1/C$ - Werten verschoben war (siehe Abbildung 9). Der Mittelwert aller gemessenen $1/C$ - Werte bei den Kontrollpersonen betrug 0,427 ($\pm 0,112$), bei den Patienten 0,524 ($\pm 0,111$). Die beiden schematisch in Abbildung 9 dargestellten Plättchen sind für die jeweils angezeigten $1/C$ - Werte charakteristisch und verdeutlichen exemplarisch den morphologischen Unterschied im spreading - Verhalten der Plättchen zwischen Kontroll- und Patientengruppe. Hohe $1/C$ - Werte bei den Patienten bedeuteten, daß kreisrunde und ausgebreitete Plättchen dominieren. Die bei den gesunden Spendern gemessenen niedrigeren $1/C$ -Werte dagegen repräsentierten überwiegend dendritische Plättchen mit gezackten Umrissen, bei denen die ursprünglich ausgebildeten Pseudopodien noch gut erkennbar sind.

Abbildung 10 zeigt IRCM-Darstellungen von spread Plättchen eines AVK-Patienten (a) und einer gesunden Kontrollperson (b).

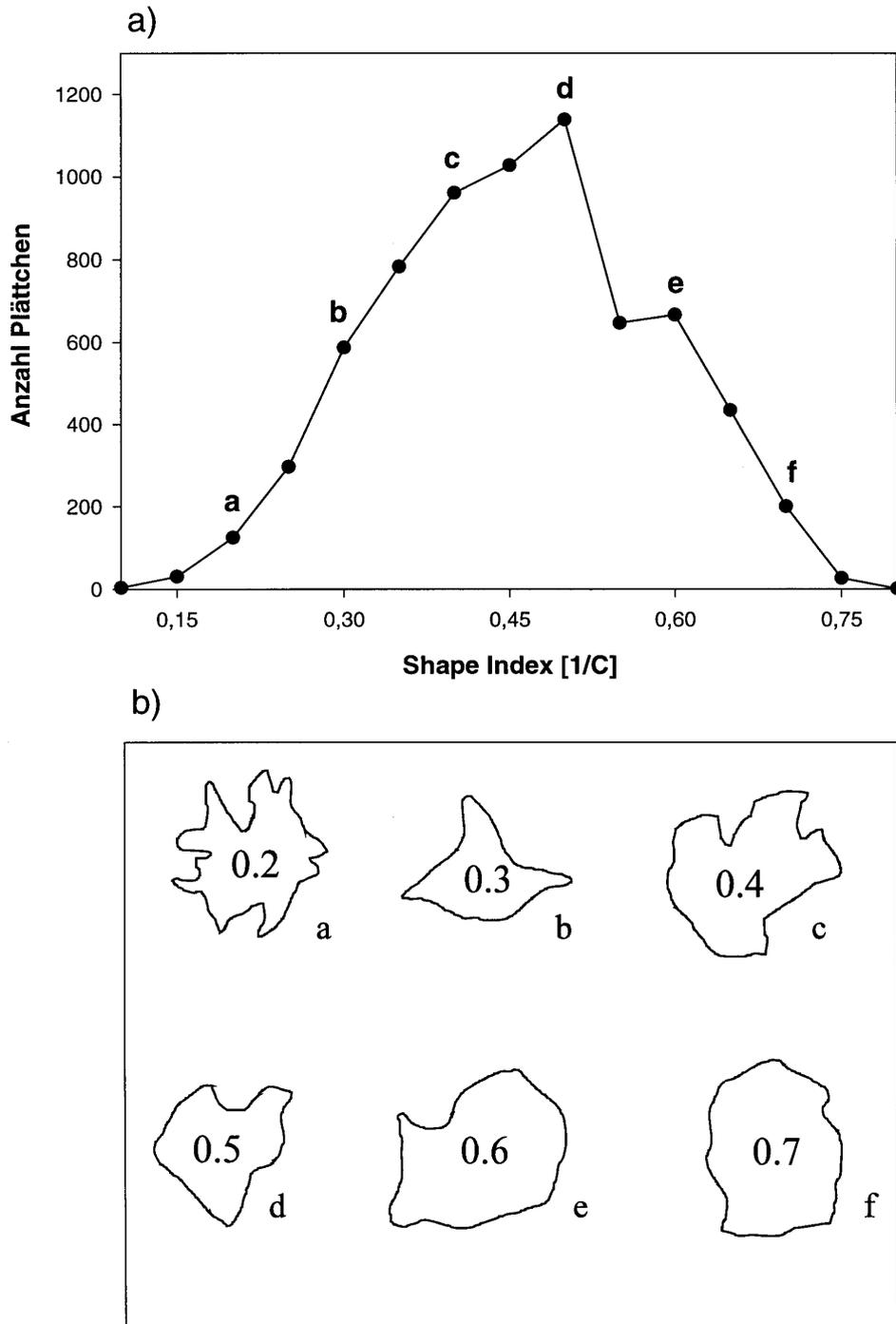


Abbildung 8

Kumulative Verteilung aller Circularitätswerte ($1/C$) von AVK-Patienten und gesunden Kontrollen. In der schematischen Zeichnung (xsb) sind verschiedene repräsentative Morphologien geordnet nach steigendem „spreading“ mit ihrem jeweiligen $1/C$ -Wert dargestellt, die den in xsa mit Buchstaben (a-f) angegebenen $1/C$ -Werten entsprechen.

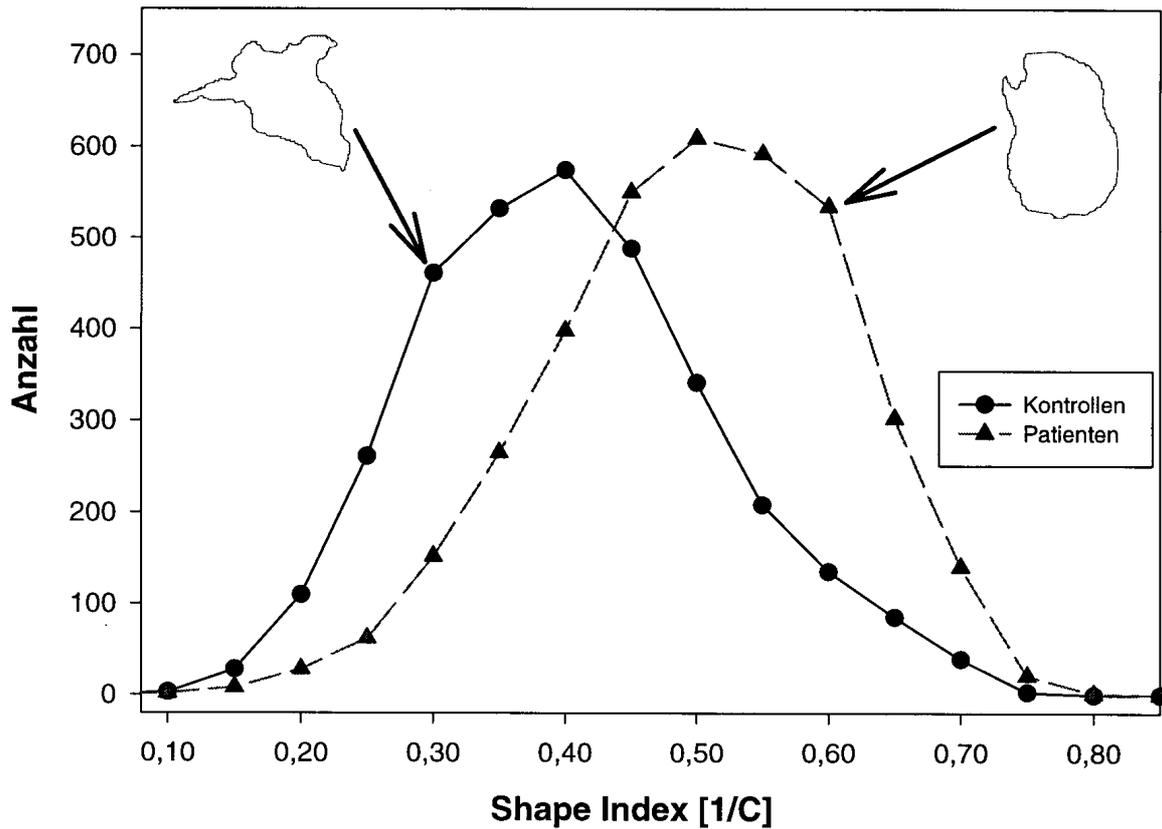


Abbildung 9

Kumulative Verteilung der 1/C-Werte der „spread“ Plättchen von AVK-Patienten (Dreiecke) und gesunden Kontrollpersonen (Punkte). Die schematisch gezeichneten Plättchenformen sind mit ihrem jeweils angezeigten 1/C-Wert für Patienten- bzw. Kontrollgruppe charakteristisch.

Die Tabellen 4 und 5 zeigen für AVK-Patienten und Kontrollen getrennt Mittelwerte und Standardabweichungen der Circularität, errechnet aus den etwa 160 bis 180 einzelnen adhärenierenden Plättchen, die bei jedem Individuum gemessen worden waren. Es ergab sich so für jeden Spender ein charakteristisches Maß - der Shape Index, mit dem die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Auswertungen und Analysen durchgeführt wurden.

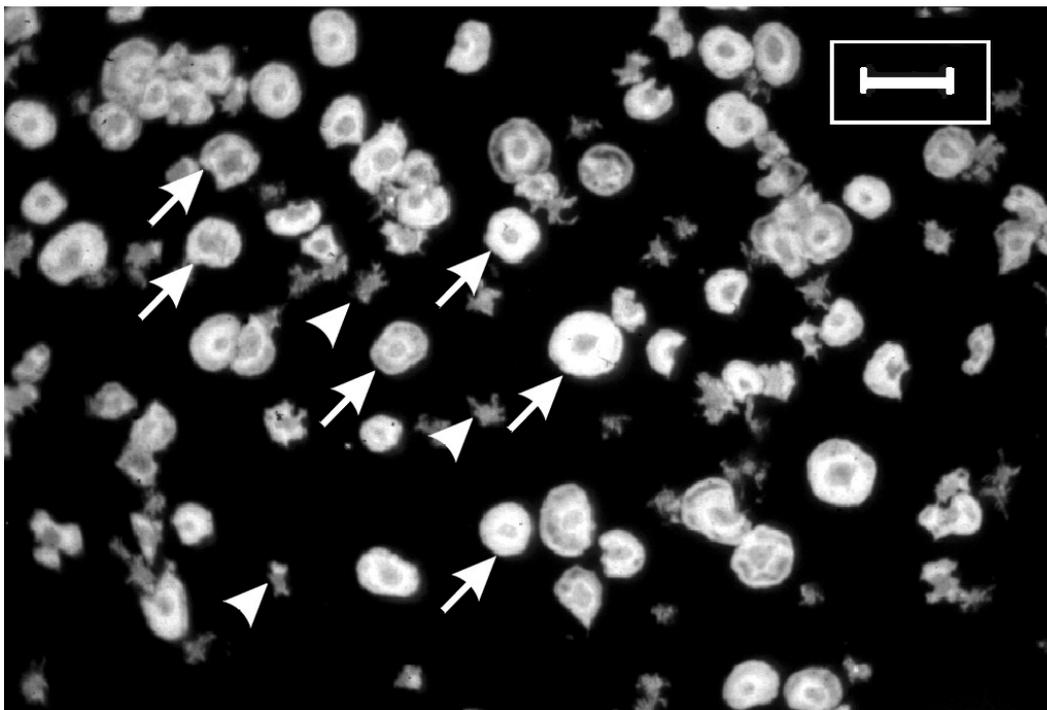
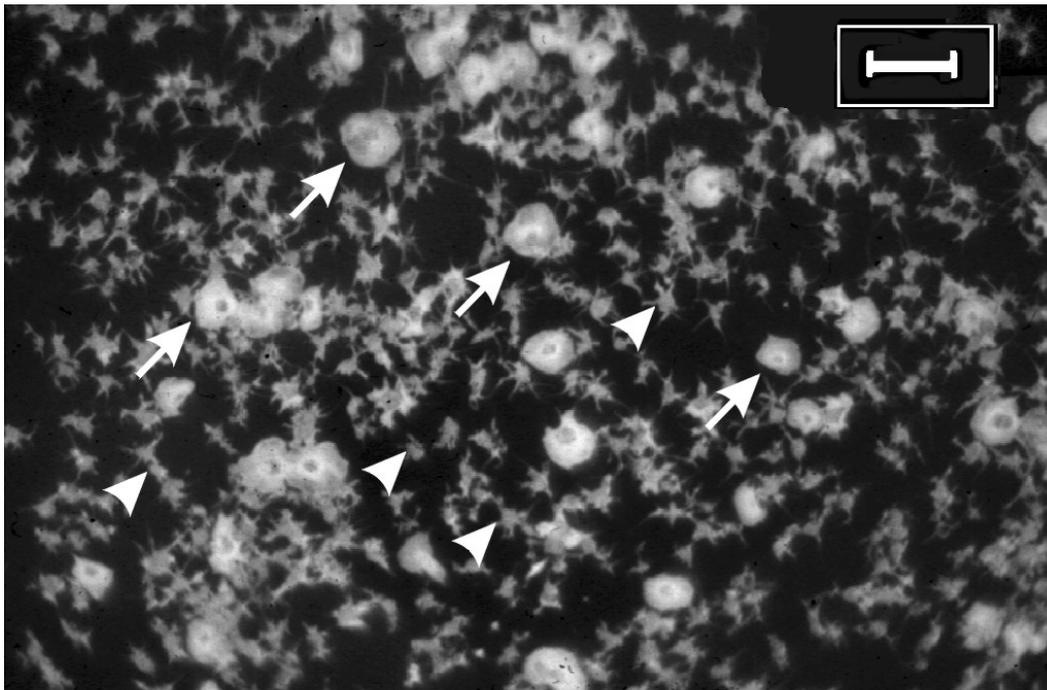


Abbildung 10

Interferenz-Reflexions-Kontrast-Mikrophotographie von „spread“ Plättchen einer gesunden Kontrollperson (xxa, oben) und eines AVK-Patienten (xxb, unten). Deutlich ist die Unterscheidung von „spread“ (Pfeile) Plättchen, die die Mehrheit bei den Patienten stellte, und nicht-„spread“ (Pfeilspitzen) Plättchen, die vor allem bei den gesunden Kontrollen vorkamen, zu erkennen. Der Balken entspricht 10 μm .

