

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. van Aken  
Abteilung für Experimentelle und Klinische Hämostaseologie  
Leiterin: Prof. Dr. rer. nat. B. Kehrel

**Einfluß der nichtionischen Kontrastmittel  
Iopentol, Iodixanol und Iohexol auf die  
Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung während  
Koronarangiographie und perkutaner transluminaler  
Koronarangioplastie (PTCA)**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Daniel Bödeker

aus Münster

2004

Gedruckt mit freundlicher Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. B. Kehrel

2. Berichterstatter: PD. Dr. med. T. Wichter

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2004

**Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. van Aken  
Abteilung für Experimentelle und Klinische Hämostaseologie  
Referentin: Prof. Dr. rer. nat. B. Kehrel  
Koreferent: PD Dr.med. T.Wichter**

## **Zusammenfassung**

**Einfluß der nichtionischen Kontrastmittel  
Iopentol, Iodixanol und Iohexol auf die  
Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung während Koronarangiographie und  
perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA)**

**Daniel Bödeker**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, in wie weit es bei Koronarangiographie und PTCA unter Verwendung dreier nichtionischer Kontrastmittel zu einer Zellaktivierung kommt.

Blutentnahmen aus den Einführbestecken erlaubten es, Aussagen über den ex-vivo-Aktivierungszustand und die Aktivierungsbereitschaft der Thrombozyten und Leukozyten zu machen. Hierzu wurde eine schonende Blutprobenvorbereitung der Zellen verwandt, die präparativ bedingte Zellartefakte minimiert und somit Verhältnisse in-vivo simuliert. In dieser Arbeit konnte durch durchflußzytometrische Untersuchungen gezeigt werden, daß sich der ex-vivo-Aktivierungszustand der Thrombozyten und der Leukozyten durch Applikation von Iopentol, Iodixanol oder Iohexol während Koronarangiographie nicht ändert. Die Untersuchungen zur thrombin-induzierten Thrombozytenaktivierung zeigen, daß Iopentol stärker als Iohexol die  $\alpha$ -Granula-Sekretion der Thrombozyten während Koronarangiographie inhibiert, wohingegen die dimere Substanz Iodixanol die thrombin-induzierte  $\alpha$ -Granula-Sekretion nicht verändert. Die thrombin-induzierte CD63-Expression wird am stärksten von Iopentol gefolgt von Iohexol und Iodixanol inhibiert; die Mepacrine-Sekretion der „dense-bodies“ bleibt von der Kontrastmittelgabe unter Koronarangiographie unbeeinflusst.

Es zeigten sich für das gesamte Patientenkollektiv ex-vivo erhöhte Thrombozyten-Leukozyten-Assoziationsraten, wobei die Thrombozyten bevorzugt mit Monozyten assoziiert sind. Dies mag die Beteiligung entzündlicher Prozesse und die Bedeutung der Zellinteraktion an der Entstehung und dem Progress arteriosklerotischer Erkrankungen unterstreichen. Die thrombin-induzierte Leukozytenaktivierung wurde durch Verwendung eines der drei Kontrastmittel während Koronarangiographie ebenfalls inhibiert.

Die durchflußzytometrischen Untersuchungen zeigten einen unveränderten ex-vivo Thrombozyten-Aktivierungszustand nach PTCA mit nichtionischen Kontrastmitteln. Die Thrombozyten zeigten sich allerdings nahezu refraktär auf die Thrombin-Stimulation in-vitro. Hier scheint die Dilatation mit der damit verbundenen kurzzeitigen Ischämie und der Endothelverletzung den Sekretionsmechanismus der Zellen zu inhibieren und zwar in einem stärkeren Maß als die alleinige Kontrastmittelapplikation während Koronarangiographie. Dieses refraktäre Verhalten auf die Thrombin-Stimulation in-vitro konnte auch bei den Untersuchungen zum Aktivierungsverhalten der Leukozyten nach PTCA beobachtet werden.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Morphologie der Thrombozyten .....	1
1.2	Thrombozytäre Membranglykoproteine.....	4
1.2.1	Integrine .....	4
1.2.1.1	Fibrinogenrezeptor (Glykoprotein IIbIIIa) .....	5
1.2.2	Glykoproteine mit leuzinreichen Wiederholungssequenzen.....	7
1.2.3	Thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren vom Selektintyp.....	8
1.2.4	Adhäsionsrezeptoren vom Immunglogulin-Typ.....	11
1.3	Thrombinrezeptor (PAR-1).....	12
1.4	Thrombospondin (TSP-1).....	13
1.5	Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion.....	14
1.6	Thrombozytäre Beteiligung an der Hämostase.....	15
1.7	Koronarangiographie.....	20
1.7.1	Zielsetzung, Indikation und Kathethertechnik.....	20
1.8	Perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA).....	22
1.8.1	Technik, Indikation und Ergebnisse der PTCA von Koronarstenosen .....	22
1.9	Kontrastmittel .....	25
1.9.1	Übersicht über die heute verwendeten Kontrastmittel.....	25
1.9.2	Nebenwirkungen der verwendeten Kontrastmittel.....	26
1.10	Zielsetzung der Arbeit.....	27
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
2.1	Patientenrekrutierung und Auswahlkriterien .....	29
2.2	Probenabnahme .....	32
2.3	Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP) .....	33
2.4	Durchflußzytometrie.....	34
2.4.1	Aufbau und Funktionsweise eines Durchflußzytometers.....	34
2.4.2	Durchflußzytometrische Messung der Zellpopulation .....	37

2.4.3	Probenvorbereitung für Untersuchungen im Vollblut .....	39
2.4.4	Probenvorbereitung für Untersuchungen des PRP.....	40
2.4.5	Detektion der Thrombozytenaktivierung .....	41
2.4.5.1	α-Granula-Sekretion (CD62-Expression, TSP-1-Bindung) .....	41
2.4.5.2	„Dense-Bodies“-Sekretion (CD63-Expression, Mepacrine-Aufnahme und –Abgabe) .....	41
2.4.5.3	Spaltung und Internalisierung des Thrombinrezeptors PAR-1 .....	42
2.4.5.4	Von-Willebrand Faktor-Bindung .....	43
2.4.5.5	Fibrinogenbindung .....	43
2.4.6	In vitro-induzierte Thrombozytenaktivierung .....	44
2.4.7	Detektion der Leukozytenaktivierung .....	44
2.4.7.1	Expression von CD11b .....	44
2.4.7.2	TSP-1-Bindung der Monozyten und PMNL .....	45
2.4.8	In vitro-induzierte Leukozytenaktivierung .....	45
2.4.9	Detektion von Thrombozyten-Leukozyten-Assoziaten .....	46
2.4.9.1	„Tissue-Factor“-Bindung von Thrombozyten- Leukozyten-Assoziaten .....	46
2.4.10	TSP-1-Bindung der Erythrozyten .....	47
2.5	Scheraggregometrie .....	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
3.1	Durchflußzytometrische Untersuchungen der Kontrastmittelwirkung während Koronarangiographie.....	49
3.1.1	Durchflußzytometrische Untersuchungen zum ex-vivo Aktivierungszustand der Thrombozyten.....	49
3.1.1.1	α-Granula-Sekretion der Thrombozyten .....	49
3.1.1.2	„Dense-bodies“-Sekretion der Thrombozyten .....	51
3.1.1.3	Spaltungs- und Internalisierungszustand des Thrombinrezeptors PAR-1.....	54
3.1.1.4	vWF- und Fibrinogenbindung der Thrombozyten.....	55
3.1.2	Durchflußzytometrische Untersuchungen zur thrombin-	

### III

	induzierten Thrombozytenaktivierung.....	57
3.1.2.1	α-Granula-Sekretion der Thrombozyten.....	57
3.1.2.2	„Dense-bodies“-Sekretion der Thrombozyten .....	60
3.1.3	Durchflußzytometrische Untersuchungen zum ex-vivo Aktivierungszustand der Leukozyten.....	63
3.1.3.1	Aktivierungszustand der Monozyten.....	63
3.1.3.2	Aktivierungszustand der PMNL.....	66
3.1.4	Durchflußzytometrische Untersuchungen zur thrombin- induzierten Leukozytenaktivierung.....	69
3.1.4.1	In-vitro-induzierte Monozytenaktivierung.....	69
3.1.4.2	In-vitro-induzierte PMNL-Aktivierung.....	72
3.1.5	Durchflußzytometrische Untersuchung der Thrombozyten- Leukozyten-Assoziation.....	75
3.1.6	„Tissue-Factor“-Expression von Thrombozyten-Monozyten- Assoziaten.....	78
3.1.7	Thrombospondin-1-Bindung der Erythrozyten.....	79
3.2	Durchflußzytometrische Untersuchungen der Kontrastmittelwirkung während PTCA.....	80
3.2.1	ex-vivo Aktivierungszustand der Thrombozyten.....	80
3.2.1.1	α-Granula-Sekretion der Thrombozyten.....	80
3.2.1.2	„Dense-bodies“-Sekretion der Thrombozyten.....	83
3.2.1.3	Spaltungs-und Internalisierungszustand des Thrombinrezeptors PAR-1.....	86
3.2.1.4	vWF- und Fibrinogenbindung der Thrombozyten.....	87
3.2.2	Durchflußzytometrische Untersuchungen zur thrombin- induzierten Thrombozytenaktivierung.....	88
3.2.2.1	α-Granula-Sekretion der Thrombozyten.....	88
3.2.2.2	„Dense-bodies“-Sekretion der Thrombozyten.....	91
3.2.3	Durchflußzytometrische Untersuchungen zum ex-vivo Aktivierungszustand der Leukozyten.....	94
3.2.3.1	Aktivierungszustand der Monozyten.....	94
3.2.3.2	Aktivierungszustand der PMNL.....	97
3.2.4	Durchflußzytometrische Untersuchungen zur thrombin- induzierten Leukozytenaktivierung.....	100
3.2.4.1	In-vitro-induzierte Monozytenaktivierung.....	100

## IV

3.2.4.2	In-vitro-induzierte PMNL-Aktivierung.....	103
3.2.5	Durchflußzytometrische Untersuchung der Thrombozyten- Leukozyten-Assoziation.....	107
3.3	Ergebnisse der Scheraggregometrie.....	109
3.3.1	Einfluß der Kontrastmittel während Koronarangiographie auf die thrombozytäre Oberflächenbedeckung im Adhäsionsassay.....	111
3.3.2	Einfluß der Kontrastmittel während PTCA auf die thrombozytäre Oberflächenbedeckung im Adhäsionsassay.....	114
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>116</b>
4.1	Einfluß der Kontrastmittel während Koronarangiographie auf die scherstress-vermittelte thrombozytäre Oberflächenbedeckung im Adhäsionsassay.....	117
4.2	Einfluß der Kontrastmittel auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Thrombozyten während Koronarangiographie .....	118
4.3	Einfluß der Kontrastmittel auf die thrombin-induzierte Thrombozytenaktivierung während Koronarangiographie.....	120
4.4	Einfluß der Kontrastmittel auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Leukozyten während Koronarangiographie.....	122
4.5	Einfluß der Kontrastmittel auf die thrombin-induzierte Leukozytenaktivierung während Koronarangiographie.....	124
4.6	Unterschiede der dargelegten Ergebnisse zu vorhergehenden Untersuchungen.....	125
4.7	Einfluß der Kontrastmittel während PTCA auf die Scherstress-vermittelte thrombozytäre Oberflächenbedeckung im Adhäsionsassay.....	126
4.8	Einfluß der PTCA auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Thrombozyten.....	127
4.9	Einfluß der PTCA auf die thrombin-induzierte Thrombozytenaktivierung.....	129
4.10	Einfluß der PTCA auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Leukozyten.....	130
4.11	Einfluß der PTCA auf die thrombin-induzierte	