AVK-Patienten

Nummer d. Patienten	1/C (SI)			C		
	Mittel- wert	+/- weichung	St.ab- weichung	Mittel- wert	+/- weichung	St.ab- weichung
1	0,467		0,087	2,225		0,456
2	0,483		0,089	2,149		0,435
3	0,536		0,103	1,954		0,471
4	0,573		0,121	1,845		0,504
5	0,497		0,104	2,12		0,558
6	0,539		0,128	2,041		0,882
7	0,538		0,098	1,935		0,427
8	0,55		0,094	1,879		0,363
9	0,556		0,115	1,908		0,572
10	0,534		0,098	1,941		0,383
11	0,522		0,12	2,038		0,568
12	0,53		0,097	1,968		0,492
13	0,532		0,085	1,937		0,368
14	0,539		0,151	2,086		0,886
15	0,518		0,092	2,001		0,406
16	0,517		0,091	2,001		0,389
17	0,536		0,097	1,937		0,408
18	0,506		0,119	2,122		0,707
19	0,53		0,128	2,047		0,72
20	0,522		0,113	2,02		0,521
21	0,482		0,103	2,183		0,527
22	0,526		0,108	1,996		0,481
Mittelwert *	0,524 *		0,106	2,02		0,524
SA *	0,025 *		0,016	0,101		0,151

Tabelle 4

*Shape Index (1/C) und Circularität (C) bei AVK-Patienten. Die mit * gekennzeichneten Werte werden im folgenden Text (ab Abschnitt 3.2) als 1/C' bzw. SA 1/C' bezeichnet.*

Gesunde Kontrollpersonen

Nummer d. Spenders	1/C (SI)			C		
	Mittel- wert 1/C	+/- weichung	St.ab- weichung	Mittel- wert C	+/- weichung	St.ab- weichung
1	0,466		0,138	2,396		0,926
2	0,498		0,117	2,14		0,6
3	0,386		0,097	2,801		0,907
4	0,396		0,088	2,682		0,738
5	0,45		0,071	2,282		0,418
6	0,377		0,085	2,788		0,642
7	0,373		0,086	2,841		0,751
8	0,356		0,063	2,892		0,489
9	0,402		0,068	2,612		0,629
10	0,362		0,083	2,926		0,74
11	0,391		0,077	2,679		0,657
12	0,441		0,104	2,407		0,648
13	0,346		0,081	3,067		0,797
14	0,4156		0,128	2,627		0,76
15	0,466		0,117	2,304		0,686
16	0,414		0,091	2,553		0,665
17	0,519		0,103	2,017		0,476
18	0,49		0,113	2,182		0,672
19	0,486		0,121	2,226		0,769
20	0,473		0,104	2,224		0,541
21	0,438		0,102	2,417		0,632
Mittelwert *	0,426 *		0,097	2,527		0,673
SA *	0,051 *		0,02	0,296		0,129

Tabelle 5

*Shape Index (1/C) und Circularität (C) bei gesunden Kontrollpersonen. Die mit * gekennzeichneten Werte werden im folgenden Text (ab Abschnitt 3.2) als 1/C' bzw. SA 1/C' bezeichnet.*

3.2 Korrelation morphologischer und funktioneller Parameter der Adhäsion

3.2.1 Korrelation von Shape Index (SI) und Plättchenadhäsivität

Die Experimente mit dem SPAA hatten einen hochsignifikanten Unterschied im Adhäsionsverhalten zwischen den Plättchen gesunder und an AVK erkrankter Spender gezeigt ⁴⁶. Im folgenden ist die im SPAA gemessene Plättchenfunktion - ausgedrückt durch die Konstante KPW - mit dem Shape Index Circularität korreliert.

Abbildung 11

Lineare Regression zwischen Shape Index Circularität (1/C) und der Plättchenadhäsivität (KPW). Die durchgezogene Linie symbolisiert die Regressionsgerade, die gepunkteten Linien das Konfidenzintervall von 0.95.

Es ergab sich eine lineare Regression zwischen den beiden Parametern, wobei alle Meßpunkte innerhalb des Konfidenzintervalls von 0.95 lagen. Ein hoher Adhäsivitätswert (KPW) ging mit einem großen 1/C-Wert einher, umgekehrt waren niedrigere KPW-Werte mit geringeren 1/C- Werten assoziiert.

Statistisch zeigte eine unabhängige Varianzanalyse der Daten eine hochsignifikante ($p=0.0001$) Korrelation zwischen den Parametern KPW und 1/C.

3.2.2 Shape Index (SI) und Adhäsivität im Vergleich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe

Der Vergleich von Shape Index (1/C) und Plättchenadhäsivität (KPW) in Patienten- und Kontrollgruppe ist in Abbildung 12 gezeigt. Der Mittelwert der Circularitätswerte $1/C'$ lag in der AVK-Patientengruppe bei 0,524 (+- 0,025), bei den gesunden Kontrollen bei 0,426 (+- 0,051) (siehe auch Tabelle 4 und 5).

Abbildung 12

Abhängigkeit von 1/C und KPW, dargestellt separat für Kontroll- (Punkte) und Patientengruppe (Dreiecke). Ein Meßpunkt repräsentiert dabei den Mittelwert der pro Versuchsperson gemessenen Werte (Punkte und Dreiecke). Die Quadrate symbolisieren den gesamten Durchschnitt aller in Patienten- und Kontrollgruppe ermittelten Shape-Index und KPW-Daten. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an.

Es ergaben sich bei dieser Auftragung fast vollständig voneinander getrennte Populationen, d.h. die im Verhältnis zur Kontrollgruppe signifikant erhöhten Funktionskonstanten KPW der AVK - Patienten waren zusätzlich mit gesteigerten 1/C-Werten verknüpft, während die geringeren KPW-Werte der gesunden Kontrollpersonen mit niedrigeren 1/C - Werten einhergingen. Die statistische Analyse der Daten ergab mit $p < 0.001$ einen hochsignifikanten Unterschied.

3.3 Einzelkorrelation von Shape Index (SI) und Risikofaktoren der Atherosklerose

Im folgenden untersuchten wir, inwieweit die Morphologie adhärenter Thrombozyten mit den für die Entwicklung einer Atherosklerose bekannten Risikofaktoren korrelierte. Hierzu wurde der Zusammenhang zwischen der Circularität (1/C) und den Plasmaspiegeln von Fibrinogen, Cholesterin, Triglyzeride und den Lipoproteinfraktionen Low Density Lipoprotein (LDL) und High Density Lipoprotein (HDL) getestet.

3.3.1 Shape Index (SI) und Fibrinogen

Die Auftragung für die Parameter Fibrinogen und 1/C (Abbildung 13) zeigte, daß erhöhte Plasmakonzentrationen von Fibrinogen bei den Patienten mit erhöhten 1/C - Werten assoziiert waren, während die gesunden Kontrollpersonen mit niedrigeren Fibrinogenspiegeln gleichzeitig geringere 1/C - Werte erreichten. Diese Korrelation der Fibrinogenwerte mit 1/C in beiden Gruppen zusammen war allerdings statistisch nicht signifikant.

Abbildung 13

Abhängigkeit von 1/C und Plasma-Fibrinogen, dargestellt separat für Kontroll- (Punkte) und Patientengruppe (Dreiecke). Ein Meßpunkt repräsentiert dabei den Mittelwert der pro Versuchsperson gemessenen Werte (Punkte und Dreiecke). Die Quadrate symbolisieren den gesamten Durchschnitt aller in Patienten- und Kontrollgruppe ermittelten Shape-Index und Fibrinogen-Daten. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an.

3.3.2 Shape Index (SI) und Cholesterin

Ähnlich wie die Auftragung von Fibrinogen gegen $1/C$ bestätigte auch die von Gesamtcholesterin gegen $1/C$ (Abbildung 14) den Trend, daß höhere Konzentrationen von Cholesterin im Plasma mit größeren $1/C$ - Werten verknüpft waren und daß sich diese Konstellation vor allem in der Patientengruppe zeigte, während die Kontrollgruppe niedrigere Plasmaspiegel für Cholesterin und gleichzeitig geringere Circularitätswerte $1/C$ aufwies. Diese Korrelation ergab allerdings auch hier keinen statistisch signifikanten Zusammenhang.

Abbildung 14

Abhängigkeit von $1/C$ und Plasma-Cholesterin, dargestellt separat für Kontroll- (Punkte) und Patientengruppe (Dreiecke). Ein Meßpunkt repräsentiert dabei den Mittelwert der pro Versuchsperson gemessenen Werte (Punkte und Dreiecke). Die Quadrate symbolisieren den gesamten Durchschnitt aller in Patienten- und Kontrollgruppe ermittelten Shape-Index und Cholesterin-Daten. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an.

3.3.3 Shape Index (SI) und Low Density Lipoprotein (LDL)

Analog zeigte sich tendentiell, daß die erhöhte Konzentrationen von Low Density Lipoprotein (LDL) im Blut der AVK-Patienten mit einem höheren Shape Index assoziiert waren. Die Daten in der Kontrollgruppe zeigten demgegenüber einen Trend sowohl zu geringeren LDL als auch $1/C$ - Werten (Abbildung 15). Die Korrelation aller Cholesterinwerte mit dem Shape Index zeigte statistisch keinen p-Wert von weniger als 0.05.

Abbildung 15

Abhängigkeit von $1/C$ und Plasma-LDL, dargestellt separat für Kontroll- (Punkte) und Patientengruppe (Dreiecke). Ein Meßpunkt repräsentiert dabei den Mittelwert der pro Versuchsperson gemessenen Werte (Punkte und Dreiecke). Die Quadrate symbolisieren den gesamten Durchschnitt aller in Patienten- und Kontrollgruppe ermittelten Shape-Index und LDL-Daten. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an.

3.3.4 Shape Index (SI) und High Density Lipoprotein (HDL)

Die Betrachtung des Zusammenhangs zwischen Shape Index $1/C$ und der Konzentration von High Density Lipoprotein (HDL) (Abbildung 16) ergab, daß die Patientengruppe mit den erhöhten $1/C$ - Werten im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigte HDL - Spiegel aufwies, während die niedrigeren $1/C$ - Daten der Kontrollpersonen mit erhöhten Spiegeln für HDL verbunden waren. Alle $1/C$ - und HDL -Werte in Kontroll- und Patientengruppe zusammen ließen sich dabei mit einem p-Wert von 0.016 statistisch signifikant miteinander korrelieren.

Abbildung 16

Abhängigkeit von $1/C$ und Plasma-HDL, dargestellt separat für Kontroll- (Punkte) und Patientengruppe (Dreiecke). Ein Meßpunkt repräsentiert dabei den Mittelwert der pro Versuchsperson gemessenen Werte (Punkte und Dreiecke). Die Quadrate symbolisieren den gesamten Durchschnitt aller in Patienten- und Kontrollgruppe ermittelten Shape-Index und HDL-Daten. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an.

3.3.5 Shape Index (SI) und Triglyzeride

Der Vergleich der Auftragung der $1/C$ -Werte gegen die Konzentration der Triglyzeride zwischen Patienten- und Kontrollgruppe zeigte, daß bei den Patienten wiederum die erhöhten Shape Index-Werte mit erhöhten Triglyzeridspiegeln einhergingen, die Kontrollgruppe dagegen wies geringere Triglyzeridspiegel auf, assoziiert mit niedrigeren $1/C$ -Werten (Abbildung 17). Diese Korrelation von Triglyzeriden mit $1/C$ war statistisch nicht signifikant.

Abbildung 17

Abhängigkeit von $1/C$ und Plasma-Triglyzeriden, dargestellt separat für Kontroll- (Punkte) und Patientengruppe (Dreiecke). Ein Meßpunkt repräsentiert dabei den Mittelwert der pro Versuchsperson gemessenen Werte (Punkte und Dreiecke). Die Quadrate symbolisieren den gesamten Durchschnitt aller in Patienten- und Kontrollgruppe ermittelten Shape-Index und Triglyzeride-Daten. Die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an.

3.4 Bedeutung der Kombination verschiedener Risikofaktoren für die Plättchenmorphologie

Um den wechselseitigen Einfluß von Kombinationen verschiedener Risikofaktoren auf den Shape Index zu untersuchen, wurden die Shape Index-Werte $1/C$ in jeweils vier verschiedenen Personengruppen miteinander verglichen. Die Gruppen ergaben sich aus einer Einteilung der untersuchten Spenderpopulation nach hohen bzw. niedrigen Konzentrationsbereichen der jeweils untersuchten Plasmasubstanzen. Als Diskriminationspunkt, der die Einteilung in hoch bzw. niedrig festlegte, wurde der Mittelwert festgelegt. Er ist jeweils in der Bildlegende angegeben.

3.4.1 Fibrinogen und Cholesterin vs Shape Index (SI)

Die Auftragung für die Plasmaparameter Fibrinogen und Cholesterin (Abbildung 18) zeigte, daß die höchsten $1/C$ - Werte in der Gruppe vorlagen, die sowohl hohe Werte für Fibrinogen (> 350 mg/dl) als auch Cholesterin (> 220 mg/dl) aufwies. Der Mittelwert von $1/C$ lag in dieser Gruppe bei 0,50. Umgekehrt wurden die geringsten Werte von $1/C$ bei der Kombination niedrig/niedrig erreicht ($1/C = 0,442$). Die Spendergruppe mit niedrigen Fibrinogenkonzentrationen, gleichzeitig aber hohen Cholesterinwerten, wies als mittlere Circularität $1/C$ einen Wert von 0,48, die Gruppe mit hohen Fibrinogenspiegeln und niedrigen Cholesterinkonzentrationen war durch einen $1/C$ -Wert von 0,486 gekennzeichnet. Keiner dieser Unterschiede war allerdings statistisch signifikant.

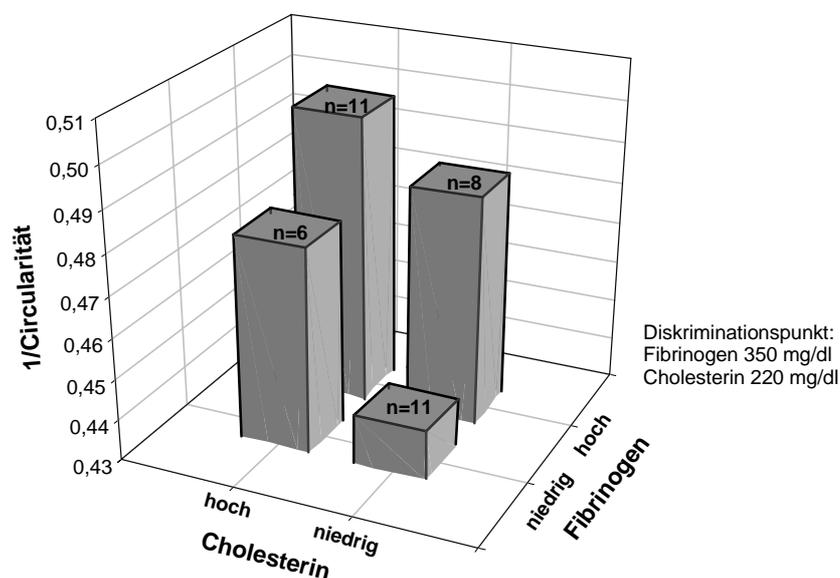


Abbildung 18

Dreidimensionale Korrelation der Circularität (1/C) mit Plasma-Fibrinogen und -cholesterin. Fibrinogen und Cholesterin wurden in „hoch“ und „niedrig“-Bereiche aufgeteilt, deren Diskriminationspunkt jeweils angegeben ist. Die höchsten 1/C-Werte werden bei der Kombination hohes Fibrinogen und hohes Cholesterin erreicht, die Gruppe niedriges Fibrinogen und niedriges Cholesterin weist die geringsten 1/C-Werte auf.

3.4.2 Fibrinogen und Triglyceride vs Shape Index (SI)

Ähnlich wie der Zusammenhang von Fibrinogen, Cholesterin und Shape Index ergab auch die Kombination Triglyceride und Fibrinogen in der Gruppe, in der beide Parameter unter dem allgemeinen Mittelwert (<350 mg/dl für Fibrinogen, <150 mg/dl für Triglyceride) lagen, mit 0,445 den geringsten 1/C-Wert. Der höchste Wert für 1/C wurde mit 0,512 hier allerdings in dem Spenderkollektiv erreicht, in dem die Plasma-Fibrinogenspiegel unter 350 mg/dl und die Konzentrationen der Triglyceride größer als 150 mg/dl waren. Die Spendergruppe mit der Kombination sowohl hohe Fibrinogenkonzentration als auch hohe Triglyceridspiegel wies einen Circularitätswert von 0,504 auf. 0,471 war der 1/C - Wert in der Gruppe mit hohen

Fibrinogen- aber niedrigen Triglyzeridkonzentrationen. Diese in Abbildung 19 veranschaulichten Unterschiede waren mit einem mittleren p-Wert von 0.024 signifikant.

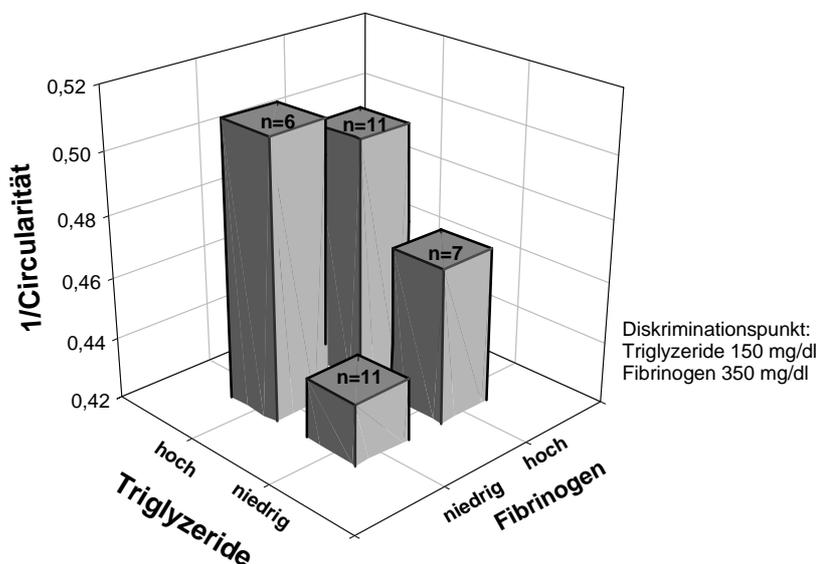


Abbildung 19

Dreidimensionale Korrelation der Circularität (1/C) mit Plasma-Fibrinogen und Triglyzeriden. Fibrinogen und Triglyzeride wurden in „hoch“ und „niedrig“-Bereiche aufgeteilt, deren Diskriminationspunkt jeweils angegeben ist. Die höchsten 1/C-Werte werden bei der Kombination niedriges Fibrinogen und hohe Triglyzeride erreicht, die Gruppe niedriges Fibrinogen und niedrige Triglyzeride weist die geringsten 1/C-Werte auf.

3.4.3 HDL und LDL vs Shape Index

Die Betrachtung des Shape Index in der Kombination der Lipoproteinfraktionen LDL und HDL (Abbildung 20) ergab als kleinsten 1/C-Wert 0,409, der in der Spendergruppe mit Plasma - LDL - Werten von mehr als 130 mg/dl und mit HDL-Spiegeln, die niedriger als 40 mg/dl lagen. 0,496 war in der Gruppe, in der die HDL - Konzentration niedrig und LDL - Spiegel hoch war, der in diesem Zusammenhang höchste 1/C-Wert. Die Spender mit sowohl hohen LDL - als auch HDL - Spiegeln wiesen als Mittel der inversen Circularität den Wert von 0,469 auf, umgekehrt lag 1/C bei sowohl niedrigen LDL - wie auch HDL - Spiegeln bei 0,49. Diese Unterschiede waren mit einem p-Wert von 0.004 hochsignifikant.

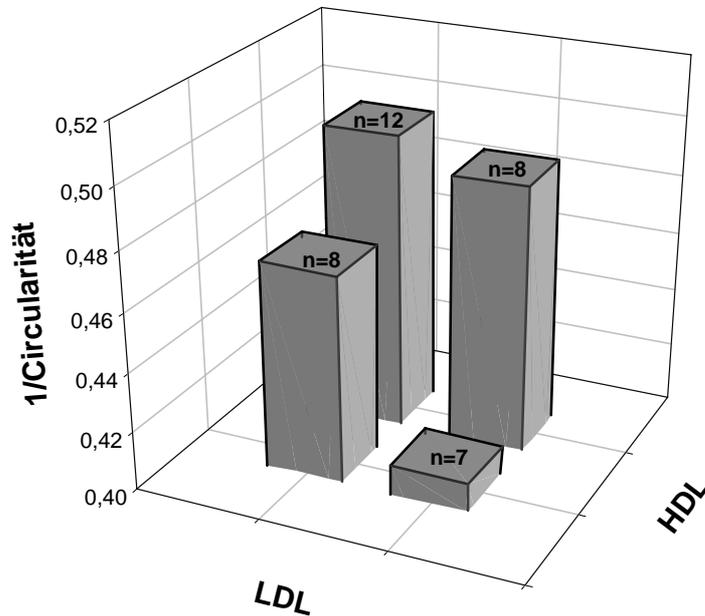


Abbildung 20

Dreidimensionale Korrelation der Circularität (1/C) mit LDL und HDL-Cholesterin. LDL und HDL wurden in „hoch“ und „niedrig“-Bereiche aufgeteilt, deren Diskriminationspunkt jeweils angegeben ist. Die höchsten 1/C-Werte werden bei der Kombination hohes LDL und niedriges HDL erreicht, die Gruppe niedriges LDL und hohes HDL weist die geringsten 1/C-Werte auf.

3.4.4 LDL und Fibrinogen vs Shape Index (SI)

Die Kombination von LDL und Fibrinogen (Abbildung 21) hatte mit 0,494 in der Gruppe mit sowohl hoher Fibrinogen- als auch LDL-Konzentration den höchsten 1/C-Wert als Ergebnis. Diskriminationspunkte waren hier wiederum eine Fibrinogenkonzentration von 350 mg/dl und ein LDL-Wert von 130 mg/dl. Bei der Kombination niedrig/niedrig war der mittlere 1/C-Wert 0,445, bei hoch/hoch 0,49. Die Gruppe mit hohem Fibrinogen und niedrigem LDL wies einen 1/C-Wert von 0,467, die mit niedrigem Fibrinogen und hohem LDL einen 1/C-Wert von 0,485 auf.

Bei keiner der dargestellten Unterschiede ließ sich eine statistische Signifikanz nachweisen ($p=0.15$).

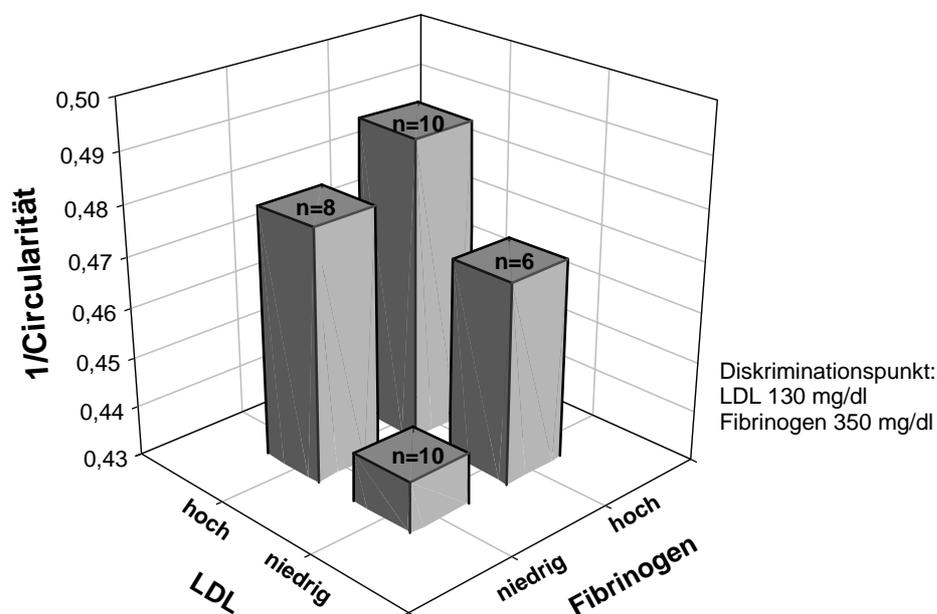


Abbildung 21

Dreidimensionale Korrelation der Circularität (1/C) mit Plasma-Fibrinogen und LDL-Cholesterin. Fibrinogen und LDL wurden in „hoch“ und „niedrig“-Bereiche aufgeteilt, deren Diskriminationspunkt jeweils angegeben ist. Die höchsten 1/C-Werte werden bei der Kombination hohes Fibrinogen und hohes LDL-Cholesterin erreicht, die Gruppe niedriges Fibrinogen und niedriges LDL weist die geringsten 1/C-Werte auf.

3.4.5 HDL und Fibrinogen vs Shape Index (SI)

Abbildung 22 zeigt den Zusammenhang zwischen HDL, Fibrinogen und der Circularität. Bei niedrigen Spiegeln von Fibrinogen kombiniert mit hohen von HDL erreichten die Circularitätswerte ein Minimum (im Mittel 0,439), am höchsten dagegen waren sie in der Gruppe mit niedrigen HDL - und hohen Fibrinogenkonzentrationen (im Mittel 0,503). Dazwischen lagen die Circularitätswerte bei den Kombinationen niedrig/niedrig (im Mittel 0,483) und hoch/hoch (im Mittel 0,457). Die Diskriminationswerte waren auch hier wieder 350 mg/dl für Fibrinogen

und 40 mg/dl für HDL. Diese Unterschiede erreichten mit einem mittleren p-Wert von 0.015 statistische Signifikanz.

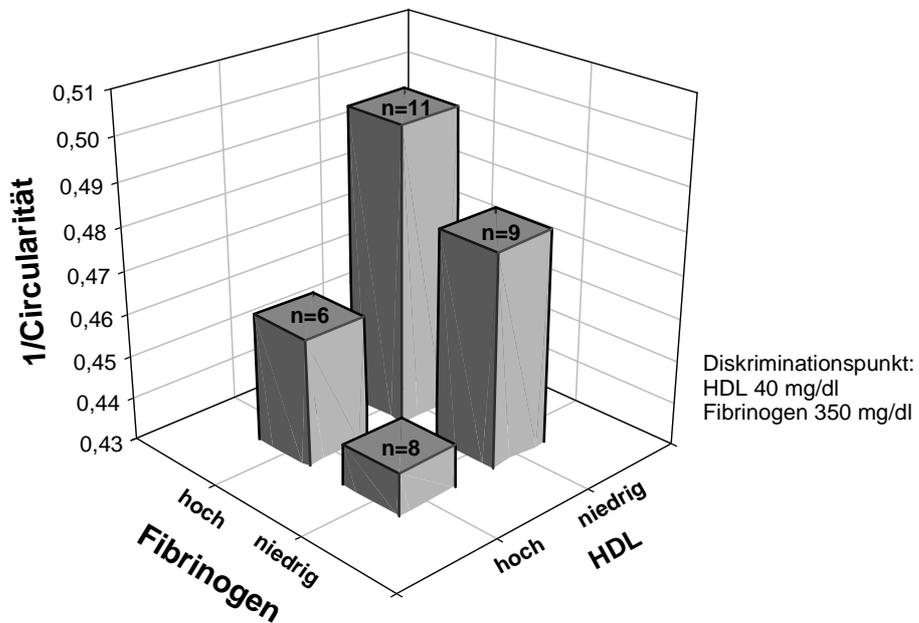


Abbildung 22

Dreidimensionale Korrelation der Circularität (1/C) mit Plasma-Fibrinogen und HDL-Cholesterin. Fibrinogen und HDL wurden in „hoch“ und „niedrig“-Bereiche aufgeteilt, deren Diskriminationspunkt jeweils angegeben ist. Die höchsten 1/C-Werte werden bei der Kombination hohes Fibrinogen und niedriges HDL erreicht, die Gruppe niedriges Fibrinogen und hohes HDL weist die geringsten 1/C-Werte auf.

3.5 Einfluss der in vitro-Inhibition von Plättchenmembranrezeptoren auf funktionelle und morphologische Parameter der Adhäsion

Das Tetrapeptid Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS), das Peptidanalogen Ro 43-8857 sowie das Antikörperfragment c7E3-Fab inhibieren die Plättchenfunktion durch Blockade des Plättchenmembranrezeptorkomplex GpIIb/IIIa^{24,48}. In der vorliegenden Arbeit wurde im SPAA in vitro der Effekt dieser Stoffe auf Plättchenadhäsion und spreading getestet.

3.5.1 Einfluß des Tetrapeptids RGDS

Bei den Strömungsexperimenten im SPAA zeigte sich, daß ab einer RGDS-Konzentration von 100 µmol/l im PRP eine deutliche Reduktion der Plättchenadhäsion nachweisbar war (75 % der Werte der Kontrollexperimente ohne RGDS). Mit steigenden RGDS-Konzentrationen ließ sich die Adhäsion immer stärker inhibieren und erreichte ab 400 µmol/l RGDS im PRP ein Plateau (37 % der Werte der Kontrollexperimente), d.h. von da an konnte auch durch Erhöhung der RGDS-Konzentration auf 600 µmol/l keine weitere Reduktion der Plättchenadhäsion erzielt werden.

Im folgenden wurden die unter RGDS-Einfluß im SPAA adhärierenden Thrombozyten zusätzlich morphometrisch ausgewertet, d.h. es wurde der Shape Index (SI) 1/C (siehe Abschnitt 2.4.5) der Plättchen ermittelt. Abbildung 23 zeigt die Abhängigkeit des Shape Index (SI) 1/C von der RGDS-Konzentration. Die niedrigsten 1/C-Werte, entsprechend Plättchen mit weitgehend gezackten Umrissen, lagen mit einem durchschnittlichen 1/C-Wert von 0,43 (+/- 0,01) bei den Kontrollexperimenten ohne RGDS-Einfluß vor. Mit steigender RGDS-Konzentration erhöhte sich auch der 1/C-Wert - entsprechend immer runderen Plättchen - und erreichte bei 600 µmol/l einen mittleren 1/C-Wert von 0,58 (+/- 0,01).

Abbildung 23

Abhängigkeit des Shape Index $1/C$ von der RGDS-Konzentration. Ohne Einwirkung von RGDS (Kontrollexperimente mit PRP ohne RGDS [0,0mmol/l]) liegen die Circularitätswerte relativ niedrig und steigen mit höheren RGDS Konzentrationen an. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten (\pm Standardabweichung) der Circularitätswerte bei den jeweiligen RGDS-Konzentrationen.

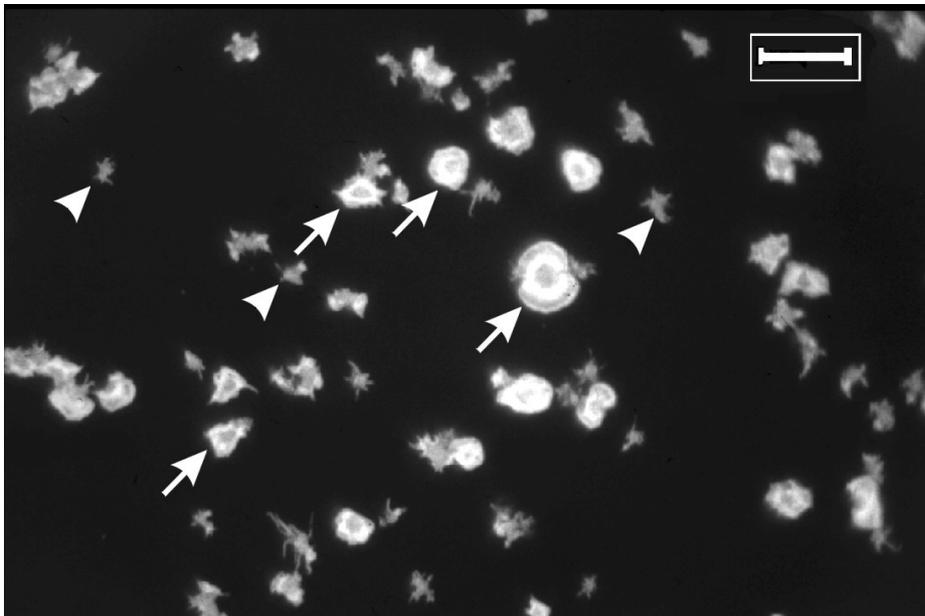


Abbildung 24

Interferenz-Reflexions-Kontrast-Mikrophotographie von Plättchen unter RGDS-Rezeptorinhibition (0,1 mmol/l). Im Vergleich zu Kontrollexperimenten (siehe Abschnitt 3.1, Abbildung 10, oben) haften zwar deutlich weniger Plättchen, diese sind allerdings zum großen Anteil „spread“ (Pfeile). Dendritische, „non-spread platelets“ kommen seltener vor (Pfeilspitzen). Der Balken entspricht 10 μ m.