	Leukozytenaktivierung.....	132
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>133</b>
<b>6</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>135</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>136</b>
7.1	Material .....	136
7.1.1	Selbst hergestellte Reagenzien .....	136
7.1.2	Gekaufte Reagenzien .....	137
7.1.3	Einwegartikel .....	139
7.2	Geräte .....	140
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>142</b>

## Abkürzungsverzeichnis

®	eingetragenes Warenzeichen
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACVB	aortokoronarer Venenbypass
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
aqua dest.	aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
ASS	Azetylsalizylsäure
AS	Aminosäure
bzw.	beziehungsweise
CD	„cluster of differentiation“
cm	Zentimeter
CPA	Scheraggregometer („cone and plate(let)“- Analyse)
Da	Dalton
DG	Diacylglycerid
die	Tag
DTS	dense tubular system
EGF	epidermal growth like factor
EKG	Elektrokardiogramm
F	French
FACS	Durchflußzytometer („fluorescent activated cell sorter“)
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht („forward angle light scatter“)
g	Gramm
g <sub>e</sub>	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
ggf.	gegebenenfalls
GMP-140	„granula membrane protein-140“
GP	Glycoprotein
GPRP	Glycin-Prolin-Arginin-Prolin
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N‘-2-ethansulfonsäure
HMWK	„high molecular weight kininogen“
i.c.	intrakoronar

## VII

ICAM-2	„intracellular-cell-adhesion-molecule-2“
Ig	Immunglobulin
in.	Inch
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
i.v.	intravenös
Kap.	Kapitel
kDA	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KM	Kontrastmittel
M	molare Masse
min	Minute
ml	Milliliter
mOsm/kg H <sub>2</sub> O	Osmolarität
mPa • s	Viskosität
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
o.g.	oben genannt
°C	Grad Celsius
PAR-1	„protease-activated receptor-1“
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	„platelet-endothelial-cell-adhesion-molecule-1“
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandin G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PIP <sub>2</sub>	Phosphoinositol-4,5-bisphosphat
PMNL	neutrophiler Granulozyt („polymorphonuclear leukocyte“)
PRP	plättchenreiches Plasma
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s	Sekunde
SCS	„surface connected open system“
SSC	Seitwärtsstreulicht („side scatter“)
Tab.	Tabelle
TF	„tissue factor“
TSP	Thrombospondin
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
TZ	Thrombozyten

## VIII

u.a.	unter anderem
U	Unit
V.	Vena
vWF	von Willebrand Faktor
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Morphologie der Thrombozyten

Die kernlosen Thrombozyten, im allgemeinen auch als „Blutplättchen“ bezeichnet, sind die kleinsten korpuskulären Bestandteile des Blutes. Sie werden im Knochenmark aus polyploiden Megakaryozyten gebildet. Die physiologische Thrombozytenzahl im peripheren Blut beträgt 150 000 bis 400 000 pro  $\mu\text{l}$  Blut. Ihr mittlerer Durchmesser beträgt in der unstimulierten, diskoiden Form 2-4  $\mu\text{m}$  [Morgenstern, 1999], ihr Volumen 4-7,6 fl [Frojmovic; Milton, 1982] und das Gewicht eines einzelnen Thrombozyten ist mit 10 pg angegeben [Iyengar et al., 1979]. Thrombozyten haben keinen Zellkern, aber ihr Rest an mRNA und Mitochondrien der Megakaryozyten befähigt sie noch begrenzt zur Neusynthese von Proteinen [Gawaz, 1999]. Die physiologische Überlebenszeit eines Thrombozyten im peripheren Blut beträgt ca. 7 Tage, wobei etwa 20% der Gesamtplättchenzahl täglich erneuert wird. Ihr Abbau erfolgt im retikuloendothelialen System von Milz und Leber, 1/3 der Thrombozyten werden in der Milz gespeichert und steht im Austausch mit dem zirkulierenden Anteil [Schrör, 1993]. Wie bereits oben erwähnt, liegen Thrombozyten im nichtaktivierten Zustand in einer typischen diskoiden Form, mit einer durchschnittlichen Oberfläche von 8  $\mu\text{m}^2$  [Morgenstern, 1997] vor. Durch Aktivierung der Thrombozyten durch Agonisten wie Thrombin, ADP oder Kollagen verändern die Thrombozyten ihre Form („shape change“). Durch Ausstülpung ihrer Zytoplasmamembran runden sie sich ab und bilden sogenannte Pseudopodien, die mit einer Oberflächenvergrößerung auf 13  $\mu\text{m}^2$  einhergehen (Echinosphärozyten) [Morgenstern, Kho, 1977].

Ultrastrukturell läßt sich der Thrombozyt in vier verschiedene Zonen unterteilen [Gawaz, 1999; White, 1994] – in die periphere Zone, strukturelle Zone, in die Zone der Zellorganellen und die Zone der Membransysteme. Jede dieser Zonen übernimmt jeweils die für sie spezifischen Aufgaben.

Die periphere Zone besteht aus der Zytoplasmamembran, aus verschiedenen Glykoproteinen (GP), Proteinen und Mukopolysacchariden. Wie bei anderen Zellen auch, besteht die zytoplasmatische Membran des Thrombozyten aus einer Phospholipiddoppelschicht („bilayer“), mit nach außen gelagertem Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin und nach innen gerichtetem Phosphatidylinositol und Sphingomyelin. Dazwischen sind Membranproteine, die u.a. als Rezeptoren oder Adhäsionsproteine fungieren, eingelassen [Suzuki et al., 1996].

Die strukturelle Zone, bestehend aus Strukturproteinen (Aktin und Myosin) und submembranös gelegenen Mikrotubuli, hält maßgeblich die diskoide Form des ruhenden Thrombozyten aufrecht und ist an der Formänderung des Thrombozyten beteiligt [Fox, 1993].

Im Zytoplasma eingebettet liegt die Zone der Organellen, bestehend aus drei verschiedenen Speichergranula, den  $\alpha$ -Granula, den dichten Graula („dense bodies“) und den Lysosomen. Neben diesen Speichergranula sind Mitochondrien und Glykogenspeicher im Zytoplasma eingebettet [Morgenstern, 1997, 1999; Gawaz, 1999; Suzuki et. al. 1996]. Mit Hilfe der Inhaltsstoffe (Tab.1.1) der drei Speicherorganellen werden viele Funktionen und Reaktionen des Thrombozyten gesteuert.

Die  $\alpha$ -Granula sind mit einem Anteil von etwa 15% am Gesamtvolumen des Thrombozyten am häufigsten und liegen in nichtaktiviertem Zustand von Zytoplasma von einander getrennt vor [Morgenstern, 1997]. Ihnen kommen die verschiedensten Aufgaben des Blutplättchens, wie Adhäsion, Aggregation, Koagulation [Morgenstern, 1997], Proliferation, Chemotaxis und Inflammation [Preissner, de Groot, 1993] zu. In der Membran der  $\alpha$ -Granula konnten weiterhin Glykoprotein IIbIIIa, sowie P-Selektin [Harrison, Cramer, 1993] und kleine Mengen GPIb, GPIX und GPV gefunden werden [Berger, 1996].

Der Volumenanteil der „dense bodies“ am Thrombozyten ist mit etwa 1% wesentlich geringer, man findet etwa nur 5-6 Granula pro Thrombozyt [Morgenstern, 1999; White, 1994]. Ihr im Vergleich zu den  $\alpha$ -Granula elektronendichter Inhalt wird auf den Anteil Kalzium, Magnesium und anorganisches Phosphat zurückgeführt [White, 1992]. Neben

anderen Inhaltsstoffen (Tab. 1.1) ist in der Membran der „dense bodies“ das Protein Granulophysin (CD63) vorhanden [Nishibori, 1993]. Bei Thrombozytenaktivierung wird dieses Protein an der Oberfläche, ähnlich wie das P-Selektin der  $\alpha$ -Granula, exprimiert.

Die nur vereinzelt vorkommenden Lysosomen der Thrombozyten haben einen Durchmesser von 175-250 nm [Suzuki et.al., 1996]. Sie enthalten verschiedene Enzyme (Tab. 1.1), die während der thrombozytären Sekretionsphase in das Extrazellulärmedium abgegeben werden [Holmsen, Day, 1970].

Tab 1.1      Inhaltstoffe thrombozytärer Speicherorganellen [Gawaz, 1999]

„dense bodies“	$\alpha$ -Granula	Lysosomen
ATP	<b>Enzyme</b>	$\alpha$ -Arabinoside
ADP	$\alpha_1$ -Antitrypsin	$\beta$ -Galaktosidase
Kalzium	$\alpha_2$ -Makroglobulin	$\beta$ -Glucuronidase
Serotonin	$\alpha_2$ -Antiplasmin	Elastase
Phosphat	C1-Esteraseinhibitor	Kollagenase
Guaninnukleotide	<b>adhäsive Proteine</b>	Kathepsin
	Fibrinogen, Fibronectin	
	VWF, TSP-1	
	Vitronectin, GPIIb/IIIa	
	<b>Wachstumsfaktoren</b>	
	Platelet-derived-growth-factor	
	Epidermal growth factor- $\beta$	
	Endothelial cell growth factor	
	<b>Zytokine</b>	
	Interleukin 1	
	CD40-Ligand	
	Plättchenfaktor 4; $\beta$ -Thromboglobulin	
	Transforming growth factor- $\beta$	
	<b>Koagulationsfaktoren</b>	
	HMWK; Plasminogen	
	PAI-1; Faktor V/IX/XIII	
	Fibrinogen; Protein S	

Die vierte morphologische Zone ist das Membransystem der Thrombozyten. Hier unterscheidet man das offene kanalikuläre System (surface connected open system, SCS) und das dichte tubuläre System (dense tubular system, DTS).

Das SCS ist ein verzweigtes Membransystem, das mit der Thrombozytenoberfläche verbunden ist [White, Clawson, 1980]. Während des Sekretionsprozesses gelangen Granulainhaltsstoffe durch das SCS an die Membranoberfläche [Suzuki et al. 1996]. Beim Formwandel des Thrombozyten, im Rahmen der Aktivierung beispielsweise, dient das SCS als Membranreservoir, durch Evagination desselben kommt es zur Oberflächenvergrößerung des Thrombozyten [White et al., 1990].

Das DTS entstammt dem rauhen endoplasmatischen Retikulum des Megakaryozyten und ist Hauptspeicherort für freie Kalziumionen, welche bei dem Aktivierungsvorgang des Thrombozyten eine entscheidene Rolle spielen [Gawaz, 1999]. Hierzu wird es aus dem DTS freigesetzt und so der zytoplasmatische Kalziumspiegel erhöht, der verschiedene Aspekte der Thrombozytenaktivierung reguliert [Ware et al., 1986].

## **1.2 Thrombozytäre Membranglykoproteine**

Für die thrombozytären Reaktionsschritte, auf die ich im Kapitel 1.3 noch näher eingehen werde, ist ein enges Zusammenspiel zwischen Thrombozyten, Endothel, plasmatischen Gerinnungsfaktoren und Strukturen der Gefäßwand erforderlich. Als Informationsträger dienen hierbei membranständige Glykoproteine der Thrombozyten, die nach Bindung an spezifische Liganden eine thrombozytäre Stoffwechselantwort hervorrufen. Gemäß ihrer charakteristischen Molekülstruktur unterteilt man die thrombozytären Rezeptoren in verschiedene Klassen. Hierzu gehören: Integrine, Glykoproteine, mit leuzinreichen Wiederholungssequenzen, Selektine und Membranrezeptoren vom Immunglobulintyp.