3.5.2 Einfluß spezifischer Gp IIbIIIa-Rezeptorblockade durch das Peptidanalogen Ro 43-8857

Spezifische Gp IIbIIIa -Inhibition durch das Peptidanalogen Ro 43-8857 führte dazu, daß bei SPAA-Experimenten ab einer Ro 43-8857- Konzentration von 0,05 $\mu\text{mol/l}$ im PRP die Plättchenadhäsion im Vergleich zum Kontrollexperiment auf einen Anteil von 66 % reduziert war. Eine Steigerung der Konzentration verminderte die Plättchenadhäsion schrittweise immer weiter: bei 0,3 $\mu\text{mol/l}$ erreichte die Adhäsion nur noch 8 % der Werte des Kontrollversuchs.

Die Betrachtung des Zusammenhangs zwischen der Rezeptorblockade durch Ro 43-8857 und dem Shape Index (SI) zeigte ähnliche Ergebnisse wie bei der Inhibition durch RGDS. Die adhärierenden Plättchen wiesen unter Ro 43-8857-Einfluß im Mittel einen höheren 1/C-Wert auf als in den entsprechenden Kontrollexperimenten ohne Rezeptorblockade, waren also runder und mehr spread als die nicht blockierten Plättchen. In Abbildung 25 ist dieser Zusammenhang, der nur exemplarisch an Hand von vier Experimenten untersucht wurde, dargestellt.

Abbildung 25

Häufigkeitsverteilungen der 1/C-Werte in vier Experimenten unter Einfluß von Ro 43-8857 (Linien) im Vergleich zu Kontrollexperimenten ohne Rezeptorblockade (Balken). Deutliche Rechtsverschiebung der Circularität zu höheren Werten unter Ro 43-8857-Rezeptorinhibition.

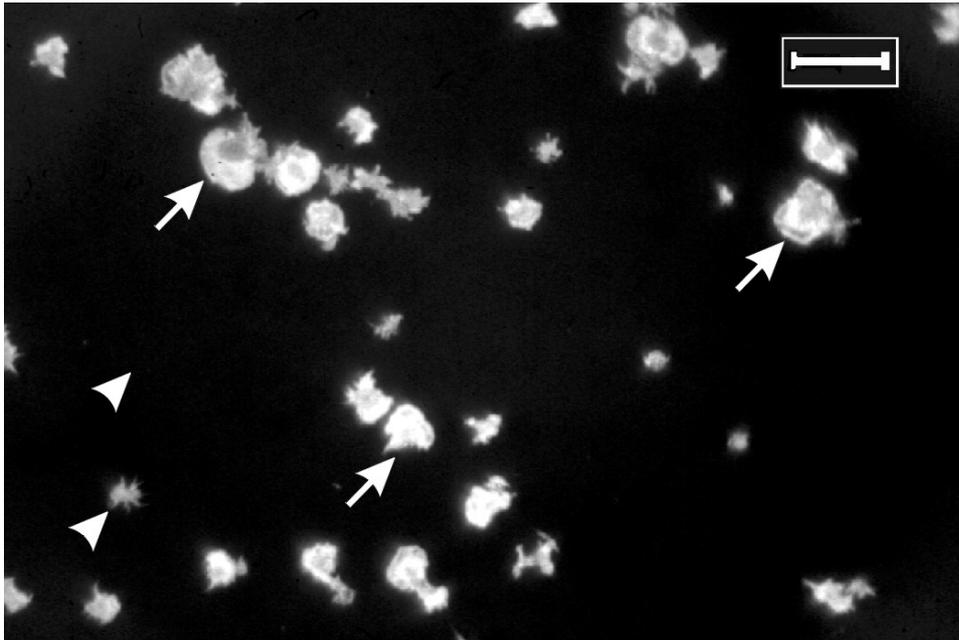


Abbildung 26

Interferenz-Reflexions-Kontrast-Mikrophotographie von Plättchen unter spezifischer GpIIb/IIIa Rezeptorinhibition durch Ro 43-8857 (0,1 µmol/l). Auch hier haften im Vergleich zu Kontrollexperimenten (siehe Abschnitt 3.1) deutlich weniger Plättchen, diese sind allerdings zum großen Anteil „spread“ (Pfeile). Dendritische, „non-spread platelets“ kommen seltener vor (Pfeilspitzen). Der Balken entspricht 10 µm.

3.5.3 Einfluß des chimären Antikörperfragments c7E3-Fab in vitro

Strömungsexperimente im SPAA mit PRP gesunder Kontrollpersonen ohne Zusatz des Antikörperfragments c7E3-Fab zeigten eine schnelle Zunahme adhärenter Plättchen in der frühen Strömungsphase (Abbildung 27), wobei durch Bildanalyse die pro Zeit- und Flächeneinheit anhaftenden Plättchen gezählt wurden (siehe 2.3.4). Nach 2,5 Minuten adhärten im Mittel 156 (+18) Plättchen im ausgewerteten Bildausschnitt (Plättchenkonzentration hierbei auf die gewählte Standardkonzentration von 250 000/µl umgerechnet, siehe 2.3.4), nach 7 Minuten im Durchschnitt 333 (+74) (siehe Tabelle 7).

Die Plättchen-Adhäsionskinetik unter Einflußnahme des Antikörperfragment c7E3-Fab (30-minütige Inkubation des PRP vor dem Strömungsexperiment, c7E3-Konzentration 5µg/ml (n=4) und 10µg/ml (n=3)) zeigte eine fast vollständige Aufhebung der Adhäsion. Nach zwei Minuten adhärten bei einer c7E3-Konzentration von 10µg/ml im Mittel 5 (+2) Plättchen im Meßfeld, die aber im weiteren Verlauf durch die Strömung wieder abgerissen wurden. Die

Reduktion der c7E3-Konzentration auf 5 µg/ml veränderte diesen Effekt nicht. Eine aussagekräftige morphometrische Analyse ließ sich auf Grund der geringen Anzahl der haftenden Thrombozyten nicht durchführen.

Abbildung 27

Adhäsionskinetik von Plättchen gesunder Kontrollpersonen unter Einfluss von c7E3-Fab (Punkte) im Vergleich zu nicht blockierten Plättchen (Dreiecke). Jeder Meßpunkt entspricht dem Mittelwert aller ausgewerteten Experimente mit jeweiliger Standardabweichung.

3.6 Plättchenfunktion bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI)

Bei 12 Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI, siehe Abschnitt 2.1.3), wurden im SPAA Plättchenadhäsionsmessungen durchgeführt. Eine Gruppe von 5 dieser Patienten war ohne Therapie mit c7E3-Fab (siehe Abschnitt 3.6.1) geblieben, eine zweite Gruppe von sieben Patienten hatte im Gegensatz dazu c7E3-Fab erhalten (siehe Abschnitt 3.6.2). Die Adhäsion als Parameter der Plättchenfunktion wurde im Strömungsexperiment quantifiziert (siehe Abschnitt 2.3.4), d.h. es wurde die Zahl der pro Flächen- und Zeiteinheit adhärierenden Plättchen ausgewertet.

3.6.1 Adhäsion im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen

AMI-Patienten

Zeit [sec]	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 3	Pat. 4	Pat. 5	Mittelwert	+/- SA
20	31,24				69,93	50,6	27,4
40	51,79	25,92	62,4		98,79	59,7	30,2
60	74,80	51,84	104		150,96	95,4	42,7
90	106,04	88,87	145,6		207,57	137	52,7
120	130,69	144,42	195,52		259,74	182,6	58,5
150	154,54	196,26	237,12	112,06	318,57	203,7	79,3
180	184,13	270,32	295,36	163,78	372,96	257,3	85,3
240	215,36		341,12	241,36	448,44	311,6	106,1
300	250,71		420,16	310,32	513,93	373,8	116,9
420	294,28		515,84	379,28	573,87	440,8	127,3

Tabelle 6

Zahl der adhärierenden Thrombozyten im Meßfeld bei 5 AMI-Patienten ohne c7E3-Therapie in Abhängigkeit von der Dauer des Strömungsexperiments. Die Werte sind jeweils auf eine Plättchenkonzentration von 250.000/µl umgerechnet (siehe Abschnitt 2.3.4, daher kommen in der Kommazahlen in der Tabelle vor).

Gesunde Kontrollen

Zeit [sec]	Kontr. 1	Kontr. 2	Kontr. 3	Kontr. 4	Kontr. 5	Mittelwert	+/- SA
20	29,04	19,36	45,12	22,72	25,42	28,3	10
40	55,44	36,96	67,68	52,54	51,66	52,9	11
60	78,54	56,32	90,24	74,55	73,8	74,7	12,2
90	107,58	81,84	120,32	105,08	102,5	103,5	13,9
120	132	106,48	157,92	128,51	127,92	130,6	18,3
150	152,46	132,88	184,24	153,36	157,44	156,1	18,4
180	174,24	157,52	233,12	178,21	180,4	184,7	28,5
240	208,56	195,36	289,52	222,23	218,94	226,9	36,5
300	241,56	228,8	345,92	258,44	268,96	268,7	45,8
420	296,34	281,6	462,48	312,4	311,6	332,9	73,5

Tabelle 7

Zahl der adhärierenden Thrombozyten im Meßfeld bei 5 gesunden Kontrollpersonen. Die Daten sind jeweils auf eine Plättchenkonzentration von 250.000/µl umgerechnet (siehe Abschnitt 2.3.4, daher kommen in der Kommazahlen in der Tabelle vor).

Aus den Tabellen 6 und 7 wird ersichtlich, daß bei den Patienten im Durchschnitt etwa 1,2 bis 1,8fach höhere Adhäsionswerte pro Flächeneinheit ($0,013 \text{ mm}^2$) resultierten. Nach 2,5 Strömungsminuten adhärten bei Patienten mit AMI im Durchschnitt 204 Plättchen (+/- 79) an der ausgewerteten Fläche, bei den Kontrollen waren es 156 Plättchen (+/- 18). Nach sieben Strömungsminuten betrug die Werte bei den Patienten 440 anhaftende Plättchen (+/- 127), bei den gesunden Spendern 333 Plättchen (+/- 74).

Diese Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollpersonen waren im student t-Test mit einem p-Wert von 0,22 statistisch nicht signifikant.

Abbildung 28

Adhäsionskinetik von Plättchen gesunder Kontrollpersonen im Vergleich zu Patienten mit akutem Myokardinfarkt (keine anti GpIIb/IIIa-Therapie). Jeder Meßpunkt entspricht dem Mittelwert aller ausgewerteten Experimente mit jeweiliger Standardabweichung.

3.6.2 Einfluss des therapeutischen Einsatzes von c7E3-Fab auf die Plättchenadhäsion

Um den Effekt einer therapeutischen Blockade durch das Antikörperfragment c7E3 auf die Plättchenfunktion zu analysieren, wurden ex vivo-Tests mit PRP von sieben Patienten mit Akutem Myokardinfarkt (AMI) durchgeführt, die mit c7E3-Fab (abciximab, ReoPro R) behandelt worden waren (siehe Abschnitt 2.2.3). Die Tabellen 7 und 8 zeigen die Adhäsionswerte dieser 7 Patienten 3 bzw. 30 Stunden nach Ende der c7E3 - Infusion.

AMI-Patienten 3 Stunden nach c7E3-Fab

Zeit [sec]	Pat. 6	Pat. 7	Pat. 8	Pat. 9	Pat. 10	Pat. 11	Pat. 12 *	Mittel- wert	+/- SA
20	2,16	1,04	19,84	7,65	13,68	4	0 *	6,9	7,4
40	5,04	2,08	35,96	19,38	20,52	4	0 *	12,4	13,3
60	7,2	7,28	44,64	29,58	27,36	7	0 *	17,6	16,4
90	11,52	17,68	57,04	51	34,2	9	0 *	25,8	22
120	20,16	23,92	70,68	70,38	44,46	12	0 *	34,5	28
150	26,64	33,28	86,8	90,27	51,3	15	0 *	43,3	34,7
180	34,56	42,64	101,68	111,18	61,56	17	0 *	52,7	41,6
240	38,88	64,48	122,76	139,23	71,82	21	0 *	65,5	51,2
300	48,96	80,08	147,56	162,18	88,92	27	0 *	79,2	60
420	58,32	111,28	184,76	205,53	102,6		0 *	110,4	76,9

Tabelle 8

Zahl der adhärierenden Thrombozyten im Meßfeld bei 7 AMI-Patienten 3 Stunden nach Ende der c7E3-Fab-Therapie in Abhängigkeit von der Dauer des Strömungsexperiments. Die Werte sind jeweils auf eine Plättchenkonzentration von 250.000/µl umgerechnet (siehe Abschnitt 2.3.4, daher kommen in der Kommazahlen in der Tabelle vor).

** Bei Patient 12 adhärerte 3 Stunden nach Ende der c7E3-Fab-Infusion während der gesamten Versuchsdauer kein Plättchen im Meßfeld.*

AMI-Patienten 30 Stunden nach c7E3

Zeit [sec]	Pat. 6	Pat. 7	Pat. 8	Pat. 9	Pat. 10	Pat. 11	Pat. 12	Mittel- wert	+/- SA
20	5,88	13,52		12,3	31,85			15,9	11,2
40	13,44	22,88	27,84	23,1	4,55		21,78	18,9	8,5
60	21	35,36	48,72	33,6	59,15	19,57	32,67	35,7	14,2
90	33,6	44,72	82,36	48,9	72,8	24,72	47,19	50,6	20,5
120	45,36	58,24	104,4	71,7	86,45	36,05	59,29	65,9	23,6
150	53,76	71,76	124,12	92,4	95,55	46,35	75,02	79,9	26,6
180	65,52	91,52	140,36	107,1	118,3	56,65	90,75	95,7	29,2
240	76,44	119,6	164,72	130,8	136,5	70,04	106,48	114,9	33,6
300	89,88	138,32	185,6	153,9	154,7	84,46	130,68	133,9	36,3
420	117,6	175,76	214,6	182,4	182			174,5	35,2

Tabelle 9

Zahl der adhärierenden Thrombozyten im Meßfeld bei 7 AMI-Patienten 30 Stunden nach Ende der c7E3-Fab-Therapie in Abhängigkeit von der Dauer des Strömungsexperiments. Die Werte sind jeweils auf eine Plättchenkonzentration von 250.000/µl (siehe Abschnitt 2.3.4, daher kommen in der Kommazahlen in der Tabelle vor).

Die Tabellen 8 und 9 zeigen, daß nach c7E3-Fab-Infusion die Adhäsionswerte während des gesamten Strömungsexperiments im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen und AMI - Patienten ohne c7E3-Fab stark vermindert waren. Die mit c7E3-Fab therapierten Patienten wiesen 3 Stunden nach Infusionsstop zum Strömungszeitpunkt $t=2,5$ min im Durchschnitt 43 adhärierende Plättchen (± 34) auf, dies entsprach 26 % der Adhäsion von gesunden Spendern ($p<0.001$) bzw. 21 % der Adhäsion von c7E3-Fab- freien AMI-Patienten ($p<0.001$). 30 Stunden nach c7E3-Fab-Infusionsende war im Mittel ein 1,8facher Wiederanstieg der Plättchenadhäsion im Vergleich zu den Messungen 3 Stunden nach Infusionsende festzustellen ($p<0.05$). Mit gemittelten 80 (± 26) Plättchen lag die Adhäsion aber immer noch deutlich unter der von gesunden Spendern (Anteil von 40 %) ($p<0.001$) oder c7E3-Fab - freien Patienten ($p<0.01$) (Anteil von 48 %). In Abbildung 29 sind die oben aufgeführten Unterschiede graphisch veranschaulicht.

Abbildung 29

Vergleich der Plättchenadhäsion bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt mit und ohne c7E3-Fab Therapie und bei gesunden Kontrollpersonen. Die dargestellten Werte entsprechen dem Durchschnitt der Zahl adhärenter Plättchen 2,5 Minuten nach Strömungsbeginn, die Balken geben die jeweilige Standardabweichung an.