### **1.2.1 Integrine**

Rezeptoren vom Integrintyp sind neben Thrombozyten ubiquitär auf fast allen Zellen repräsentiert. Sie dienen der Zell-Zell-Interaktion und –Kommunikation. Integrine sind



nichtkovalent verbunden, heterodimer aus einer  $\alpha$ -Kette und einer  $\beta$ -Kette zusammengesetzt und werden von Thrombozyten in 5 verschiedenen Klassen exprimiert [de Groot, Sixma, 1999]. Als Liganden der Integrine dienen u.a. der von-Willebrand-Faktor, Fibrinogen, Vitronektin, Thrombospondin und Kollagene [Bennett, 1991]. Sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Kette besteht aus einem extrazellulär gelegenen aminoterminalen Ende, einer transmembranösen Domäne und einem intrazellulären carboxyterminalen Anteil [Gawaz, 1999]. Klassifiziert werden die Integrine anhand ihrer  $\beta$ -Kette, die mit der korrespondierenden, spezifischen  $\alpha$ -Kette den Rezeptor bildet. Folgende thrombozytäre Integrine sind bekannt (Tab. 1.2):

Tab. 1.2 Thrombozytäre Beteiligung an der Integrin-Superfamilie (modifiziert) [Gawaz, 1999]

<b>Integrine</b>	<b>Glykoprotein</b>	<b>Ligandenspezifität</b>
$\alpha_2\beta_1$	GPIIb/IIIa	Kollagen
$\alpha_5\beta_1$	GPIIc	Fibronektin
$\alpha_6\beta_1$	GPIIc*IIa	Laminin
$\alpha_{IIb}\beta_3$	GPIIb/IIIa	Fibrinogen, vWF Thrombospondin
$\alpha_v\beta_3$		Vitronektin, Thrombospondin

### 1.2.1.1 Fibrinogenrezeptor (Glykoprotein IIb/IIIa)

Der Fibrinogenrezeptor, das Glykoprotein IIb/IIIa gehört zu den  $\beta_3$ -Integrinen und ist sowohl Bestandteil der Thrombozytenmembran, als auch des offenen kanalikulären Systems und der  $\alpha$ -Granula. Mit 1-2% des Gesamtproteingehalts des Thrombozyten [Jennings, Phillips, 1982] ist es das häufigste Membranglykoprotein mit einer Oberflächenbesetzung von 60 000 bis 100 000 Rezeptoren pro Blutplättchen [Gawaz, 1999]. Etwa 70% der Rezeptoren liegen an der Membranoberfläche vor, die restlichen 30% werden erst nach Aktivierung des Thrombozyten aus den intrazellulären Speicherorten (SCS und  $\alpha$ -Granula) exprimiert [Woods et al., 1986; Bennett, 1991; Gawaz, 1999]. GP IIb/IIIa besteht aus einer  $\alpha_{IIb}$ -Kette mit einer molaren Masse von 136

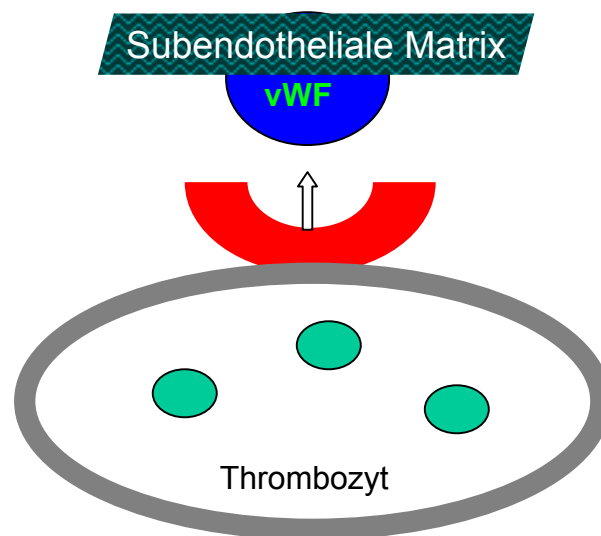
kDa, die aus einer großen Untereinheit (heavy chain) und einer kleinen Untereinheit (light chain) zusammengesetzt ist. Die  $\beta_3$ -Kette besteht nur aus einer Einheit und besitzt ein Molekulargewicht von 90-105 [Bennett, 1991; Carrell et al., 1985]. Aufgabe des GP IIb/IIIa ist es, lösliches Fibrinogen, vWF und Fibronectin [Clemetson, 1995] an die aktivierte Thrombozytenoberfläche zu binden, der primäre Schritt der Thrombozytenaggregation. Im ruhenden Zustand des Thrombozyten dient das GP IIb/IIIa der begrenzten Aufnahme von Fibrinogen in die  $\alpha$ -Granula [Kieffer et al., 1992]. Bei Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann (M. Glanzmann) resultiert die erhöhte Blutungsneigung aus einem fehlenden, oder fehlerhaft exprimierten Fibrinogenrezeptor auf der Thrombozytenmembran [Philipps et al., 1991].

In der Zirkulation tragen die Thrombozyten unter physiologischen Bedingungen einen nicht aktivierten GP IIb/IIIa- Rezeptor auf ihrer Oberfläche. Thrombozytenaktivierung führt zu einer Konformationsänderung des Thrombozyten, die Bindungsstelle für Adhäsivproteine wie z.B. Fibrinogen und, vor allem bei hohem Scherstress, vWF wird zugänglich, so daß es durch Bindung von löslichem Fibrinogen zu einer stabilen Thrombozytenbindung kommen kann [de Groot, Sixma, 1999; Phillips et al., 1991]. Hierzu besitzt Fibrinogen im wesentlichen zwei Bindungsstellen, mit denen es mit dem GPIIb/IIIa-Rezeptor in Verbindung treten kann: zwei Sequenzen, bestehend aus der Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD) auf der  $\alpha$ -Kette, wobei eine Sequenz am aminoterminalen und die andere am carboxyterminalen Ende gelegen ist. Welche hier als Hauptbindungsstelle fungiert, ist noch umstritten, Smith et al. (1990) beispielsweise betrachten die N-terminale Sequenz als Hauptbindungssequenz für GP IIb/IIIa. Eine weitere Bindungsstelle ist eine aus 12 Aminosäuren bestehende Sequenz im Bereich des C-Terminus der  $\gamma$ -Kette des Fibrinogenmoleküls, welche spezifisch für Fibrinogen ist [Kloczewiak et al., 1982; de Groot, Sixma, 1999]. Auf dem Glykoprotein IIb/IIIa wurden bisher drei Fibrinogenbindungsstellen lokalisiert, hier greifen synthetische Fibrinogenrezeptorantagonisten, sogenannte Disintegrine, an. Diese Inhibitoren wurden u.a. im Giftsekret bestimmter Schlangenarten gefunden [Shebuski et al., 1989] und waren Ausgangspunkt der Entwicklung synthetischer Antagonisten. Substanzen wie Abciximab, Eptifibatide und Tirofiban binden kompetitiv im Bereich der RGD-Erkennungsregion des GPIIb/IIIa-Rezeptors [Gawaz, 1999], und können so die Fibrinogenbindung und die Ausbildung eines Thrombus verhindern.

## 1.2.2 Glykoproteine mit leuzinreichen Wiederholungssequenzen

Die Gruppe der Glykoproteine mit leuzinreichen Wiederholungssequenzen ist eine inhomogene Gruppe, deren Gemeinsamkeit jedoch aus einer typischen 24 Aminosäuren langen Konsensussequenz (LRG-Sequenz), mit Häufung der Aminosäure Leuzin, besteht. Ein Vertreter ist der Glykoprotein Ib-V-IX-Komplex, der einen der thrombozytären Adhäsionsrezeptoren für den von-Willebrand-Faktor bildet [Herrmann et al., 1997; Clemetson, 1995; Kehrel et al., 1998; Weiss, 1991]. Dieser Komplex spielt eine wichtige Rolle in der primären Hämostase (s. Kap. 1.3), wobei der Thrombozyt, entgegen den hohen, im arteriellen Strombett auftretenden Scherkräften an subendothelialer Matrix des verletzten Endothels fixiert werden muß [Sixma, de Groot, 1991]. Das GP Ib-V-IX dient als Bindeglied zwischen dem an Kollagenfibrillen adhärenen Glykoprotein vWF und dem Thrombozyt (Abb 1.1).

Abb.1.1 Kollagenvermittelte Adhäsion des GP Ib-V-IX an vWF [Gawaz, 1999]



Der heterodimere GPIb-V-IX Rezeptor besteht aus vier Untereinheiten: GPIb $_{\alpha}$  mit einer molaren Masse von 145kDa ist mit GPIb $_{\beta}$  (27kDa) über Disulfidbrücken verbunden [de Groot, Sixma, 1999; Gawaz, 1999]. Mit dem GPIX-Molekül ist jeweils ein GPIb-Molekül im Verhältnis 1:1 verbunden [Clemetson, 1995]. Zwei GPIb-GPIX-Moleküle

sind um ein zentral liegendes GPV-Molekül, mit einem Molekulargewicht von 82, nicht-kovalent verbunden [Modderman et al., 1992]. Die GPIb $\alpha$ -Untereinheit weist zum einen die Bindungsstellen für vWF und Thrombin auf [Ruggeri, 1991], zum anderen verankert sie das Molekül mit ihrer zytoplasmatischen Domäne im Zytoskelett. Während der Thrombozytenaktivierung wird GPIb „downreguliert“ [Rohrer et al., 1992]. Auch für diesen Rezeptor ist ein Defekt oder gänzlichliches Fehlen mit einer erhöhten Blutungsneigung verbunden. Patienten mit diesem Bernard-Soulier-Syndrom können vWF nicht an die Thrombozyten binden, damit ist eine ausreichende Plättchenadhäsion nach einer Gefäßverletzung nicht gewährleistet [Clemetson, Scharf, 1999].

### 1.2.3 Thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren vom Selektintyp

Strukturell sind diese drei vaskulären Adhäsionsrezeptoren charakterisiert durch eine aminoternale extrazelluläre Lektindomäne, in deren Nachbarschaft eine „epidermal-growth-like“-Domäne (EGF) lokalisiert ist. Daran anschließend finden sich kurze Regionen, die homolog zu regulatorischen Komplementfaktoren sind. Insgesamt wurden drei Selektine beschrieben, wobei jedoch nur das P-Selektin auf Thrombozyten exprimiert wird [McEver, 1991; Stenberg et al. 1985] (Tab. 1.3).

Tab.1.3 Adhäsionsrezeptoren vom Selektintyp, modifiziert [Gawaz, 1999]

<b>Selektin</b>	<b>Vorkommen</b>	<b>Funktion</b>
<b>L-Selektin</b>	Leukozyten	Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen
<b>E-Selektin</b>	aktivierte Endothelzellen	Adhäsion von Leukozyten am Endothel
<b>P-Selektin</b>	Thrombozyten Endothel	Adhäsion von Leukozyten an Thrombozyten und Endothel

P-Selektin, welches ursprünglich als „granula membrane protein-140“ (GMP-140), oder „platelet activation dependent granule-external membrane protein“ (PADGEM-Protein)

bezeichnet wurde, [Stenberg, 1985; McEver, 1991; Larson et al., 1990], besitzt heute in der CD-Nomenklatur die Bezeichnung CD62P. P-Selektin ist im unaktivierten Zustand der Thrombozyten in der Membran der  $\alpha$ -Granula gespeichert und gelangt nach Thrombinstimulation innerhalb von Sekundenbruchteilen durch Fusion der Granulamembran mit der Plasmamembran an die Thrombozytenoberfläche [Redlich et al., 1997; Stenberg et al., 1985, Spangenberg et al., 1993]. In Endothelzellen findet sich P-Selektin in den Weibel-Pallade-Körperchen [Bonfanti et al., 1989]. Nach in-vitro Aktivierung mit Thrombin verbleibt dieses Protein für mindestens eine Stunde auf der Thrombozytenmembran [George et al., 1986]. P-Selektin auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten und stimulierter Endothelzellen vermittelt kalziumabhängig die Adhäsion von Monozyten und Neutrophilen (PMNL) (Abb. 1.2, 1.3, 1.4) [Furie, Furie, 1997]. Diese Leukozytensubtypen, aber auch Lymphozyten und Thrombozyten exprimieren dazu den P-Selektin-Rezeptor PSGL-1 [Sako et al., 1993; Palabricia et al., 1992; Tedder et al., 1995, Frenette et al., 2000]. Somit dürfte P-Selektin auf aktivierten Thrombozyten die Rekrutierung von Monozyten und Neutrophilen an Stellen der Thromboseentstehung begünstigen [Gawaz, 1999, Frenette et al., 2000].

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten verwandte ich P-Selektin (CD62) zusammen mit Granulophysin (CD63) und Thrombospondin-1 (TSP-1) als Aktivierungs- und Degranulationsmarker des Thrombozyten.

Abb. 1.2 P-Selektin-vermittelte Interaktion von aktiviertem Thrombozyt mit einem Leukozyt [Gawaz, 1999]

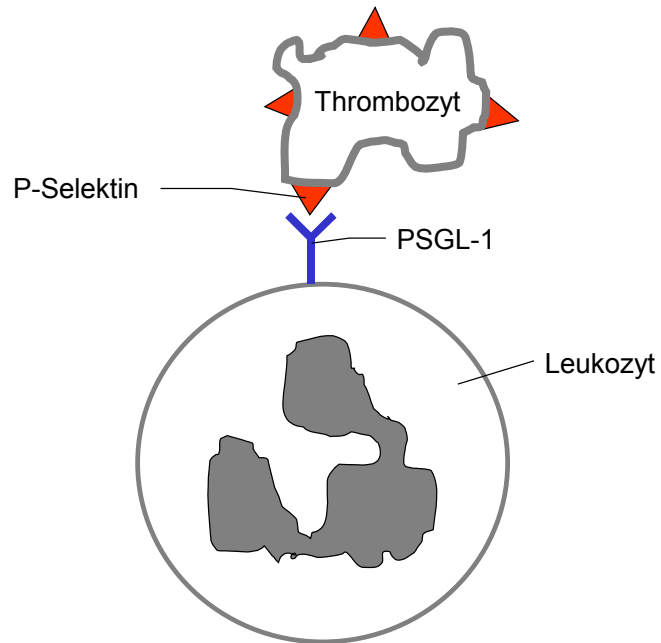


Abb. 1.3 P-Selektin-vermittelte Interaktion von Leukozyten mit einer Endothelzelle [Gawaz, 1999]

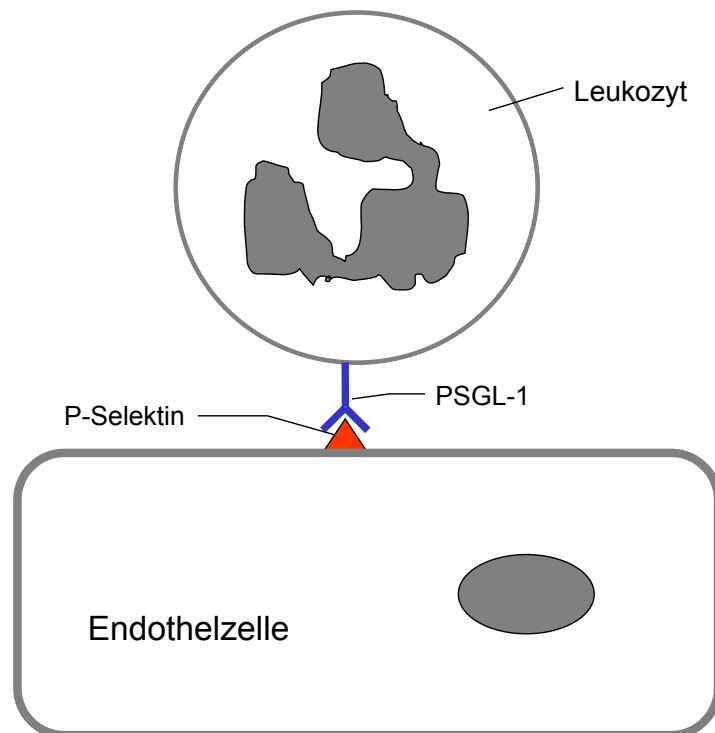
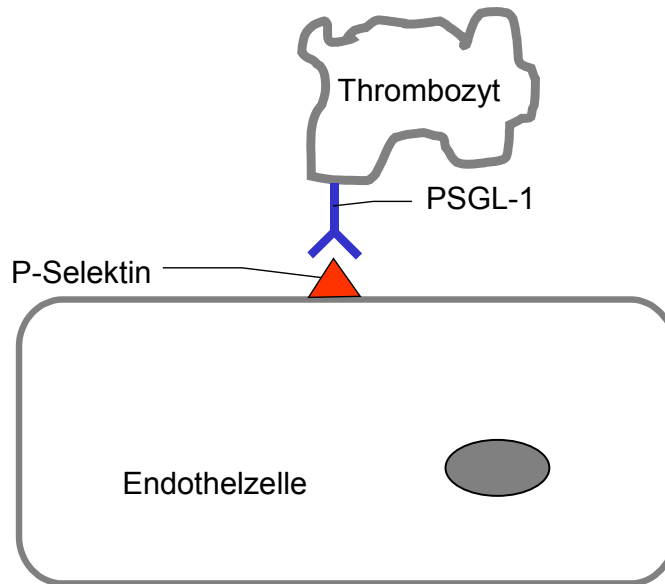


Abb. 1.4 PSGL-1-vermittelte Interaktion von Thrombozyten mit einer Endothelzelle [Frenette et al., 2000]



### 1.2.4 Adhäsionsrezeptoren vom Immunglobulin-Typ

Aus dieser Familie wurden bislang im Thrombozyten zwei Typen, ICAM-2 und PECAM-1, beschrieben. Die Bedeutung dieser zwei Adhäsionsrezeptoren ist noch weitestgehend unklar. Das „platelet-endothelial-cell-adhesion-molecule-1“ (PECAM-1) mit einer molaren Masse von 130kDa kommt neben Thrombozyten auch in Monozyten, Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten vor [Newman et al., 1990]. PECAM-1 scheint bei der Bindung des Thrombozyten an das Endothel ebenso wie bei der Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten eine Rolle zu spielen. Das „intracellular-cell-adhesion-molecule-2“ (ICAM-2) ist auf aktivierten Thrombozyten beschrieben worden und scheint seine Funktion in der thrombozyten-vermittelten Inflammation, sowie bei der Thrombozyten-Leukozyten Adhäsion zu haben [Gawaz, 1999].

### 1.3 Thrombinrezeptor (PAR-1)

Thrombin ist eine Serinprotease, die im Plasma als inaktives Prothrombin vorliegt, im Verlauf der Gerinnungskaskade aktiviert wird und durch die Spaltung von Fibrinogen die Bildung von Fibrin katalysiert. Daneben kann Thrombin durch Stimulation eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors die Signaltransduktion einer Vielzahl von Zellen einschließlich Thrombozyten aktivieren. Humanes  $\alpha$ -Thrombin besteht aus zwei Polypeptidketten, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und spaltet den G-Protein-gekoppelten Rezeptor PAR-1 am aminoterminalen Ende zwischen den Aminosäuren Arginin (Arg41) und Serin (Ser42) [Siess, 1997; Harbrecht, 1999, Dörmann et al., 2001].

Der Thrombinrezeptor PAR-1 besteht aus 452 Aminosäuren mit 7 transmembranen Domänen. Vor der ersten transmembranen Domäne liegt ein relativ langer, extrazellulärer Anteil des Proteins mit der oben beschriebenen Thrombinspaltungsstelle, die die Sequenz LDPR-S enthält, und einer weiter aminoterminal lokalisierten hirudinähnlichen Domäne [Harbrecht, 1999; de Groot, Sixma, 1999]. Das Thrombinmolekül bindet mit seiner speziellen S1-S4-Region an die Thrombinspaltungsstelle und mit seiner anionischen Bindungsstelle an die hirudinähnliche Domäne des Thrombinrezeptors. Thrombin spaltet den Rezeptor anschließend nach Arginin an Position 42 innerhalb der LDPR-S-Sequenz. Hierdurch entsteht im Rezeptor ein neues aminoterminales Ende, welches den Rezeptor über den „tethered ligand“ aktiviert, zusätzlich wird ein proteolytisches freies Polypeptid (SFLLRN-x) gebildet [Coughlin, 1993; Brass, 1994; Siess, 1997; Gawaz, 1999; de Groot, Sixma, 1999].

Thrombozyten besitzen im wesentlichen drei Bindungsstellen für Thrombin: eine hochaffine Bindungsstelle im Bereich des Glykoprotein Ib (GPIb) mit einer niedrigen Rezeptordichte von ca. 50 pro Thrombozyt, eine mäßigaffine, die durch einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor mit 7 transmembranen Domänen gebildet wird und eine hohe Rezeptordichte aufweist (ca. 2000 Kopien pro Thrombozyt) [Siess, 1997; Gawaz, 1999, Harbrecht, 1999]. Thrombozyten und Monozyten besitzen einen weiteren durch



Thrombin aktivierbaren Rezeptor, PAR-4, der wie PAR-1 durch proteolytische Spaltung mittels Thrombin aktiviert wird [Kahn et al., 1999]

Mit Hilfe bestimmter monoklonaler Antikörper, die gegen den NH<sub>2</sub>-Terminus des Thrombinrezeptors gerichtet sind, lassen sich Aussagen über den Spaltungs- und Internalisierungszustand des Thrombinrezeptors machen. Der Antikörper anti-PAR-1 Klon SPAN12 beispielsweise erkennt das aminoternale Ende mit der Thrombinspaltungsstelle LDPR-S und bindet nur an den ungespaltenen, intakten Thrombinrezeptor. WEDE15-Antikörper bindet spezifisch im Bereich der Aminosäuren 51-64 der hirudinähnlichen Domäne des Thrombinrezeptors und ist somit spaltungsinsensitiv und bindet sowohl an den gespaltenen als auch ungespaltenen Thrombinrezeptor [Brass, 1994].