Abbildung 30 zeigt exemplarisch die Adhäsionskinetik eines AMI - Patienten vor Therapie mit c7E3-Fab, 3 Stunden und 30 nach c7E3-Fab - Infusionsende. Der Anteil haftender Plättchen 3 Stunden nach c7E3-Fab war bei diesem Patienten im Vergleich zu den prätherapeuti-

schen Werten auf ein Drittel herabgesetzt. 30 Stunden nach c7E3-Fab waren die Werte wieder geringgradig angestiegen. Der jeweils parallele Verlauf der Kurven ließ erkennen, daß die Ablagerungskinetik bei den Experimenten durch c7E3-Fab nicht grundsätzlich beeinflußt war.

Abbildung 30

Repräsentative Adhäsionskinetik von Plättchen eines Patienten mit akutem Myokardinfarkt vor (Punkte), 3 Stunden nach (Kreise) und 30 Stunden nach (Dreiecke) c7E3-Fab Therapie. Deutlich zu erkennen ist eine Adhäsionsreduktion 3 Stunden nach Infusionsstop von c7E3-Fab auf weniger als ein Drittel im Vergleich zu den Werten vor Therapie, die nach 30 Stunden wieder leicht angestiegen ist.

3.7 Das SPAA als Screeningmethode bei Patienten mit Blutungsneigung und Verdacht auf von Willebrand'sche Erkrankung

Tabelle 10 gibt die Kinetik der haftenden Plättchen im SPAA-Strömungsversuch bei den 9 Patienten mit klinischer Blutungsneigung und Verdacht auf eine von Willebrand'sche Erkrankung (vWD) wieder.

Blutungspatienten

Zeit [sec]	Pat. 1	Pat. 2	Pat. 3	Pat. 4	Pat. 5	Pat. 6	Pat. 7	Pat. 8	Pat. 9	Mittelwert	+/- SA
20	37,43	4,1			38,74	28,89			16,67	25,16	13,15
40	62,87	10,93	54,34		54,59	42,7	25,09	26,38	31,41	38,54	16,8
60	86,83	16,39	76,08	39,16	93,33	58,4	40,66	41,45	46,79	55,45	23,89
90	119,76	27,32	104,73	55,65	121,51	74,73	61,42	59,66	68,59	77,04	30,04
120	145,21	36,88	120,54	72,82	151,45	94,2	80,45	81,01	92,3	97,21	34,32
150	167,66	43,71	142,27	87,94	197,23	113,67	100,34	97,34	108,33	117,61	42,95
180	203,59	49,18	173,89	100,3	232,45	140,67	121,97	116,18	125,64	140,43	52,35
240	233,53	66,93	215,38	121,6	297,61	168,93	145,32	142,56	149,99	171,32	64,2
300	269,46	77,86	256,88	140,84	336,35	205,36	163,49	170,82		202,63	76,83
420	335,33	101,08	291,46	171,06	390,94	253,71				257,26	97,44

Tabelle 10

Zahl der adhärierenden Thrombozyten im Meßfeld bei 9 Patienten mit Verdacht auf vWD in Abhängigkeit von der Zeit des Strömungsexperiments. Die Werte sind jeweils auf eine Plättchenkonzentration von 250.000/ μ l umgerechnet (siehe Abschnitt 2.3.4, daher kommen in der Kommazahlen in der Tabelle vor).

Wie aus Tabelle 10 ersichtlich wies die Plättchenadhäsion zum Zeitpunkt $t=2,5$ min mit durchschnittlich 119 Plättchen (+/- 43) einen Anteil von 76,3% der Adhäsion bei gesunden Spendern auf. Auch nach 7 Strömungsminuten war dieser Unterschied mit einem Adhäsionsanteil von 77% bei gesunden Kontrollpersonen nachweisbar. Diese Unterschied zeigten im Student t-Test allerdings keine statistische Signifikanz.

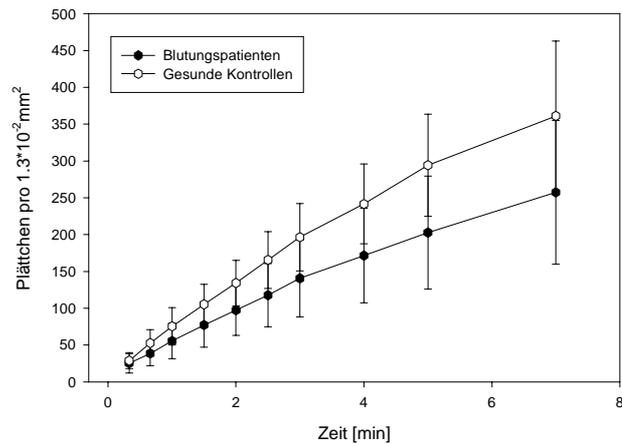


Abbildung 31

Adhäsionskinetik bei Blutungspatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Jeder Meßpunkt entspricht dem Mittelwert aller ausgewerteten Experimente mit jeweiliger Standardabweichung.

Im folgenden wurde die im SPAA ermittelte Adhäsion mit den Plasmaspiegeln von Faktor VIII und Faktor VIII-Antigen (vWf) und außerdem dem Wert der Ristocetin-induzierten Aggregation dieser Blutungspatienten verglichen.

Blutungspatienten

Patient	Plättchen pro $1.3 \cdot 10^{-2} \text{ mm}^2$	FVIII [%]	FVIIIAg [%]	Rist.-ind. Aggregation [%]	vWD
1	167,66	84	62	93	(+)
2	43,71	100	105	80	-
3	142,27	40	65	45	(+)
4	87,94	100	130	62	-
5	197,23	100		88	-
6	113,67	85	63	58	(+)
7	100,3	92	68	80	(+)
8	97,34	100	130	73	-
9	108,34	3	1	18	+

Tabelle 11

Zusammenhang der Zahl der bei $t=2.5$ min adhärierenden Plättchen pro ausgewerteter Flächeneinheit mit den Parametern Faktor VIII, Faktor VIII Antigen (vWf) und Ristocetin induzierter Aggregation. Das Vorliegen einer manifesten von Willebrand'schen Erkrankung (vWD) in Abhängigkeit vom vWf-Wert wird in der letzten Spalte angegeben. +: schwere vWD, (+): fragliches Vorliegen einer vWD, -: Ausschluß einer vWD

Wie in Tabelle 11 zu sehen ist, ist die ausgewertete Patientengruppe sehr heterogen. Alle Patienten waren durch manifeste Blutungssymptome aufgefallen und es wurde daher eine vWD vermutet. Die Bestimmung der Plasmaparameter zeigte aber, daß nur in einem Fall (Pat. 9) eine schwere vWD vorlag. Bei vier weiteren Patienten war bei etwas erniedrigten FVIII-Antigen-Werten eine leichte vWD anzunehmen, bei den restlichen Patienten wurde die vWD als Ursache der Blutungssymptomatik ausgeschlossen.

Wie Tabelle 11 und Abbildung 32 zeigen, konnte keine Korrelation der im SPAA gemessenen Adhäsionswerte mit diesen drei Parametern ermittelt werden. Patient 9, bei dem bei einem vWf-Werte von 1% und F.VIII-Werten von 3% eine schwerste vWD nachgewiesen worden war, hatte mit über 100 haftenden Plättchen pro Flächeneinheit mehr Adhäsion als Patienten, bei denen laborchemisch die vWD ausgeschlossen worden war. Patient 2 hatte mit 44 haftenden Plättchen den geringsten Adhäsionswert, wies allerdings völlig normale Faktor VIII und vWf-Werte auf und kam damit für eine vWD nicht in Betracht.

Abbildung 32

Korrelation der Zahl der bei $t=2.5$ min im Meßfeld adhätierenden Plättchen von Gerinnungsfaktor VIII, Faktor VIII-Antigen (vWf) und Ristocetin-ind. Aggregation. Es ist keine Abhängigkeit dieser Parameter von der im SPAA ermittelten Plättchenadhäsion zu erkennen.

4 Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Thrombozytenfunktion und ihre physiologische und pathophysiologische Rolle im Hämostasesystem verwendeten mit dem Staupunkt-Adhäsio-Aggregometer (SPAA) ein System, das die multifaktorielle Genese der Thrombose, angelehnt an die Virchow'sche Trias, berücksichtigt^{49,59}. Dabei wurden die Komponenten Strömung (symmetrische Staupunktströmung mit konvektivem Antransport von Thrombozyten) und Gefäßwand (thrombogene Fremdoberfläche Glas) in der vorliegenden Arbeit konstant gehalten, so daß die unterschiedliche Anhaftung von Thrombozyten (Adhäsion) Veränderungen der dritten Komponente, also des Blutes, reflektierte.

Strömungsexperimente im SPAA hatten gezeigt, daß die Adhäsivität von Thrombozyten bei Patienten mit arterieller Verschußkrankheit (AVK) im Vergleich zu gesunden Personen signifikant erhöht ist^{46,47}. Aufbauend auf diesen Befund sollte in der vorliegenden Arbeit unter anderem geklärt werden, ob dieser Unterschied nur durch funktionelle Untersuchungen wie die Quantifizierung der Plättchenadhäsionskinetik unter Strömung faßbar ist, oder ob ein morphologisches Korrelat besteht. Als Parameter zur Quantifizierung dieser „Plättchenadhäsions-Morphologie“ wurde ein Form Index (Shape Index SI) – die inverse Circularität $1/C$ – verwendet (siehe MatMeth)⁴¹. Wie in Abschnitt 2.4.5 erläutert erlaubt $1/C$ als morphologischer Parameter die Erfassung des Ausbreitens („spreading“) einzelner adhärenter Plättchen.

Unsere Experimente zeigten, daß die Thrombozyten der AVK-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen signifikant gesteigerte Shape Index (SI)-Werte, also mehr „spreading“ als die Thrombozyten der gesunden Spender, aufweisen.

Zudem fand sich eine signifikante Korrelation des Shape Index mit der Adhäsivität, gemessen als Zahl der pro Zeit- und Flächeneinheit haftenden Plättchen. Thrombozyten bei Versuchspersonen, bei denen im Strömungsversuch hohe Adhäsivitätswerte gemessen worden waren, wiesen vergleichsweise auch einen dementsprechend höheren Shape Index (SI)-Wert auf, waren also mehr ausgebreitet („spread“) als die Plättchen, bei denen vergleichsweise niedrige Adhäsionswerte ermittelt worden waren.

Angesichts dieser Befunde sind grundsätzlich zwei Interpretationen möglich: zum einen ist denkbar, daß die hohe Haftungsneigung der Thrombozyten bei den AVK-Patienten zu einer ausreichend langen Verweilzeit der Plättchen auf der beströmten Fläche führt, was die Voraussetzung für den Prozeß des „spreading“ sein könnte. Bei den gesunden Kontrollpersonen

hingegen würden durch die geringere Adhäsivität die Plättchen durch die Strömungskräfte in einer frühen Phase des „spreading“-Prozesses wieder von der Oberfläche abgerissen.

Andererseits läßt sich auch das gesteigerte „spreading“ der Thrombozyten der Patienten als Ursache für eine erhöhte Adhäsivität deuten. Im Verlauf des „spreading“-Prozesses verkleinert sich der senkrecht zur Oberfläche bestehende Durchmesser der Plättchen. Sie werden schrittweise immer flacher, bis sie im Endzustand vollständig ausgebreitet („spread“) anhaften (siehe Abbildung 8 und 5, Abschnitt 2.4.2). Diese morphologische Veränderung hat zwei Folgen: erstens vergrößert sich im Zuge des „spreading“ schrittweise die Haftfläche der Plättchen mit der Oberfläche, was per se schon eine gesteigerte Haftfestigkeit erklärt. Zum anderen bewirkt das „spreading“, daß sich die Angriffsfläche der Plättchen für die Strömungskräfte sukzessive verkleinert, was auch ein Abreißen von der Oberfläche erschwert. Die Adhäsivität errechnet sich aus der pro Zeit- und Flächeneinheit an einer Oberfläche haftenden Thrombozyten minus dem Anteil der Plättchen, der in der gleichen Zeiteinheit wieder abgerissen wird (siehe auch Abschnitt 2.3.4). Das gesteigerte „spreading“ würde also durch Herabsetzung des Anteils der abgerissenen Plättchen die erhöhte Zahl haftend bleibenden Plättchen erklären. In Abbildung 33 ist schematisch dargestellt, wie die Veränderung der Plättchenmorphologie die Angriffsfläche der Strömung verkleinert.

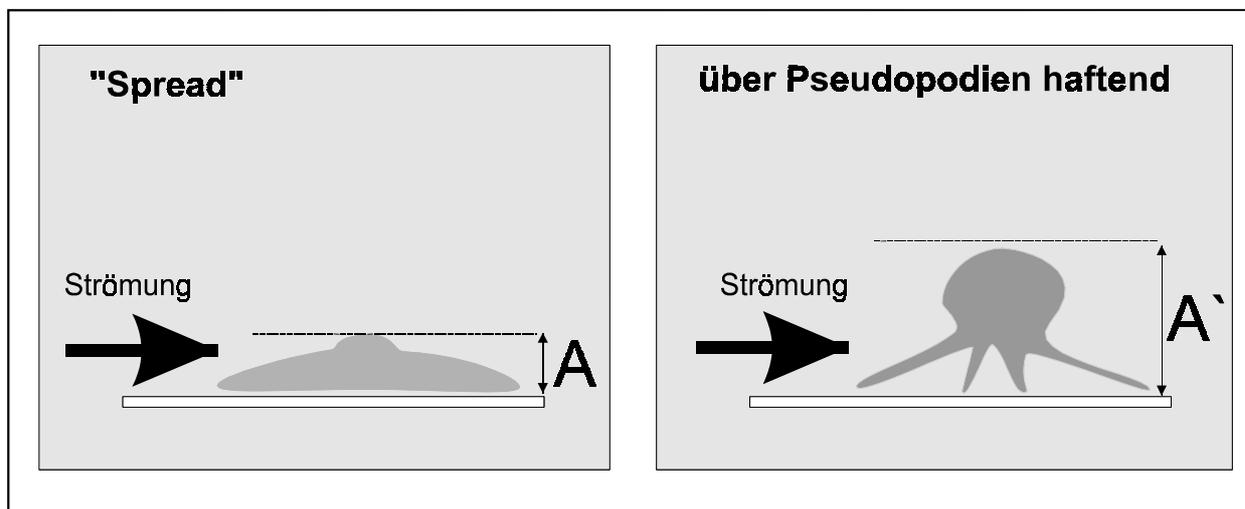


Abbildung 33

Schematische Zeichnung zweier haftender Plättchen in der Seitansicht.. „Spread platelets“ (links) bieten der Strömung eine wesentlich geringere Angriffsfläche (A) als über Pseudopodien haftende Plättchen (rechts, A').

Es läßt sich somit sowohl die veränderte Morphologie der haftenden Plättchen als primäre Ursache der erhöhten Adhäsivität interpretieren als auch umgekehrt die gesteigerte Haftungs-

neigung als Basis für das gesteigerte „spreading“. Möglicherweise sind beide aufgezeigten Mechanismen relevant.

Erstere Deutung wird gestützt durch Befunde von Jen et al., die zeigten, dass die Haftungsfestigkeit der Thrombozyten an Fibrinogen-beschichteten Oberflächen signifikant von ihrer Morphologie abhängt, genauer von ihrem Ausbreitungsgrad („spreading“): mehr als 90 % der Plättchen, die ausgebreitet waren, konnten Abreißkräften einer Schubspannung bis zu 50 dyn/cm² widerstehen, während ein großer Teil der nicht „spread platelets“, die eine dendritische Form mit Pseudopodien hatten, schon bei Schubspannungen von weniger als 10 dyn/cm² durch die Strömung von der Oberfläche abgerissen wurden²⁸.

In einer anderen Analyse untersuchten Wu et al. die Haftungsfestigkeit von Plättchen an Fibrinogen-beschichteten Oberflächen in Abhängigkeit von der Zeit, die zwischen dem initialen Anhaften der Plättchen und dem Beginn einer „Abreißströmung“ lagen. Sie fanden, daß bei Plättchen mit langer Anhaftungszeit die Adhäsionsfestigkeit signifikant grösser war als bei solchen, die vor Beginn der Abreißströmung nur kurze Zeit an der Oberfläche adhärirten.⁶⁸ Dieser Befund unterstützt oben genannte These, daß bei ausreichend langer Verweilzeit von Plättchen auf Oberflächen ihr Abreißen erschwert wird. Wu et al. fanden zudem ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Anhaftungsfestigkeit und der Morphologie der Plättchen.

Zusammenfassend läßt sich nach unserer Ansicht der Shape Index (SI) Circularität durch seine enge Korrelation mit der Adhäsivität als brauchbarer morphologischer Parameter für die Adhäsionsfunktion der Plättchen interpretieren.

Zahlreiche Publikationen belegen den Zusammenhang zwischen der Atherosklerose und bestimmten Risikofaktoren^{7,9,30,42,62}. So wird in zwei neueren Untersuchungen^{18,36} von einer signifikanten Korrelation zwischen dem Ausmaß atherosklerotischer Gefäßveränderungen und den Plasmaspiegeln von LDL-Cholesterin, Fibrinogen, Triglyzeriden und - negativ korreliert - von HDL-Cholesterin berichtet, wobei die Untersuchung an drei verschiedenen Gefäßregionen (Karotiden, Bauchorta, Femoralarterie) durchgeführt wurde. Analog zu diesen Befunden wiesen auch die AVK-Patienten in der vorliegenden Studie im Vergleich zu gesunden Spen-

dem signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen von Fibrinogen, Cholesterin, LDL und Triglyzeriden auf, während die HDL Spiegel signifikant niedriger waren.

Andere Analysen stellen einen direkten Zusammenhang zwischen diesen Risikofaktoren und der Plättchenfunktion her. Mehrere Studien berichteten von einem Zusammenhang zwischen Cholesterin und der Plättchenreaktivität^{10,17,57,70}, wobei in vitro hohe LDL-Spiegel die Reaktivität der Thrombozyten, ausgedrückt durch gesteigerte Thromboxanproduktion, erhöhten. Zudem wurde beschrieben, daß ein direkter Zusammenhang zwischen Hypercholesterinämie und Bildung eines Plättchenthrombus in stenotischen Gefäßbezirken bestehe³⁴. Eine weitere Studie belegte, daß Plättchenadhäsion bei Diabetikern mit hohem Thromboserisiko signifikant von den Plasmaspiegeln der Triglyzeride (positive Korrelation) und HDL (negative Korrelation) abhing³¹. Ein direkter Zusammenhang zwischen oxidiertem LDL und der Plättchenadhäsion bzw. Aggregation wird in anderen Arbeiten beschrieben^{27,69}, wobei Zhao zudem eine Verminderung der Plättchereaktivität durch hohe HDL-Werte beschreibt.

Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich auf zwei Aspekte der Plättchenfunktion, die Adhäsion und den morphologischen Parameter Circularität als Shape Index (SI), der das „spreading“ quantifizierte. Zwischen „spreading“ und den genannten Risikofaktoren fanden sich allerdings nur für das HDL, dessen Plasmaspiegel mit dem Shape Index (SI) negativ korrelierte, signifikante Zusammenhänge: hohe HDL-Spiegel waren mit geringem „spreading“, niedrige Spiegel mit entsprechend ausgeprägterem „spreading“ assoziiert. Umgekehrt positiv zu korrelieren, allerdings statistisch nicht signifikant, waren Zusammenhänge des Shape Index mit den anderen genannten Risikofaktoren: entsprechend hohe Plasmaspiegel gingen mit gesteigertem „spreading“, niedrige mit geringem „spreading“ einher. Darüber hinaus ließen sich bei überhöhten Plasmaspiegeln zweier dieser Risikofaktoren gleichzeitig synergetische Effekte auf die Plättchenreaktivität nachweisen. Die Kombination hoher Fibrinogen-, Triglyzerid- und LDL-Werte und gleichzeitig niedriger HDL-Konzentrationen führte bei den Versuchspersonen zu einer signifikant gesteigerten Plättchenreaktivität, ausgedrückt durch erhöhtes „spreading“.

Badimon et al. wiesen am Tiermodell durch Diät-induzierte Hypercholesterinämie eine vermehrte Plättchenadhäsion nach, wobei die Plasmamembran der Plättchen bedingt durch Veränderung der Lipidzusammensetzung eine signifikant gesteigerte Fluidität aufwies⁵. Dies könnte ein Ansatzpunkt sein, um den in der vorliegenden Arbeit aufgefallenen Zusammenhang zwischen Plasmarisikofaktoren wie Cholesterin und Plättchenadhäsivität und „spreading“ zu erklären.

Zahlreiche Studien belegen die entscheidende Rolle des Plättchenmembranrezeptors Gp IIb/IIIa für Adhäsion und „spreading“. Ein als „Vroman Effekt“ beschriebener Befund besagt, daß bei Kontakt einer Glasfläche mit Blutplasma eine rapide Adsorption von Plasmaproteinen an die Glasfläche stattfindet⁶⁷. Insbesondere das Fibrinogen, das als Ligand des Plättchenrezeptors Gp IIb/IIIa bekannt ist, wird auf der Oberfläche immobilisiert²⁵. Vor allem bei niedrigen Scherraten, wie sie im SPAA herrschen (Maximum 170 s⁻¹), wird Adhäsion und „spreading“ über GpIIb/IIIa an Oberflächen-immobilisiertes Fibrinogen vermittelt^{50,52}. In Strömungsexperimenten im SPAA mit Plättchen einer Patientin mit Afibrinogenämie fand keinerlei Adhäsion an Glas statt. Nach Fibrinogensubstitution war diese wieder vorhanden und auch „spreading“ wieder nachweisbar⁴⁴. Diese Befunde der Thrombenentstehung auf immobilisiertem Fibrinogen sind insofern von hoher Relevanz, als Fibrinogen und Fibrin in hoher Konzentration in atherosklerotischen Plaques vorhanden sind^{56,58}.

Die entscheidende Beteiligung von Gp IIb/IIIa an Plättchenadhäsion und „spreading“ steht somit außer Frage, was es zwangsläufig zum Ansatzpunkt zahlreicher antithrombozytärer Strategien macht. Das Tetrapeptid RGDS inhibiert kompetitiv durch Imitation der RGD-Sequenz des Fibrinogens die Bindung dessen an Gp IIb/IIIa, was im SPAA zu einer drastischen dosisabhängigen Reduktion der Adhäsion führte, die in unseren Experimenten ab einer Konzentration von 400µmol/l einen Sättigungswert von 37 % der Kontrollexperimente erreichte. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei Inhibition durch den nicht-peptidischen hochspezifischen GpIIb/IIIa-Blocker Ro 43-8857 und das Antikörperfragment c7E3-Fab. Unter Einsatz von Ro 43-8857 ließ sich die Adhäsion bis auf ca 8% der Kontrollexperimente reduzieren, das gegen GpIIb/IIIa gerichtete Antikörperfragment c7E3-Fab blockierte gar bis auf 3%.

Die morphometrische Auswertung noch haftender Plättchen unter Rezeptorblockade zeigte einen zunächst unerwarteten Befund: die Circularität, die als morphologischer Funktionsparameter das „spreading“ charakterisiert, nahm unter Rezeptorinhibition zu. Das heißt, die Rezeptorblockade reduzierte zwar die Zahl der haftenden Plättchen, nicht aber den morphologischen Parameter der Plättchenfunktion, das „spreading“, welches im Gegenteil sogar zunahm. Ähnliches erbrachte die Rezeptorinhibition mit Ro 43-8857. Die wenigen verbleibenden haftenden Thrombozyten waren hier wie bei den Versuchen mit RGDS im Vergleich zu den Kontrollplättchen mehr ausgebreitet.

Diese scheinbar paradoxe Wirkung der Gp IIb/IIIa-Blockade scheint zunächst im Widerspruch zu Befunden zu stehen, die einen ursächlichen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein

von Gp IIbIIIa und der Fähigkeit der Plättchen zum „spreading“ aufzeigen⁶⁶. Zudem existieren konkrete Befunde, die bei Strömungsversuchen unter Gp IIbIIIa-Blockade von einer gleichsinnigen Verminderung von Adhäsion und „spreading“ berichten^{3,35}.

Im Gegensatz dazu existiert eine Analyse, die eine Gp IIbIIIa-Blockade durch den monoklonalen Antikörper PMA5 durchführte und fand, daß die Plättchenadhäsion an immobilisiertem Fibrinogen zwar signifikant reduziert war, die verbleibenden haftenden Plättchen aber zu fast 50% „spread“ waren³⁹.

„Spreading“ bedeutet „Sich-Ausbreiten“ der Plättchen auf einer Oberfläche. Die Kontaktfläche der der Oberfläche zugewandten (ventralen) Plättchenmembran wird dabei schrittweise vergrößert, was die Zahl der Bindungen zwischen Membranrezeptoren und Oberflächen gebundenen Liganden (Fibrinogen) erhöht (siehe Abbildung 34, unten). Dies könnte bedeuten, daß bei Plättchen, die schon sehr schnell nach Strömungsbeginn zu „spread platelets“ werden, eine relativ große Anzahl von Rezeptoren bereits von Oberflächen-immobilisiertem Fibrinogen besetzt sind, was bedeutet, daß nur wenige Rezeptoren noch von Blocker belegt werden können. Die über fokale Kontaktstellen haftenden Plättchen adhärieren dagegen nur über wenige Rezeptoren an der Oberfläche, was bei einer konstanten Anzahl von Gp IIbIIIa (ca 45.000⁴⁰ bzw. 80.000²⁹) den Anteil der vom Inhibitor besetzbaren Rezeptoren erhöht (siehe Abbildung 34, unten). Eine mögliche Folgerung daraus ist, daß bei letzterer Plättchenpopulation durch die vermehrte Inhibitorbelegung der Rezeptoren der „spreading“-Prozeß früh gestoppt würde und sie als dendritische Plättchen durch die Strömung fortgespült würden. Eine kleine Plättchenpopulation, die auf Grund ihrer intrinsischen Hyperreaktivität sehr schnell spreitet, würde dagegen durch den im Plasma zirkulierenden Blocker kaum mehr angegriffen und bliebe an der Oberfläche haften. Diese früh-spreitende Population müßte nach dieser These allerdings auch bei den Kontrollexperimenten ohne Rezeptorinhibition vorhanden sein. Dort würden allerdings die dendritischen Plättchen (mit niedriger Circularität) zusätzlich haften bleiben, was die Verschiebung zu den niedrigeren mittleren Circularitätswerten erklären würde. Eben diese Folgerung scheint durch die Tatsache untermauert, daß die absolute Anzahl der massiv ausgebreiteten Plättchen pro Flächeneinheit bei den Kontrollexperimenten ohne Rezeptorblockade ähnlich groß war wie unter Einfluß des Inhibitors. Dendritische, über Pseudopodien haftende Thrombozyten, kamen dagegen in nennenswerter Anzahl nur in den Kontrollexperimenten vor (siehe Abbildungen 10 oben, 24 und 26, Abschnitt 3.1, 3.5.1 und 3.5.2).

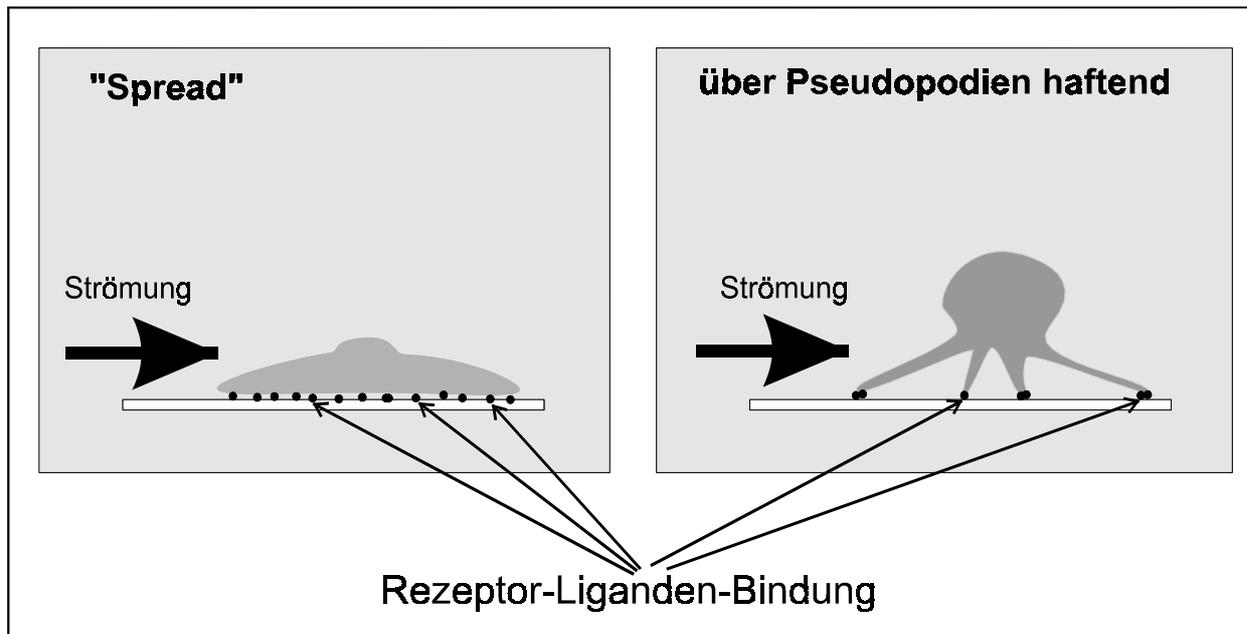


Abbildung 34

Schematische Zeichnung zweier haftender Plättchen in der Seitansicht. „Spread platelets“ (links) haften über eine verhältnismäßig große Anzahl von Rezeptor-Liganden-Bindungen, während bei dendritischen, über Pseudopodien haftenden Plättchen (rechts), bedingt durch die kleinen Kontaktstellen der Pseudopodien mit der Oberfläche - weniger Bindungen möglich sind.

Die nahezu vollständige Aufhebung der Plättchenadhäsion unter c7E3-Fab Rezeptorblockade scheint angesichts der Gp IIb/IIIa-vermittelten Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen^{25,52} nicht überraschend, sie steht allerdings im Widerspruch zu einigen Studien, die dem c7E3-Fab zwar einen Blockierungseffekt auf die Aggregation, nicht aber die Adhäsion, zuschreiben^{15,61}. Die Diskrepanz dieser Befunde könnte einerseits durch die Verwendung anderer beströmter Oberflächen (Kollagen I und von Willebrand Faktor) erklärbar sein, wobei dann auch die Beteiligung zusätzlicher Membranrezeptoren wie Gp Ia/IIa und Gp Ib denkbar wäre. Dem gegenüber steht die Tatsache, daß bei niedrigen Scherraten, wie sie im SPAA herrschen, eine über GpIIb/IIIa und von Willebrand Faktor (vWf) vermittelte Plättchenadhäsion außer der über Fibrinogen nachgewiesen ist^{25,52}.

Ebenso wie bei den in vitro-Versuchen ließ sich auch bei therapeutischer Gabe mit c7E3-Fab bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt nach Angioplastie ex vivo eine signifikante Verminderung der Plättchenadhäsion 3 Stunden nach Infusionsende nachweisen, die etwa 20% der Adhäsion der Patienten betrug, die nicht mit c7E3-Fab, sondern konventionell mit Ticlo-

pidin behandelt wurden. Die als Nebenbefund aufgefallene erhöhte Adhäsivität dieser Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen steht in Übereinstimmung mit anderen Befunden, die bei 15 Patienten mit akutem Infarkt 24 bis 48 Stunden nach PTCA ebenfalls eine gesteigerte Plättchenfunktion zeigten²².