## **1.4 Thrombospondin-1 (TSP-1)**

Das Glykoprotein Thrombospondin-1 (TSP-1), mit einer molaren Masse von 450 kDa, wird aktivierungsabhängig an die Oberfläche der Thrombozyten rückgebunden, bindet spezifisch an Phagozyten und ermöglicht die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion [Silverstein, Nachman, 1987]. Es wird, ähnlich wie P-Selektin, in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten gespeichert und bei Aktivierung freigesetzt und kann so als Marker für in vivo-Thrombozytenaktivierung herangezogen werden [Kehrel et al., 1996]. Außerdem wird TSP von einer Reihe anderer Zellen, so z.B. den Leukozyten, glatten Muskelzellen, Gliazellen, Keratinozyten und Endothelzellen synthetisiert [Frazier et al., 1987; LeGrand et al., 1988] und bindet teilweise an die Zelloberfläche der Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten zurück [Santoro, 1987]. TSP bindet aber auch an mehrere Makromoleküle, die zum Teil Bestandteil der extrazellulären Matrix sind, so z.B. Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen und Heparin [Frazier et al., 1987; LeGrand et al., 1988; Kehrel et al., 1991]. Thrombospondin vermittelt die Thrombozytenadhäsion an das Subendothel, die Aggregation der Thrombozyten untereinander, sowie die Adhäsion zwischen Leukozyten und Thrombozyten [Nieuwenhuis, 1999; Silverstein, Nachman, 1987; Lahav, 1993; Santoro, 1987; Leung, 1984].

## 1.5 Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion

Arteriosklerose bezieht neben der Thrombose auch Entzündungsprozesse mit ein, bei denen zelluläre Aktivierung eine wichtige Rolle spielt [Furman et al., 1998]. Proteolytische Enzyme, wie Elastase, Sauerstoffradikale und Superoxydanionen, die von Neutrophilen freigesetzt werden, besitzen direkte zytotoxische Wirkung und sind in der Lage, Endothelzellen zu zerstören [DeServi et al., 1990] und so den arteriosklerotischen Prozess voranzutreiben. In letzter Zeit rückten somit die Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten in das Interesse, wobei vorher die zwei zellulären Aktivierungsvorgänge unabhängig voneinander untersucht wurden. [Rinder et al., 1991]. Erhöhte Thrombozyten-Leukozyten-Assoziationsraten wurden häufig bei Prozessen gefunden, die auch mit Thrombozytenaktivierung einhergehen, so z.B. sowohl bei Patienten mit stabiler [Furman et al., 1998] und instabiler Angina Pectoris [Ott et al., 1996], als auch nach PTCA [Mickelson et al., 1996], Bypassoperation [Rinder et al., 1992] und Hämodialyse [Gawaz et al., 1994]. Weiterhin zeigten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe deutlich erhöhte Assoziationsraten zwischen Thrombozyten und Monozyten bei Patienten mit akutem Schlaganfall [„Untersuchung zur Aktivierung von Thrombozyten, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und deren Wechselwirkung untereinander“, Dissertation, Jurk, K., 1999]. P-Selektin ist, wie bereits erwähnt, Inhaltstoff der thrombozytären  $\alpha$ -Granula und wird nach Thrombozytenaktivierung an der Oberfläche exprimiert [Stenberg et al., 1985], dort vermittelt es neben Tissue Factor-Expression des Monozyten [Celi et al., 1994; Furie, Furie, 1997], bei Bindung an den PSGL-1-Rezeptor des Monozyten [Furie, Furie, 1997], auch die Leukozytenadhäsion [Hamburger, McEver, 1990]. An Stellen von Gefäßverletzungen kann durch die P-Selektin-vermittelte Bindung zwischen Thrombozyten und Monozyten eine Thrombose eingeleitet werden [Celi et al., 1994], zum anderen wird durch Thrombozytenadhäsion an Leukozyten die Fibrinablagerung innerhalb eines wachsenden Thrombus gefördert [Palabricia et al., 1992]. Die Thrombozyten-Leukozyten-Adhäsion wird zum einen auf leukozytärer Seite durch den PSGL-1-Rezeptor, einem muzinähnlichen transmembranen Protein, das neben Kohlenhydratstrukturen auch Sialinsäure enthält [Furie, Furie, 1997; Frenette et al., 2000] bewirkt. Dieser bindet kalziumabhängig an P-Selektin des Thrombozyten [Xiao

et al., 1999]. Eine andere Möglichkeit der Bindung von Thrombozyten an Leukozyten ist der CD11b/CD18 (Mac-1)-Komplex, ein Heterodimer der  $\beta_2$ -Intergrin-Familie. Hier dient Fibrinogen als Bindeglied zwischen dem thrombozytären Glykoproteinrezeptor IIb/IIIa und dem beschriebenen Mac-1-Komplex [Ruf, Patscheke, 1995; Diamond, Springer, 1993; Spangenberg et al., 1993]. CD11b/CD18 wird in sekretorischen Granula der Leukozyten gespeichert und wird bei Aktivierung an der Zelloberfläche exprimiert [Mickelson et al., 1996]. Hierbei erhöht sich die Anzahl der Bindungsstellen von 50000/Zelle im ruhenden Zustand [Hughes et al., 1992] auf 250000/Zelle nach Aktivierung. Die durchflußzytometrische Detektion der Oberflächen-Exprimierung von CD11b auf Monozyten und PMNL kann hierbei als leukozytärer Aktivierungsmarker verwendet werden [Redlich et al., 1997]. Eine andere Möglichkeit der Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten wird über das Glykoprotein IV vermittelt, das als Thrombospondinrezeptor auf Zelloberflächen identifiziert wurde [Silverstein et al., 1989]. (s.o.)

## **1.6 Thrombozytäre Beteiligung an der Hämostase**

Das Blut zirkuliert in physiologischem Zustand im Gefäßsystem, ohne daß es zum Sistieren des Blutstroms oder zum Austritt des Blutes in das umgebende Gewebe kommt. Bei Aufhebung der Gefäßwandintegrität, im Rahmen von Schnittwunden etwa, kommt es zum Austritt von Blut und Plasmabestandteilen in das umliegende Gewebe, hier sorgen Thrombozyten mit löslichen Plasmabestandteilen für eine Abdichtung der verletzten Gefäßwand [Clemetson, Polgár, 1997]. Unter physiologischen Bedingungen bildet sich ein Thrombus, der auf den Bereich der Gefäßwandläsion beschränkt bleibt, ohne den Blutfluß und die Versorgung abhängiger Gefäßabschnitte zu beeinträchtigen. Unter Hämostase versteht man diese Bildung eines Gefäßwandthrombus, der den verletzten Gefäßwandabschnitt abdichtet [Schrör, 1993]. In einem ersten Schritt, der primären Hämostase, kommt es zur Adhäsion von ruhenden Thrombozyten im Bereich der Läsion [Sixma, Wester, 1977] (Abb 1.4). Die primäre Adhäsion führt zu einer Spreizung [van Zanten et al., 1997] (Echinosphärozyten), durch Überschreitung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration zu einer Formveränderung und Aktivierung der Thrombozyten. Auf diesen Reiz hin kommt es zu einer Sekretion der

thrombozytären Granulainhaltsstoffe [Gawaz, 1999] und weiterer Anlagerung von bereits aktivierten Thrombozyten an freigelegte Strukturen der subendothelialen Matrix (sekundäre Adhäsion) [Ruf et al., 1997] (Abb. 1.4). Die Formveränderung der Thrombozyten wird, ähnlich wie in der glatten Muskulatur, durch die Strukturproteine der strukturellen Zone, Aktin und Myosin gesteuert [Schrör, 1993]. Der aktivierte Thrombozyt reichert Mikrotubuli in den Pseudopodien an. Durch Polymerisation von Aktin kommt es zur Stabilisierung der Plasmamembran im Bereich der Pseudopodien, im weiteren Verlauf interagiert Aktin mit Myosin (Aktomyosin). Dieses bildet den kontraktilel Apparatur und sorgt für die weitere Formveränderung des aktivierten Thrombozyten. Für den Adhäsionsvorgang sind maßgeblich die bereits oben beschriebenen Membranglykoproteine verantwortlich, die in der Lage sind, mit bestimmten Strukturen der extrazellulären Matrix des Subendothels und der Gefäßwand-Media zu interagieren. Die extrazelluläre Matrix besteht aus Kollagenen, vor allem Typ I und III [Kehrel et al. 1998], und elastischen Fibrillen, die für die biomechanische Stabilität verantwortlich sind. Unter den nicht-kollagenen Bestandteilen der extrazellulären Matrix finden sich vor allem Fibronektin, Laminin, Thrombospondin und vWF, der über den GP Ib-V-IX-Komplex den ersten Kontakt des Thrombozyten mit dem Subendothel herstellt [Ikeda et al., 1991, Kehrel, et al., 1998]. Über Integrin-Rezeptoren (Kollagen-, Fibronektin- und Lamininrezeptoren) erfolgt die weitere Stabilisierung der Thrombozytenadhäsionen. Während der Aktivierungsphase des Thrombozyten wird ein Enzym, die Phospholipase A<sub>2</sub>, aktiviert, das zu einer Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranphospholipiden führt [Faili et al., 1994]. Aus der Arachidonsäure entstehen unter Zyklooxygenase-Wirkung Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) und Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>), wobei Prostaglandin H<sub>2</sub> in einem weiteren Schritt zu Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) umgewandelt wird [Halushka et al., 1997]. TXA<sub>2</sub>, nach Abgabe in den Extrazellulärraum, verstärkt zum einen den Aktivierungsvorgang, zum anderen bewirkt es durch eine Vasokonstriktion eine Verlangsamung des Blutstromes und erlaubt eine weitere Anlagerung von Thrombozyten [Schrör, 1993].

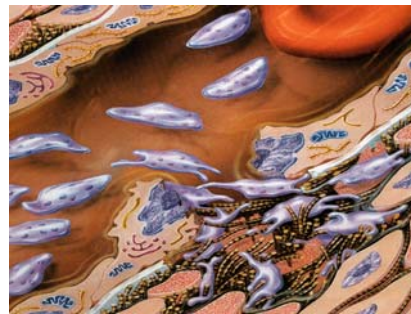
Durch Thrombozytendegranulation wird die Adhäsion von Thrombozyten untereinander, die Aggregation, begünstigt. Anfangs werden Thrombozyten durch Fibrinogenbrücken untereinander locker verbunden [Wencel-Drake et al., 1996]. Diesem reversiblen Vorgang folgt die sekundäre, irreversible Aggregation nach

Freisetzen der Granulainhaltstoffe. Bei Patienten mit einem Defekt der Speichergranula (storage-pool-disease) kommt es durch unvollständige oder vollständig fehlende sekundäre Aggregation zu einer erhöhten Blutungsneigung [Nieuwenhuis, 1999]. Dem bereits oben beschriebenen Glykoproteinrezeptor GPIIbIIIa der Thrombozyten kommt bei dem Aggregationsvorgang zentrale Bedeutung zu [Kieffer, Phillips, 1990]. Im Ruhezustand sind die Fibrinogenbindungsstellen des Rezeptors unzugänglich. Erst nach Thrombozytenaktivierung kommt es zur Freigabe dieser Bindungsstelle, und sie erlaubt die fibrinogenvermittelte Anlagerung weiterer Thrombozyten [Ruf et al., 1997; de Groot Sixma, 1999; Phillips et al., 1990]. (Abb.1.4, 1.5)

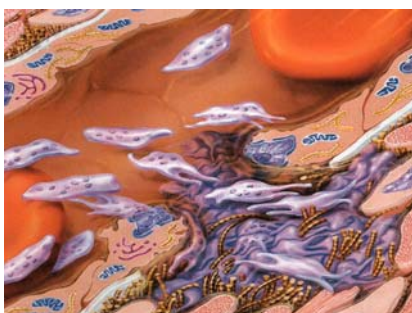
Abb. 1.4 Ablauf der normalen Hämostase [Akkerman et al., 1987]