Die geringere Ausprägung der Adhäsionsminderung unter c7E3-Fab bei diesen ex vivo-Versuchen im Vergleich zur fast totalen Blockade bei in vitro-Einsatz erscheint zunächst unerwartet angesichts der Tatsache, daß bei therapeutischer Dosierung von c7E3-Fab mit ca. 6µg/ml eine erheblich höhere Plasmakonzentration erreicht wird, wie sie bei in-vitro Versuchen für die völlige Aufhebung der Plättchenaggregation erforderlich war²⁹. Außerdem ist bekannt, daß bereits eine Konzentration von 3µg/ml ausreicht, um eine 89%ige Blockade von GpIIb/IIIa an den Plättchen herbeizuführen, was ein fast völliges Außerkraftsetzen der GpIIb/IIIa-vermittelten Plättchenfunktion zur Folge hat¹⁶. Andererseits ist bekannt, daß 3 Stunden nach Infusionsstopp von c7E3-Fab durch die immens kurze Halbwertszeit (<10 min) kaum noch im Plasma zirkulierendes freies c7E3-Fab vorkommt^{29,32}. Das heißt, daß 3 Stunden nach Infusionsstopp neu synthetisierte Plättchen (ca 2000/µl/h) durch ungebundenen Antikörper nicht mehr in relevantem Ausmaß angegriffen werden können. Zudem wird von einer Reversibilität der c7E3-Fab-Bindung an die Plättchen berichtet^{29,32}. Dies ist ein Erklärungsansatz dafür, daß auch 2 Tage nach Infusionsstopp noch ein signifikanter Reduktionseffekt auf die Aggregation nachweisbar war, der im Vergleich zu den unmittelbar nach c7E3-Fab-Infusionsstopp gemessenen Werten allerdings deutlich geringer war³². Das steht in Übereinstimmung zu den Befunden der vorliegenden Arbeit, bei denen 30 Stunden nach Infusionsstopp die Adhäsion wieder angestiegen war, allerdings mit 40% immer noch signifikant niedriger als die Adhäsion der nicht mit c7E3-Fab behandelten Patienten lag.

Diese Befunde zeigen, daß die Therapie mit c7E3-Fab erheblich wirksamer zu sein scheint als eine konventionelle antithrombozytäre Therapie mit Ticlopidin (siehe Abschnitt 2.1.2), unter dessen Einwirkung in der vorliegenden Arbeit keine Adhäsionsminderung aufgefallen war. Dies scheint zunächst überraschend, da eine Reduktion der Plättchenadhäsion durch Ticlopidin sehr wohl nachgewiesen ist^{26,54}, wird aber dadurch verständlich, daß durch die kurze Einwirkzeit des Ticlopidin auf die Plättchen der getesteten Patienten (1-2 Tage) die volle therapeutische Wirksamkeit wohl noch nicht erreicht war (volle Wirksamkeit erst nach 3-5 Tagen⁵⁴).

Zusammenfassend scheint sich angesichts dieser Befunde und der in-vivo-Relevanz der GpIIb/IIIa-Interaktion mit immobilisiertem Fibrinogen⁵⁶ ein zusätzlicher Aspekt der therapeuti-

schen Wirksamkeit von c7E3-Fab zu zeigen. Darüber hinaus zeigen die vorliegenden Befunde die Plättchenadhäsion an Oberflächen-gebundenem Fibrinogen als zusätzlichen sinnvollen Parameter zur Beurteilung des Effekts einer Membranrezeptorblockade .

Die Befunde der vorliegenden Arbeit zeigen, daß GpIIbIIIa der entscheidende Rezeptor für die Plättchenadhäsion an Fibrinogen in einer Staupunktströmung ist. Ein anderer Mechanismus, der in unserem Versuchsansatz zumindest theoretisch von Bedeutung ist und GpIb als Adhäsions-vermittelnden Rezeptor und von Willebrand Faktor (vWf) als dessen Ligand beinhaltet, bleibt bei diesem Modell allerdings unberücksichtigt. Dabei ist die physiologische Relevanz des vWf angesichts der möglichen erheblichen klinischen Blutungssymptomatik bei einem Defekt in dieser Interaktion - sei es durch Fehlfunktionen des Membranrezeptors GpIb (Bernard Soulier Syndrom) oder des Liganden vWf (von Willebrand'sche Erkrankung, vWD) - evident.

Vor diesem Hintergrund sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Experimente zur Plättchenadhäsionskinetik bei durch Blutung auffällig gewordenen Patienten, bei denen aus diesem Grund das Vorliegen einer vWD vermutet wurde, der Relevanz einer vWf-vermittelten Adhäsion im SPAA nachgehen. Die Auswertung der Messungen zeigte, daß die Plättchenadhäsion dieser Patienten zwar vermindert war (im Mittel 76% der Werte der gesunden Kontrollpersonen), dieser Unterschied allerdings nicht statistisch signifikant war. Darüber hinaus konnte kein Zusammenhang der Adhäsionswerte mit der Plasmakonzentration des vWf dieser Patienten gezeigt werden. Die Zahl der adhärennten Plättchen streute zwar erheblich (zum Zeitpunkt $t=2.5$ min von 43 bis 167 haftenden Plättchen pro Flächeneinheit), allerdings wurde die niedrigste Zahl bei einem Patienten gemessen, bei dem mit normalen Faktor VIII- und vWf-Werten die vWD ausgeschlossen war. Auf der anderen Seite wies der einzige Patient der Meßreihe, bei dem tatsächlich eine schwere vWD vorlag (Faktor VIII 3%, vWf 1%), mit etwas über 100 haftenden Plättchen einen Wert in einer Größenordnung auf, die nur etwas unter der von gesunden Kontrollpersonen lag.

In der Tat ist dies zunächst überraschend, da zahlreiche Publikationen von der entscheidenden Bedeutung des vWf bei der Adhäsion berichten, die sowohl durch Interaktion des vWf mit GpIb als auch mit Gp IIbIIIa bewerkstelligt werden kann.^{6,25,53,55} Das GpIIbIIIa ist allerdings wie schon mehrmals beschrieben in der Lage, auch andere adhäsive Proteine wie Fibrinogen, Fibronectin und Vitronectin, die alle im Plasma vorkommen, binden kann. Die Bindung von vWf - zumindest in immobilisierter Form - an GpIIbIIIa erfordert allerdings eine Aktivierung

dieses Rezeptors, welche durch vorherige Interaktion des vWf mit GpIb oder von GpIIbIIIa mit Fibrinogen erreicht werden kann⁵³. Hantgan et al. zeigten bei einem Patienten mit schwerer vWD, daß Plättchenadhäsion an immobilisiertem Fibrinogen entscheidend von vWf abhängig ist²⁵. Die Interaktion GpIb-vWf scheint dabei durch Aktivierung von GpIIbIIIa zusätzlich die Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen zu vermitteln²⁵. Daneben ist allerdings auch unabhängig von GpIIbIIIa eine Adhäsion über GpIb-Bindung an Subendothel-gebundenen vWf bekannt⁸. Kompliziert wird dieses Wechselspiel zusätzlich durch die unterschiedliche Relevanz dieser Interaktionsmöglichkeiten bei verschiedenen Strömungsbedingungen. GpIIbIIIa und Fibrinogen scheinen in erster Linie bei niedrigen Scherraten (bis 600 s⁻¹), GpIb und vWf bei hohen Scherraten (über 800 s⁻¹) adhäsionsvermittelnd zu sein^{4,55,65}. Die Befunde Hantgans zeigten, daß allerdings auch bei relativ niedrigen Scherraten (300 s⁻¹) das Fehlen von vWf die Adhäsion an Fibrinogen um 40% reduzierte, bei 1300 s⁻¹ allerdings war dieser Effekt wesentlich ausgeprägter.

Im SPAA liegen mit maximalen Scherraten von 170 s⁻¹ die Scherraten um annähernd eine Größenordnung niedriger als in den oben zitierten Publikationen. Unter diesem Gesichtspunkt scheint es daher durchaus nicht überraschend, daß in Experimenten der vorliegenden Arbeit bei vWf-Mangel kein signifikanter Reduktionseffekt auf die Adhäsion nachzuweisen war.

Diese Befunde zeigen, daß der von Willebrand Faktor (vWf) quantitativ wohl nicht in erheblichem Ausmaß an der Vermittlung der Adhäsion an Fremdoberflächen bei niedrigen Scherraten teilnimmt. Somit scheidet auch Gp Ib als wichtiger Rezeptor für die Adhäsion bei diesen Scherraten aus, da hierfür vWf der einzig mögliche Ligand ist.

Zusammenfassend wird durch diese Experimente die These der entscheidenden Bedeutung der Fibrinogen-GpIIbIIIa -Achse für die Adhäsion bei niedrigen Scherraten untermauert.

5 Zusammenfassung

Thrombozyten von Patienten mit arterieller Verschlusskrankheit (AVK) weisen eine erhöhte Haftungsneigung auf. In der vorliegenden Arbeit wurde aufbauend auf diesen Befund die Morphologie adhärenter Plättchen dieser Patienten vergleichend mit gesunden Kontrollpersonen mittels Interferenzreflexionskontrastmikroskopie (IRCM) analysiert, wobei ein Shape Index (SI) - die inverse Circularität $1/C$ - zur morphologischen Quantifizierung eingesetzt wurde. Dabei zeigte sich, daß das Ausbreiten (spreading) der Plättchen auf Glasoberflächen, die mit Plättchen-reichem-Plasma (PRP) von AVK-Patienten beströmt wurden, signifikant ausgeprägter war als bei gesunden Kontrollpersonen. Darüber hinaus zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation der Haftungsneigung der Plättchen mit dem Grad des spreading. Die als Shape Index (SI) verwendete inverse Circularität $1/C$ scheint somit angesichts dieser Befunde ein sinnvoller Parameter zur Einschätzung der Plättchenmorphologie und – durch die signifikante Korrelation mit der Adhäsivität – auch der Plättchenfunktion zu sein.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluß von Atherosklerose-Risikofaktoren auf die Adhäsions-Morphologie untersucht. Dabei zeigte sich, daß bei erhöhten HDL-Cholesterinspiegeln die Plättchenmorphologie – gemessen am Shape Index (SI) - signifikant unterschiedlich war als bei niedrigeren HDL-Konzentrationen, HDL korrelierte dabei invers mit dem „spreading“. Die Betrachtung des Zusammenhangs anderer Risikofaktoren wie Fibrinogen, Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin und Triglyzeride mit dem Morphologie-Parameter erbrachte demgegenüber den Trend, daß erhöhte Plasmaspiegel mit gesteigertem „spreading“, also erhöhter Plättchenreaktivität, zusammenhängen. Bei gleichzeitig erhöhten Konzentrationen zweier dieser Risikofaktoren zeigte sich, daß signifikante Steigerungen des Shape Index (SI) bei Kombination erhöhter Fibrinogen- und Triglyzeridspiegel, außerdem bei hohen LDL- und gleichzeitig niedrigen HDL-Werten und auch bei erhöhten Fibrinogen- und geringen HDL-Konzentrationen vorlagen.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt einer Membran-Rezeptorblockade auf Plättchenadhäsion- und -morphologie untersucht. Strömungsexperimente im Staupunkt-Adhäsio-Aggregometer (SPAA) zeigten, daß in vitro eine Inhibition des Membranrezeptors Gp IIb/IIIa (Integrin α IIb β 3) durch das Tetrapeptid RGDS, das Peptidanalogen Ro 43-8857 und das Antikörperfragment c7E3-Fab eine drastische Reduktion der Adhäsion bewirkt. Darüber hinaus zeigte sich bei therapeutischem Einsatz von c7E3-Fab bei Patienten mit hyperreaktiven Plättchen (Patienten mit akutem Myokardinfarkt nach Angi-

oplastie-Behandlung) in ex-vivo Experimenten ebenso eine signifikante Adhäsionsminderung, die sowohl 3 Stunden wie auch 30 Stunden nach Infusion von c7E3-Fab nachweisbar war. Diese Befunde untermauern einerseits die zentrale Bedeutung von GpIIbIIIa als zentralem adhäsionsvermittelnden Rezeptor. Andererseits zeigt die bisher nicht beschriebene Adhäsionsreduktion der Plättchen durch c7E3-Fab einen neuen Aspekt zur Erklärung der therapeutischen Wirksamkeit der Substanz.

Die Messung des Shape Index (SI) der wenigen haftenden Thrombozyten unter Rezeptorinhibition wies paradoxerweise ein gesteigertes Ausbreiten (spreading) der Plättchen auf, was die im ersten Teil der Arbeit beschriebene enge Korrelation zwischen Adhäsivität und spreading scheinbar widerlegte. Wir deuten das gesteigerte spreading der wenigen haftenden Plättchen bei Rezeptorblockade als Folge einer erhöhten Reaktivität einer kleinen Plättchenpopulation, die auf Grund ihrer gesteigerten Aktivierbarkeit sehr schnell den Zustand völligen Ausbreitens (spreading) erreicht. Nach dieser These wäre diese schnell gespreitete Population unempfindlich gegen Inhibitor und würde folglich an der Oberfläche haften bleiben, während weniger reaktive Plättchen, die dendritisch über Pseudopodien hafteten, durch Blocker im „spreading“ inhibiert und auf Grund ihres hohen Strömungswiderstands und ihrer geringen Anzahl von Rezeptor-Liganden-Bindungen fortgespült würden. Letztere Plättchen bleiben in den Kontrollexperimenten haften und erreichen wechselnde Ausbreitungsgrade.

GpIIbIIIa, das von den Plasmaproteinen hauptsächlich Fibrinogen und von Willebrand Faktor (vWf) bindet, erscheint als der entscheidende Membranrezeptor für die Plättchenadhäsion an Fremdoberflächen. Adhäsionsmessungen bei Patienten mit von Willebrand'scher Erkrankung (vWD) sollten die Relevanz des vWf bei der Adhäsion insbesondere bei den im SPAA vorliegenden niedrigen Scherraten (bis 170 s^{-1}) abklären. Die Ergebnisse zeigten keine Korrelation der teilweise drastisch erniedrigten vWf-Plasmaspiegel mit der Adhäsivität der Plättchen. Bei niedrigen Scherraten ($<600 \text{ s}^{-1}$, im SPAA kommen maximale Scherraten von 170 s^{-1} vor) scheint somit Fibrinogen über Bindung an GpIIbIIIa der hauptsächliche Ligand für die Adhäsion an Fremdoberflächen zu sein. Daraus folgt, daß Gp Ib, dessen einzig möglicher Ligand der vWf ist, als Adhäsions-Rezeptor ausscheidet und wahrscheinlich erst bei höheren Scherraten wirksam wird.