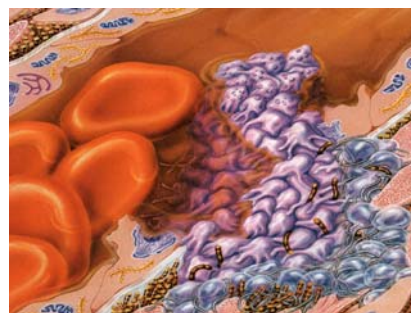
a) intaktes Blutgefäß



b) Endothelläsion mit Adhäsion von weiteren Thrombozyten



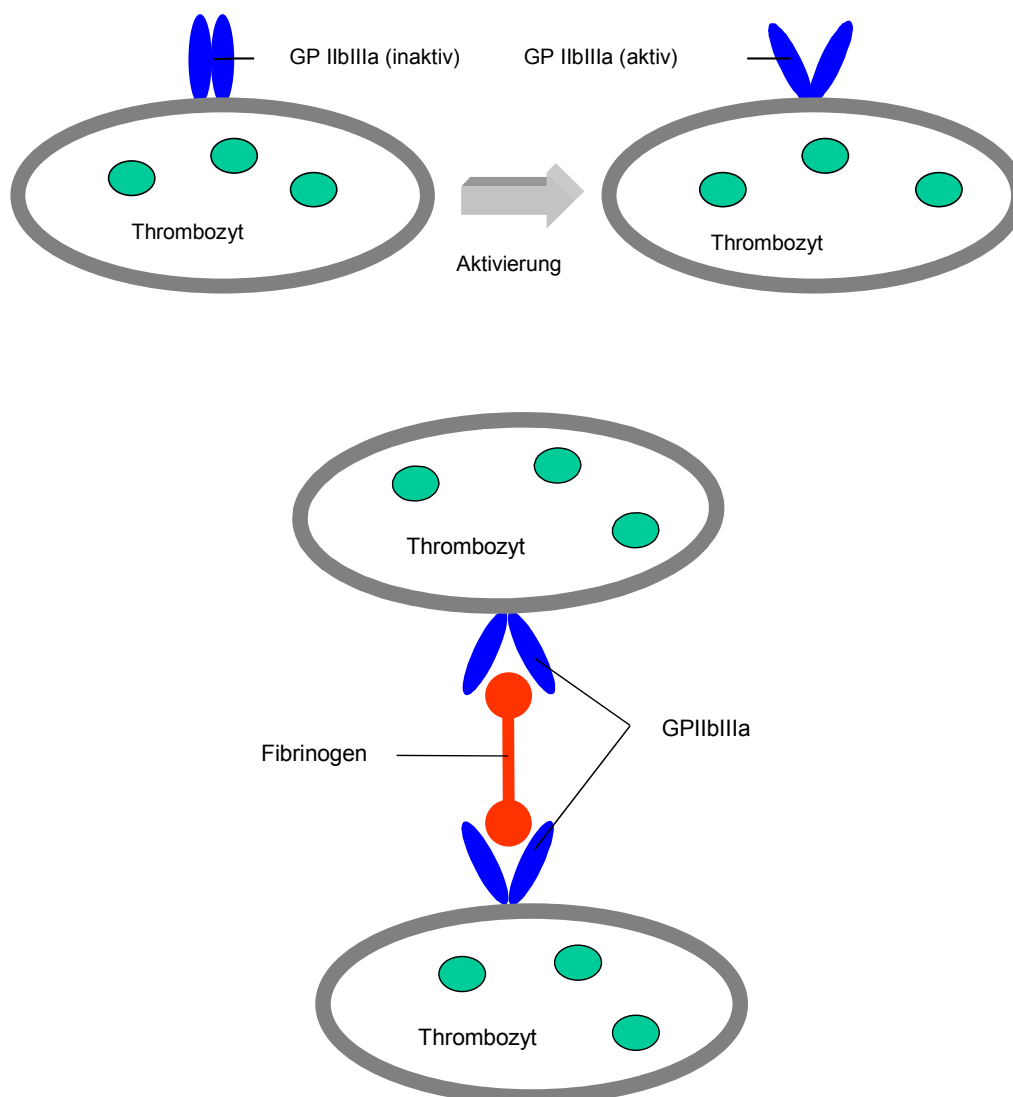
c) Thrombozytenaggregation



d) Fibrinbildung und Retraktion des Thrombus

Nach dem Adhäsionsvorgang finden im Thrombozyten weitere morphologische und funktionelle Veränderungen statt. Die Aktivierung, die zur Ausbildung eines kompletten Thrombus vonnöten ist, ist ein komplex gesteuerter Vorgang, bei dem mehrere Steuerungsmechanismen zum Tragen kommen:

Abb. 1.5 Thrombozytenaggregation durch GPIIb/IIIa (modifiziert) [Harbrecht, 1999; Gawaz, 1999]



Bei der Aktivierung durch die meisten Agonisten, diese können sowohl im Plasma gelöst, im umliegenden Gewebe vorliegen, oder vom Thrombozyten autokrin gebildet worden sein, kommt es durch Bindung der Agonisten an die entsprechenden Rezeptoren

auf der Thrombozytenmembran über Signaltransduktionswege zur Bildung von Signalfaktoren, „second messenger“, die ihrerseits zahlreiche metabolische Veränderungen des Thrombozytenstoffwechsels hervorrufen. Begleitet wird der Aktivierungsvorgang von einem Anstieg des zytoplasmatischen Kalziumspiegels, zum einen durch Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Depots, zum anderen durch Influx aus dem Extrazellulärraum [Authi, 1997]. Desweiteren kommt es zu einer Aktivierung des Phosphoinositidstoffwechsels. Bei einer Aktivierung des Thrombozyten kommt es zur Spaltung von Phosphoinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) durch die Phospholipase C. Hierbei entsteht Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ), welches Kalziumfreisetzung aus dem dichten tubulären System induziert, und Diacylglycerid (DG) [Nakashima et al., 1997]. DG aktiviert ihrerseits die Proteinkinase C, die die Phosphorylierung weiterer Signalproteine steuert und so die Freisetzung von Granulainhaltstoffen und die Expression des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa induziert [Gawaz, 1999]. Durch die oben beschriebene Kalziumfreisetzung wird zum einen der Arachidonsäurestoffwechsel angestoßen, der letztendlich das oben erwähnte  $\text{TXA}_2$  als proaggregatorische Substanz produziert [Nakashima et al., 1997]. Bei Überschreitung einer bestimmten Schwelle des zytoplasmatischen Kalziums, wird der Formwandel des Thrombozyten über Bildung von Pseudopodien mit Hilfe des kontraktilen Apparates hervorgerufen [Schrör, 1993]. Diese Formveränderung führt durch eine Vergrößerung der Thrombozytenoberfläche sowohl zur erhöhten Interaktion der Thrombozyten untereinander, als auch zu plasmatischen Reaktionen. Nach Adhäsion und Formwandel beginnt der Thrombozyt seine Granulainhaltsstoffe an die Umgebung abzugeben. Hier kann es durch Verschmelzung mit dem offenen kanalikulären System zu einer Abgabe in den Extrazellulärraum kommen [White, 1974], zum anderen besteht die Möglichkeit, die Inhaltsstoffe durch Exozytose direkt auszuschleusen [Morgenstern, 1997]. Je nach intrazellulärer Kalziumkonzentration degranulieren zuerst die „dense bodies“, die  $\alpha$ -Granula und schließlich die Lysosomen [Gawaz, 1999].

Der energieabhängige Sekretionsprozeß verstärkt den Aktivierungsprozeß und leitet, durch Rekrutierung weiterer ruhender Thrombozyten in das Plättchenaggregat (Abb. 1.4) die irreversible Phase der Aggregation ein. Zentrale Bedeutung kommt hier dem in „dense bodies“ enthaltenen ADP zu. Nach seiner Freisetzung aus Thrombozyten, geschädigtem Endothel und Erythrozyten [Schrör, 1993] bindet es an seine

Membranrezeptoren auf den Thrombozyten und führt neben Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration zur Aktivierung des GP IIb/IIIa-Rezeptorkomplexes [Harbrecht, 1999]. Die Bedeutung des ADP für die Thrombusbildung ist auch durch die Wirksamkeit von ADP-Rezeptorantagonisten der Thienopyridingruppe, wie Ticlopidin und Clopidogrel, bewiesen [Quinn, Fitzgerald, 1999].

## 1.7 Koronarangiographie

### 1.7.1 Zielsetzung, Indikation und Kathetertechnik

Ziel der Koronarangiographie ist die bildliche Darstellung der epikardialen Herzkranzgefäße, ihrer Kollateralen, sowie ggf. aorto-koronarer Bypasses nach entsprechender Operation. Zur Zeit existiert kein Verfahren, welches ähnlich exakte Aussagen über den Status der Herzkranzgefäße erlaubt [Krakau, 1999]. In Zusammenhang mit anderen kardiologischen Funktionsprüfungen, wie Ergometrie, Stressechokardiographie und Myokardszinigraphie dient die Koronarangiographie der therapeutischen Entscheidungsfindung bei Patienten mit vermuteter oder bekannter koronarer Herzerkrankung. Die Indikationen zur Koronarangiographie sind in Tabelle 1.4 zusammengestellt.

Tab. 1.4 Indikationen zur Koronarangiographie (modifiziert) [Krakau, 1999]

<b>Indikationen der Koronarangiographie</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Koronare Herzerkrankung</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Stabile / instabile Angina pectoris</li> <li>- Akuter Myokardinfarkt</li> <li>- Postinfarktphase</li> </ul> </li> <li>▪ <b>Ausschlußdiagnostik</b></li> <li>▪ <b>Diagnostik vor Operation angeborener oder erworbener Vitien</b></li> <li>▪ <b>Kontrollangiographie nach PTCA</b></li> <li>▪ <b>Kontrollangiographie nach Myokardrevaskularisation bei erneuten Beschwerden nach beschwerdefreiem Intervall</b></li> <li>▪ <b>Ventrikuläre Tachykardien</b></li> <li>▪ <b>Herzinsuffizienz</b></li> </ul>



Die Katheter, die bei der Koronarangiographie Verwendung finden, werden aus Polyäthylen oder Polyurethan gefertigt und von der Industrie in verschiedenen Schaftgrößen und Durchmessern angeboten. Um den Kathetern Torsionsstabilität zu verleihen, ist in der Katheterwand ein feines Drahtgeflecht verarbeitet [Windecker et al., 2000], die Katheterspitze selbst ist weich, um Gefäßwand und Koronarostium nicht zu beschädigen, der Katheter ist von geringer Thrombogenität. Koronarkatheter werden in Längen von 100-125 cm angeboten. Das Katheterkaliber beträgt heutzutage 4F bis 7F, was im Vergleich zu den früher verwendeten 8F-Kathetern eine kleinere Punktionsstelle und kürzere Bettruhephasen nach der Diagnostik mit geringeren Blutungskomplikationen bedingt [Krakau, 1999]. Nachteilig an den geringeren Innenlumina (Innendurchmesser: 5F: 0,045 in., 6F: 0,056 in., 8F: 0,064 in.) ist jedoch der geringere Kontrastmittelfluß und die damit verbundene geringere Kontrastierung der Koronarien [Krakau, 1999].

Nach arterieller Punktion der A. femoralis bzw. A. brachialis oder A. radialis und Einführen des Schleusenbesteckes (siehe Kapitel 2) wird der Katheter zusammen mit dem Führungsdraht, der etwa 5-10 cm aus dem Katheter herausragt, vorsichtig unter Durchleuchtungskontrolle bis zur Aorta descendens vorgeschoben. Nach Rückzug des Drahtes und Spülung des Systems erfolgt dann die Positionierung in der Aorta ascendens. Bei Kontrolle der simultan abgeleiteten Druckkurve und des EKG erfolgt mit Hilfe einer Testinjektion einer geringen Menge Kontrastmittel zur Lokalisation des Koronararterienostiums die Sondierung desselben. Bei korrekter Katheterlage wird nun per Hand Kontrastmittel mit der an eine Hahnbank angeschlossenen 10 ml-Spritze bei tiefer Inspiration des Patienten injiziert. Die Kontrastmittelmenge und die Injektionsgeschwindigkeit sollten hierbei so gewählt werden, daß sich das darzustellende Gefäß kurzzeitig komplett mit Kontrastmittel füllt bei leichtgradigem Kontrastmittelüberlauf in die Aorta während der Injektion. So sollte die Injektionsdauer ca. 1-2 s, die Kontrastmittelmenge für die rechte Koronararterie 4-8 ml, für eine Darstellung der linken Koronararterie 7-10 ml betragen [Krakau, 1999]. Eine zu zarte Injektion führt durch schlierenartige Vermischung von Blut und Kontrastmittel zu einer unzureichenden Gefäßfüllung, der Gefäßzustand läßt sich so nicht beurteilen, andererseits resultiert häufig aus einer zu kräftigen Injektion eine Dislokation des Koronarkatheters mit der Gefahr der Gefäßdissektion [Krakau, 1999]. Abschließend

oder zu Beginn der Untersuchung erfolgt über einen sogenannten Pigtail-Katheter mittels einer mechanischen Injektionspumpe die Darstellung des linken Ventrikels in zwei Ebenen.

Da, abhängig von den anatomischen Verhältnissen, bei bestimmten Röntgenprojektionen die proximalen Anteile der Koronararterien sich häufig überlappen und so nicht eindeutig zu beurteilen sind, werden bei der selektiven Koronarangiographie grundsätzlich mehrere Projektionen durchgeführt [Windecker et al., 2000]. Allerdings sollte hier sowohl aus Gründen des Strahlenschutzes als auch auf Grund der Menge des applizierten Kontrastmittels die Gesamtzahl der Injektionen und die ausgesuchten Projektionen auf Standardprojektionen beschränkt bleiben, die ggf. durch zusätzliche Projektionen ergänzt werden können.

## **1.8 Perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA)**

### **1.8.1 Technik, Indikation und Ergebnisse der PTCA von Koronarstenosen**

Die Erweiterung von stenosierten Koronararterien mittels spezieller Ballonkatheter basiert auf Arbeiten von Dotter, der 1964 in Zusammenarbeit mit Judkins erstmals ein peripheres Gefäß mit einem koaxialen Kathetersystem dilatierte. In Europa modifizierte Grünzig das einzuführende Ballonkathethersystem [King, 1996]. Nach Koronardilatation im Tierversuch und Dilatationen an peripheren Arterien und Nierenarterien am Menschen wurden 1977 mit Hilfe dieser Technik die ersten 6 Koronardilatationen in Zürich und Frankfurt vorgenommen [Hurst, 1986; Grünzig et al., 1979]. Das Verfahren fand außerordentliche Verbreitung, so daß mittlerweile in den USA jährlich mehr als 300.000, in Deutschland 160.000 PTCA-Eingriffe vorgenommen werden und somit die Zahl der Koronardilatationen die der Bypassoperationen inzwischen deutlich übertroffen hat [Kadel, Kober, 1995; Mannebach et al., 2000].

Als Prämedikation erfolgt vor Beginn der PTCA zur Vermeidung thrombotischer Komplikationen die intravenöse oder orale Gabe von 100-1000 mg/die Acetylsalicylsäure beginnend wenigstens einen Tag vor dem Eingriff [Schwartz et al.,

1988]. Zusätzlich kommt hier auch die Gabe von Ticlopidin oder Clopidogrel in Frage [White et al., 1987]. Für Patienten mit instabiler Angina Pectoris oder akutem Myokardinfarkt konnte durch die zusätzliche intravenöse Gabe eines Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten die Zahl thrombotischer Komplikationen weiter reduziert werden, allerdings auf Kosten einer erhöhten Blutungsgefahr [The EPIC Investigators, 1994]. Zusätzlich zur Acetylsalicylsäure erfolgt eine systemische Antikoagulation mit Heparin vor der Intervention mit 5000 bis 20000 U [Vainer et al., 1996; Kadel, Kober, 1995]. Zur Vermeidung von Koronarspasmen wird die orale, systemische oder intracoronare Gabe von Nitraten oder Kalziumantagonisten vor oder während der PTCA empfohlen.

Nach Lagerung des Patienten auf dem Untersuchungstisch erfolgt wie in Kapitel 2 beschrieben der arterielle Zugang über die A. femoralis (Technik nach Judkins), wobei hier aber auch alternativ das Vorgehen über die rechte oder linke A. brachialis (Technik nach Sones) bzw. A. radialis möglich ist. Nach erfolgreicher Punktion und Einbringen des Schleusensystems erfolgt in der Regel die angiographische Darstellung der Koronararterien und eventueller Bypassgefäße, um sich über den aktuellen Koronarzustand Klarheit zu verschaffen. Nun wird mit Hilfe eines großlumigen 5F-7F-Führungskatheters das Ostium des interventionsbedürftigen Gefäßes sondiert und nach Darstellung des stenosierten Segmentes zumindest in zwei Ebenen ein flexibler Führungsdraht von 0.010-0.018 Zoll Durchmesser durch die Stenose in den distalen Gefäßabschnitt gelegt. Anschließend wird ein Ballonkatheter über den Führungsdraht in die Stenose geführt und mit variablem Druck bis 24 bar vollständig entfaltet, so daß die durch die Stenose hervorgerufene Kerbe im Ballon unter Röntgenkontrolle verstreicht. Dieses erfolgt über 10-120 s bis pectanginöse Beschwerden, ST-Streckenveränderungen oder Rhythmusstörungen den Inflationsvorgang limitieren. Für die Lumenerweiterung scheinen drei Hauptmechanismen verantwortlich zu sein: Zum einen die Zunahme des äußeren Gefäßdurchmessers durch Überdehnung der Gefäßwand, die Plaquekompression durch den Ballonkatheter und sogar der Plaqueeinriß mit Einriß der Intima im Sinne einer Dissektion [Puma et al., 1995]. Wurde durch ein- oder mehrmalige Dilatation des betroffenen Segments die Stenose beseitigt, werden nacheinander Ballonkatheter und Führungsdraht entfernt und nach angiographischer Kontrolle des Dilatationsergebnisses die Intervention beendet. Die in der A. femoralis

oder den alternativen Zugangswegen platzierte Schleuse wird nach Abklingen der systemischen Antikoagulation nach etwa 4 Stunden entfernt [Kadel, Kober, 1995] die Punktionsstelle wird mit einem Druckverband versorgt.

Bei der Koronardilatation kommen zur Zeit drei verschiedene Techniken [Kadel, Kober, 1995] zur Anwendung: Zum einen die Langdrahttechnik, wobei ein zweilumiger Ballonkatheter über seine ganze Länge über einen 3 m langen Draht geführt wird. Die heute am häufigsten eingesetzte Monorail-Technik verwendet einen vergleichsweise kurzen Führungsdraht (ca. 175 cm) über den nur die proximalen 20-30 cm des Ballonkatheter geführt wird. Dabei kann das Vorschieben des Ballonkatheters ohne Durchleuchtungskontrolle geschehen, außerdem ist das System im Gegensatz zur Langdrahttechnik für einen einzelnen Untersucher einfacher zu handhaben. Bei beiden Techniken kann der Führungsdraht bei Auswechseln des Ballonkatheters in Position verbleiben, so daß die Stenose nach Ballonkatheterwechsel nicht neu sondiert werden muß. Als drittes System wird das „fixed-wire“-System angeboten, das aus einem Ballonkatheter mit integriertem, 1,5-2 cm langen, von außen steuerbarem Führungsdraht an der Katheterspitze besteht. Durch die Möglichkeit, die Einheit Ballon / Führungsdraht direkt in die Stenose vorzuschieben, wird die Durchleuchtungszeit weiter reduziert, allerdings mit dem Nachteil, bei unzureichendem Dilatationserfolg das komplette System auswechseln zu müssen, was insbesondere bei Dissektionen, oder Gefäßverschlüssen von Nachteil ist. „Fixed-wire“-Systeme werden heute nur noch in seltenen Ausnahmefällen eingesetzt.

Die Ballondurchmesser betragen je nach Fabrikat zwischen 1,5 – 4,0 mm in Ballonlängen von 1 – 4 cm. In Abhängigkeit vom Material ist der Ballon dehnbar („compliant“), so daß bei zunehmendem Druck der Ballondurchmesser etwas zunimmt, oder nicht dehnbar unter Wahrung des Durchmessers, selbst unter hohen Dilatationsdrücken. Die heute zumeist eingesetzten Ballone sind „semi-compliant“.

Definitionsgemäß ist ein Akuterfolg einer PTCA die Reduktion der Stenose auf unter 50% des Gefäßdurchmessers ohne gravierende Komplikationen wie z.B. Myokardinfarkt, notfallmäßige Bypassoperation oder Tod. Dieser Akuterfolg tritt heutzutage bei mehr als 90% der Fälle ein [Reifart, 1993; Hannan et al., 1992; Detre et

al., 1988]. Bei etwa einem Drittel der Fälle wird nach der Dilatation eine Dissektion beobachtet [DeFeyter et al., 1991], die über die Bildung eines intraluminalen Thrombus zu einem Gefäßverschuß während oder unmittelbar nach der PTCA führen kann. Die Dissektion ist die Hauptursache für schwere Komplikationen, die in ca. 3% der Fälle auftritt. Die Mortalität betrug in Studien etwa 0,3-0,6% [Harmjanz et al., 1994], häufiger ist mit 1-2% die Rate von Myokardinfarkten und mit 0,3-1,7% die Rate notfallmäßiger Bypassoperationen [Hannan et al., 1992]. Zu den Faktoren, die die Erfolgs- und Komplikationsrate beeinflussen, zählen neben der Stenosemorphologie patientenbezogene Faktoren wie Alter, Geschlecht, kardiale und nichtkardiale Begleiterkrankungen, linksventrikuläre Funktion und klinische Präsentation der koronaren Erkrankung und nicht zuletzt die Erfahrung des Untersuchers [Jollis et al., 1994]. Die Komplikationsrate der PTCA ließ sich in den letzten Jahren durch die häufige Implantation von Koronarstents deutlich senken.

Bei der Indikationstellung zur PTCA müssen neben Symptomatik des Patienten, der funktionelle Befund, die koronare Anatomie und Stenosemorphologie und nicht zuletzt die linksventrikuläre Funktion und der Allgemeinzustand des Patienten in Betracht gezogen werden [Kober, 1990]. Grünzig postulierte 1979 die klassische PTCA-Indikation bei Patienten mit Angina Pectoris-Symptomatik trotz medikamentöser Therapie. Bei asymptomatischen Patienten ist die PTCA nur bei eindeutigem, reproduzierbarem elektrokardiographischem oder nuklearmedizinischem Ischämienachweis indiziert. Eine Koronardilatation sollte generell in Abwägung von Erfolgchancen, Nutzen und Risiken nur bei Vorliegen von ein, zwei, oder in Ausnahmefällen auch mehreren dilatierbaren und hämodynamisch wirksamen Stenosen in Betracht gezogen werden [Kadel, Kober, 1995].