6 Literaturverzeichnis

1. Anonymous. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization. The EPILOG Investigators [see comments]. *N.Engl.J.Med.* 1997; 336:1689-1696.
2. Alig L, Edenhofer A, Hadvary P, Hurzeler M, Knopp D, Muller M, Steiner B, Trzeciak A, Weller T. Low molecular weight, non-peptide fibrinogen receptor antagonist. *J.Med.Chem.* 1992; 35:4393-4407.
3. Andre P, Arbeille B, Drouet V, Hainaud P, Bal-dit SC, Caen JP, Druet LO. Optimal antagonism of GPIIb/IIIa favors platelet adhesion by inhibiting thrombus growth. An ex vivo capillary perfusion chamber study in the guinea pig. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1996; 16:56-63.
4. Andre P, Brouland JP, Roussi J, Bonneau M, Pignaud G, Bal dS, Hainaud P, Vaiman M, Drouet L. Role of plasma and platelet von Willebrand factor in arterial thrombogenesis and hemostasis in the pig. *Exp.Hematol.* 1998; 26:620-626.
5. Badimon JJ, Badimon L, Turitto VT, Fuster V. Platelet deposition at high shear rates is enhanced by high plasma cholesterol levels. In vivo study in the rabbit model. *Arterioscler.Thromb.* 1991; 11:395-402.
6. Baruch D, Bahnak B, Girma JP, Meyer D. von Willebrand factor and platelet function. *Baillieres.Clin.Haematol.* 1989; 2:627-672.
7. Basha BJ, Sowers JR. Atherosclerosis: an update. *Am.Heart J.* 1996; 131:1192-1202.
8. Berndt MC, Ward CM, De Luca M, Facey DA, Castaldi PA, Harris SJ, Andrews RK. The molecular mechanism of platelet adhesion. *Aust.N.Z.J.Med.* 1995; 25:822-830.
9. Brown WV. Review of clinical trials: proving the lipid hypothesis. *Eur.Heart J.* 1990; 11 Suppl H:15-20:15-20.
10. Carvalho AC, Colman RW, Lees RS. Platelet function in hyperlipoproteinemia. *N.Engl.J.Med.* 1974; 290:434-438.
11. Castelli WP. Lipids, risk factors and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis* 1996; 124 Suppl:S1-9:S1-S9
12. Charo IF, Kiefer N, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, editors. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice.* 3 ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1994:489-507.
13. Coller BS. Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy. *Circulation* 1995a; 92:2373-2380.

14. Coller BS. The role of platelets in arterial thrombosis and the rationale for blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as antithrombotic therapy. *Eur.Heart J.* 1995b; 16 Suppl L:11-5:11-15.
15. Coller BS, Anderson K, Weisman HF. New antiplatelet agents: platelet GPIIb/IIIa antagonists. *Thromb.Haemost.* 1995; 74:302-308.
16. Coller BS, Lang D, Scudder LE. Rapid and simple platelet function assay to assess glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade. *Circulation* 1997; 95:860-867.
17. Davi G, Aversa M, Catalano I, Barbagallo C, Ganci A, Notarbartolo A, Ciabattini G, Patrono C. Increased thromboxane biosynthesis in type IIa hypercholesterolemia. *Circulation* 1992; 85:1792-1798.
18. Drexel H, Steurer J, Muntwyler J, Meienberg S, Schmid HR, Schneider E, Grochenig E, Amann FW. Predictors of the presence and extent of peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1996; 94:II199-II205
19. Eberth JC, Schimmelbusch C. Experimentelle Untersuchungen über Thrombose. *Virchow's Archiv* 1886; 105:331-350.
20. Eberth JC, Schimmelbusch C. Die Thrombose nach Versuchen und Leichenbefunden. Stuttgart: Ferdinand Enke, 1888.
21. Federici AB. Diagnosis of von Willebrand disease. *Haemophilia.* 1998; 4:654-660.
22. Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, Schiessler A, Schomig A. Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty [see comments]. *Circulation* 1996; 93:229-237.
23. Goldstein JL, Kita T, Brown MS. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. *N.Engl.J.Med.* 1983; 309:288-296.
24. Hantgan RR, Endenburg SC, Cavero I, Marguerie G, Uzan A, Sixma JJ, de Groot PG. Inhibition of platelet adhesion to fibrin(ogen) in flowing whole blood by Arg-Gly-Asp and fibrinogen gamma-chain carboxy terminal peptides. *Thromb.Haemost.* 1992; 68:694-700.
25. Hantgan RR, Hindriks G, Taylor RG, Sixma JJ, de Groot PG. Glycoprotein Ib, von Willebrand factor, and glycoprotein IIb:IIIa are all involved in platelet adhesion to fibrin in flowing whole blood. *Blood* 1990; 76:345-353.
26. Herbert JM, Tissinier A, Defreyn G, Maffrand JP. Inhibitory effect of clopidogrel on platelet adhesion and intimal proliferation after arterial injury in rabbits. *Arterioscler.Thromb.* 1993; 13:1171-1179.
27. Holvoet P, Collen D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB J.* 1994; 8:1279-1284.
28. Jen CJ, Li HM, Wang JS, Chen HI, Usami S. Flow-induced detachment of adherent platelets from fibrinogen-coated surface. *Am.J.Physiol.* 1996; 270:H160-H166

29. Jordan RE, Wagner CL, Mascelli MA, Treacy G, Nedelman MA, Woody JN, Weisman HF, Collier BS. Preclinical development of c7E3 Fab; a mouse/human chimeric monoclonal antibody fragment that inhibits platelet function by blockade of GPIIb/IIIa receptors with observations on the immunogenicity of c7E3 Fab in humans. In: Horton MA, editor. *Adhesion Receptors as Therapeutic Targets*. Boca Raton, New York London, Tokyo: CRC Press, 1996:281-305.
30. Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostino RB. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study. *JAMA* 1987; 258:1183-1186.
31. Knobler H, Savion N, Shenkman B, Kotev-Emeth S, Varon D. Shear-induced platelet adhesion and aggregation on subendothelium are increased in diabetic patients. *Thromb.Res.* 1998; 90:181-190.
32. Konstantopoulos K, Kamat SG, Schafer AI, Banez EI, Jordan R, Kleiman NS, Hellums JD. Shear-induced platelet aggregation is inhibited by in vivo infusion of an anti-glycoprotein IIb/IIIa antibody fragment, c7E3 Fab, in patients undergoing coronary angioplasty. *Circulation* 1995; 91:1427-1431.
33. Kullo IJ, Edwards WD, Schwartz RS. Vulnerable plaque: pathobiology and clinical implications. *Ann.Intern.Med.* 1998; 129:1050-1060.
34. Lacoste L, Lam JY, Hung J, Letchacovski G, Solymoss CB, Waters D. Hyperlipidemia and coronary disease. Correction of the increased thrombogenic potential with cholesterol reduction [see comments]. *Circulation* 1995; 92:3172-3177.
35. Lawrence JB, Gralnick HR. Monoclonal antibodies to the glycoprotein IIb-IIIa epitopes involved in adhesive protein binding: effects on platelet spreading and ultrastructure on human arterial subendothelium. *J.Lab.Clin.Med.* 1987; 109:495-503.
36. Levenson J, Giral P, Megnien JL, Gariépy J, Plainfosse MC, Simon A. Fibrinogen and its relations to subclinical extracoronary and coronary atherosclerosis in hypercholesterolemic men. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1997; 17:45-50.
37. McMillan GC. Historical review of research on atherosclerosis. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1995; 369:1-6.
38. Mitchell ME, Sidawy AN. The pathophysiology of atherosclerosis. *Semin.Vasc.Surg.* 1998; 11:134-141.
39. Nakatanl S, Hato T, Minamoto Y, Fujita S. Differential inhibition of fibrinogen binding to agonist- and RGDS peptide-activated states of GPIIb-IIIa by an anti-GPIIIa monoclonal antibody, PMA5. *Thromb.Haemost.* 1996; 76:1030-1037.
40. Newman PJ, Allen RW, Kahn RA, Kunicki TJ. Quantitation of membrane glycoprotein IIIa on intact human platelets using the monoclonal antibody, AP-3. *Blood* 1985; 65:227-232.
41. Park K, Mao FW, Park H. Morphological characterization of surface-induced platelet activation. *Biomaterials* 1990; 11:24-31.

42. Reed D. Which risk factors are associated with atherosclerosis? *Circulation* 1993; 87:II54-II55
43. Reininger AJ, Korndörfer MA, Wurzinger LJ. Adhesion of ADP-activated platelets to intact endothelium under stagnation point flow in vitro is mediated by the integrin α IIb β 3. *Thromb.Haemostasis* 1998; 79:998-1003.
44. Reininger AJ, Reininger CB, Spannagl M, Mellinghoff A, Porr A, Heinzmann U, Wurzinger LJ. Effect of fibrinogen substitution in afibrinogenemia on hemorheology and platelet function. *Thromb.Haemost.* 1995; 74:853-858.
45. Reininger AJ, Reininger CB, Wurzinger LJ. The influence of fluid dynamics upon adhesion of ADP-stimulated human platelets to endothelial cells. *Thromb.Res.* 1993; 71:245-249.
46. Reininger CB, Graf J, Reininger AJ, Spannagl M, Steckmeier B, Schweiberer L. Increased platelet and coagulatory activity in peripheral atherosclerosis flow mediated platelet function is a sensitive and specific disease indicator. *Int.Angiol.* 1996a; 15:335-343.
47. Reininger CB, Graf J, Reininger AJ, Spannagl M, Steckmeier B, Schweiberer L. Increased platelet and coagulatory activity indicate ongoing thrombogenesis in peripheral arterial disease. *Thromb.Res.* 1996b; 82:523-532.
48. Reininger CB, Reininger AJ, Graf J, Eibl-Eibesfeldt BI, Steckmeier B. Real-time analysis of platelet adhesion under stagnation point flow conditions: The effect of red blood cells and glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade. *J.Vasc.Invest.* 1996; 2:1-11.
49. Reininger CB, Reininger AJ, Hormann A, Steckmeier B, Schweiberer L. Quantitative analysis of platelet function using stagnation point flow aggregometry. First clinical results. *Int.Angiol.* 1992; 11:247-255.
50. Ruggeri ZM. Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb.Haemost.* 1993; 70:119-123.
51. Ruoslahti E, Noble NA, Kagami S, Border WA. Integrins. *Kidney Int.Suppl.* 1994; 44:S17-S22
52. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996; 84:289-297.
53. Savage B, Shattil SJ, Ruggeri ZM. Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin α IIb β 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J.Biol.Chem.* 1992; 267:11300-11306.
54. Schrör K. Antriplatelet drugs a comparative review. *Drugs* 1995; 50:7-28.
55. Sixma JJ, van ZG, Banga JD, Nieuwenhuls HK, de GP. Platelet adhesion. *Semin.Hematol.* 1995; 32:89-98.

56. Smith EB. Lipids and plasma fibrinogen: early and late composition of the atherosclerotic plaque. *Cardiologia*. 1994; 39:169-172.
57. Stuart MJ, Gerrard JM, White JG. Effect of cholesterol on production of thromboxane b₂ by platelets in vitro. *N.Engl.J.Med.* 1980; 302:6-10.
58. Thiruvikraman SV, Guha A, Roboz J, Taubman MB, Nemerson Y, Fallon JT. In situ localization of tissue factor in human atherosclerotic plaques by binding of digoxigenin-labeled factors VIIa and X [published erratum appears in *Lab Invest* 1997 Feb;76(2):297-9]. *Lab.Invest.* 1996; 75:451-461.
59. Tippe A, Reininger A, Reininger C, Riess R. A method for quantitative determination of flow induced human platelet adhesion and aggregation. *Thromb.Res.* 1992; 67:407-418.
60. Topol EJ. Prevention of cardiovascular ischemic complications with new platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Am.Heart J.* 1995; 130:666-672.
61. Turner NA, Moake JL, Kamat SG, Schafer AI, Kleiman NS, Jordan R, McIntire LV. Comparative real-time effects on platelet adhesion and aggregation under flowing conditions of in vivo aspirin, heparin, and monoclonal antibody fragment against glycoprotein IIb-IIIa. *Circulation* 1995; 91:1354-1362.
62. Tyroler HA. Review of lipid-lowering clinical trials in relation to observational epidemiologic studies. *Circulation* 1987; 76:515-522.
63. Verschueren H. Interference reflection microscopy in cell biology: methodology and application. *J.Cell Sci.* 1985; 75:279-301.
64. Virchow R. *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin.* Frankfurt a. M., Meidinger, 1865.
65. Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HR. Effect of shear rate on platelet interaction with subendothelium in citrated and native blood. I. Shear rate--dependent decrease of adhesion in von Willebrand's disease and the Bernard-Soulier syndrome. *J.Lab.Clin.Med.* 1978; 92:750-764.
66. Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HR. Further evidence that glycoprotein IIb-IIIa mediates platelet spreading on subendothelium. *Thromb.Haemost.* 1991; 65:202-205.
67. Wojciechowski P, Brash JL. The Vroman effect in tube geometry: the influence of flow on protein adsorption measurements. *J.Biomater.Sci.Polym.Ed.* 1991; 2:203-216.
68. Wu YP, de Groot PG, Sixma JJ. Shear-stress-induced detachment of blood platelets from various surfaces. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1997; 17:3202-3207.
69. Zhao B. Role of lipoproteins in platelet activation. *Blood Coagul.Fibrinolysis* 1996; 7:270-273.

70. Zhao B, Rickert CH, Filler TJ, Liu B, Verhallen PF, Dierichs R. Adhesion of washed blood platelets in vitro is advanced, accelerated, and enlarged by oxidized low-density lipoprotein. *Am.J Hematol.* 1995; 49:177-182.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von 1995 bis 1999 im Anatomischen Institut der Technischen Universität München (Direktor Univ. Prof. Dr. M. Gratzl).

Ich möchte an dieser Stelle vor allem meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. L.J. Wurzinger sehr herzlich für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Doktorarbeit danken. Herr Prof. Wurzinger war nicht nur der Initiator meiner Begeisterung für Anatomie, sondern vor allem ihm verdanke ich die intensive Förderung und Lenkung aller wissenschaftlichen Arbeiten dieser Doktorarbeit.

Ebenfalls mein sehr herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. A. Reiningger, der vor allem beim experimentellen Teil meiner Arbeit mir mit Ideen und Ausdauer zu jeder Zeit tatkräftig zur Seite stand.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. M. Gratzl, der mich vor allem auch - aber nicht nur - bei dieser Doktorarbeit seit Jahren in vielen wesentlichen Dingen fördert.

Ebenfalls danken möchte ich Frau PD Dr. C. Reiningger, Herrn PD Dr. M. Spannagl und Herrn Prof. Schramm für die Zusammenarbeit und Überlassung von Präparaten, Labordaten und Blutproben.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Frau A. Tiefenbacher, Herrn A. Mauermeyer und Herrn A. Bulling für vielerlei technische Unterstützung im Labor und am PC.

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern

München, Januar 2001

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Agneskirchner
Vornamen: Jens Dominik
Geburtsdatum: 16. April 1973
Geburtsort: Wangen im Allgäu
Familienstand: ledig
Eltern: Georg Agneskirchner, StD
 Ursula Agneskirchner, OStR´in
Geschwister: Silke Böhler, Studentin

Schul- und Hochschulbildung

1979 - 1981 Grundschule Bodolz
1981 - 1983 Grundschule Enzisweiler
1983 - 1992 Bodensee gymnasium Lindau, Abitur 7/1992
1992-1999 Studium der Humanmedizin an der Technischen
 Universität München (TUM)

Stipendium:

1995-1999 Stipendiat der Hanns-Seidel-Stiftung
Seit 1999 Alt-Stipendiat der Hanns-Seidel-Stiftung

Beruflicher Werdegang:

6/1999-11/2000 Arzt im Praktikum (AiP) in der Abteilung und Poliklinik
 für Sportorthopädie TU München, Klinikum rechts der Isar,
 (Leiter: Univ. Prof. Dr. A.B. Imhoff)
Seit 12/2000 Assistenzarzt in der Abteilung und Poliklinik
 für Sportorthopädie TU München, Klinikum rechts der Isar,
 (Leiter: Univ. Prof. Dr. A.B. Imhoff)

Sonstige Tätigkeiten:

1995 - 1998 Tätigkeit als studentische Hilfskraft (Vorpräparand, Tutor) im
 Präparierkurs der Anatomie und im Histologiekurs an der TU
 München
1996 - 1998 Tätigkeit als Lehrer für Anatomie und Physiologie an
 der Logopädenschule der „Gesellschaft für
 erwachsenengerechte Bildung“ (GFEB), München

Hobbies:

Sport Ski- und Snowboardfahren, Windsurfen, Segeln, Squash
**Musikalische
 Interessen** Violine, Klavier, Klarinette, Saxophon