## **1.9 Kontrastmittel**

### **1.9.1 Übersicht über die heute verwendeten Röntgenkontrastmittel**

Die derzeit verwendeten wasserlöslichen Röntgenkontrastmittel besitzen als gemeinsame Grundstruktur alle einen symmetrisch substituierten Trijodbenzolring, mit

Jod als röntgenkontrastgebender Substanz. Für die diagnostische und interventionelle Kardiologie stehen sowohl ionische als auch nicht ionische Kontrastmittel zur Verfügung.

Die älteste Kontrastmittelgeneration stellen die ionischen Kontrastmittel dar, sie dissoziieren in wässriger Lösung in eine jodtragende Säure (Anion) und eine kontrastfreie Base (Kation). Alle ionische Kontrastmittel, wie zum Beispiel Diatrizoat, Ioxitalmat und Iothalamat, zeichnen eine hohe Osmolarität aus, durch die es zu Flüssigkeitsverschiebungen kommt. Eine Ausnahme bildet das nieder-osmolare ionische Kontrastmittel Ioxaglat, welches aus zwei dimer verknüpften Trijodbenzolringen besteht.

Nichtionische Kontrastmittel hingegen besitzen eine deutlich niedrigere Osmolarität, tragen [Krakau, 1999] im Gegensatz zu oben genannten keine elektrische Ladung und sind hydrophiler als ionische Kontrastmittel. Im Vergleich zu Blut, dessen Osmolarität 290 mosm/kg Wasser beträgt, sind jedoch auch diese, wie die meisten in der Kardiologie verwendeten Kontrastmittel, hyperton. Nichtionische Kontrastmittel besitzen im Gegensatz zu ionischen Kontrastmittel auf Grund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften eine wesentlich bessere Allgemeinverträglichkeit und zeichnen sich durch eine geringere Zahl an Nebenwirkungen aus [Krakau 1999].

Allen in der Kardiologie verwendeten Kontrastmitteln gemeinsam ist die Notwendigkeit eines ausreichend hohen Iodgehalts von mindestens 300 mg/ml, um eine gute Kontrastierung der Koronararterien zu gewährleisten. Gleichzeitig muß, um einen ausreichenden Fluß durch die heutzutage verwendeten Katheter mit geringem Innendurchmesser (siehe oben) sicherzustellen, die Viskosität möglichst gering sein. Da die Viskosität temperaturabhängig ist, sollten Kontrastmittel nur bei ca. 37°C appliziert werden.

## **1.9.2 Nebenwirkungen der verwendeten Kontrastmittel**

Wie bereits oben erwähnt, ist die Verträglichkeit eines Kontrastmittels u.a. von Osmolarität, Ionengehalt [Simon, Lins, 1999] und der Viskosität abhängig. Bekannte

Nebenwirkungen von Kontrastmitteln sind z.B. immer noch schwere Unverträglichkeitsreaktionen, die über Freisetzung vasoaktiver Substanzen, wie z.B. Histamin, [Windecker et al., 1999] Komplementaktivierung und Veränderungen im Histamin-Kallikrein-Metabolismus getriggert werden. Symptome dieser anaphylaktischen Reaktion, wie Urtikaria, Flush, Bronchospasmus und Glottisödem, ähneln der klassischen IgE-vermittelten Anaphylaxie. Auswirkungen können sich aber auch mit ST-Strecken-Veränderungen, Rhythmusstörungen, bis hin zum Herzstillstand [Simon et al., 1989] zeigen. Unter der Gabe von Kontrastmitteln kann es zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion bis hin zum akuten Nierenversagen kommen. Die meisten Nebenwirkungen sind Folge hoher Osmolarität und werden demnach bei dem Einsatz ionischer Kontrastmittel häufiger beobachtet. Bei vorausgegangenem Kontrastmittelreaktionen ist zur Vermeidung einer erneuten Unverträglichkeitsreaktion eine Prämedikation mit H<sub>1</sub>- und H<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten 5-10 min vor Kontrastmittelgabe anzuraten [Lautin et al., 1991]. Für eine effektivere Prophylaxe kann zusätzlich eine mehrmalige Kortikosteroid-Applikation von 40 mg Methylprednisolon oral 24, 12 und 2 Stunden vor Untersuchungsbeginn zum Einsatz kommen [Lasser, 1988]. In letzter Zeit wird den kontrastmittelinduzierten thrombotischen Komplikationen vermehrt Augenmerk geschenkt, wobei es scheint, daß die thrombotischen Komplikationen bei ionischen Kontrastmitteln seltener beobachtet wurden [Stormorken et al., 1986]. Wünschenswert wäre hierbei eine systematische Charakterisierung der verfügbaren und eingesetzten Kontrastmittel, um mit Hilfe neuer Erkenntnisse über Interaktion von Thrombozyten, Gefäßwand sowie anderer korpuskulärer Blutbestandteile des Blutes den differenzierten Einsatz von Kontrastmitteln zu gewährleisten. In Zukunft könnten dann so z.B. Hochrisikopatienten, Patienten mit geplanter Stentimplantation etc. durch die Wahl des geeignetsten Kontrastmittel optimal versorgt werden.

## **1.10 Zielsetzung der Arbeit**

In letzter Zeit wurde die Rolle der derzeit verwendeten Röntgenkontrastmittel und ihre Bedeutung in der Entstehung akuter Koronarthrombosen während der PTCA kontrovers diskutiert. In-vitro Daten zeigen, daß nichtionische Kontrastmittel direkte prothrombotische Effekte auf die Hämostase haben und so z.B. das Risiko einer

Koronarthrombose während Koronarangiographie bzw. PTCA erhöhen könnten. Mit den vorliegenden, teils widersprüchlichen in-vivo Studien läßt sich die Frage, ob und in wie weit nichtionische Kontrastmittel zu einer Thrombozytenaktivierung führen, nicht beantworten, so daß es angeraten scheint, durch weitere Studien zu einer Klärung der Frage beizutragen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen nun drei nichtionische Kontrastmittel, die Monomere Iohexol (Accupaque<sup>®</sup>) und Iopentol (Imagopaque<sup>®</sup>), sowie das dimer verknüpfte nicht ionische Kontrastmittel Iodixanol (Visipaque<sup>®</sup>) auf ihr thrombogenes Potential untersucht und miteinander verglichen werden.



## 2 Material und Methoden

Alle in diesem Kapitel nicht aufgeführten Materialien, Chemikalien, Lösungen und Antikörper sind im Anhang in Kapitel 7 erwähnt.

### 2.1 Patientenrekrutierung und Auswahlkriterien

Für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen wurden systematisch alle konsekutiven Patienten, die der Medizinischen Klinik und Poliklinik C der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster zur Durchführung einer elektiven PTCA oder Koronarangiographie zugewiesen wurden, auf Ausschlußkriterien für die Studienteilnahme geprüft und ggf. um schriftliches Einverständnis für die Studienteilnahme gebeten. Die Deklaration von Helsinki wurde bei den Untersuchungen eingehalten; das Votum der Ethikkommission lag vor. Ausgeschlossen wurden folgende Patienten, bei denen von einer Thrombozytenhypo- bzw. Hyperreagibilität auszugehen war. (Tab. 2.1)

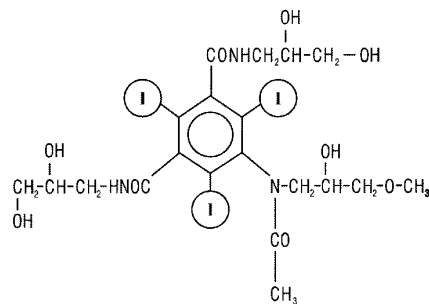
Tab. 2.1 Ausschlußkriterien für die Studienteilnahme

Ausschlußkriterien
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ <b>Instabile Angina Pectoris</b></li><li>▪ <b>Myokardinfarkt</b> und/oder <b>Lysetherapie</b> in den letzten 4 Wochen vor geplanter Intervention</li><li>▪ <b>Effektive Antikoagulation</b> mit Heparin oder Phenprocoumon (Marcumar®)</li><li>▪ Medikation mit <b>Thrombozytenaggragationshemmern</b>, wie z.B. Ticlopidin (Tyklid®), periinterventionelle Gabe von Abciximab (ReoPro®)</li><li>▪ <b>Hereditäre Thrombozytenrezeptordefekte</b> (z.B. M. Glanzmann, Storage-Pool-Disease, oder Bernard–Soulier-Syndrom)</li><li>▪ <b>Extrakorporale Kreisläufe</b> (Dialyse)</li><li>▪ Bekannte <b>Kontrastmittelgabe in den zurückliegenden 7 Tagen</b></li><li>▪ Bekannte <b>Lebererkrankung</b>, z.B. Hepatitis</li><li>▪ <b>Hämatologische Systemerkrankungen</b> (Zytostatikatherapie)</li></ul>

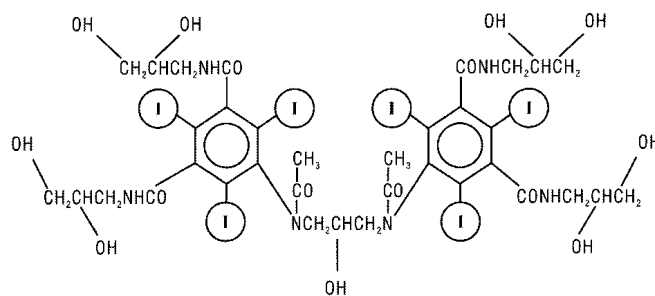
Nach Auswahl der Patienten erfolgte eine Charakterisierung der Patienten durch Anamneseerhebung, Erfassung des kardiovaskulären Risikoprofils, relevanter Begleiterkrankungen, derzeitiger Medikation und Art des betroffenen Gefäßsegmentes bei Vorhandensein entsprechender Voruntersuchungen. Entsprechende Datenerhebungsbögen wurden in der Medizinischen Klinik und Poliklinik – Innere Medizin C - bereits mehrfach verwendet. Nach schriftlicher Zustimmung der Patienten erfolgte randomisiert und für den Untersucher geblendet die Zuordnung der Patienten zu den einzelnen Kontrastmitteln Iodixanol (Visipaque<sup>®</sup>), Iopentol (Imagopaque<sup>®</sup>) und Iohexol (Accupaque<sup>®</sup>) (Abb. 2.1; Tab. 2.2). Jeder der 3 Gruppen wurden sowohl für die PTCA als auch für die Koronarangiographie 10 Patienten zugeordnet (Tab. 2.3, 2.4).

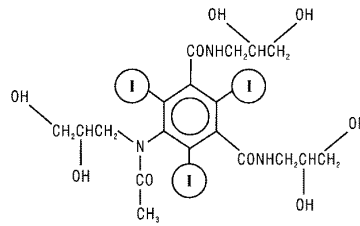
Abb. 2.1 Strukturformeln der verwendeten Kontrastmittel [Fachinformation Nycomed, Amersham]

a) Iopentol



b) Iodixanol





c) Iohexol

Tab. 2.2 Iodgehalt, Osmolarität und Viskosität der Kontrastmittel [Fachinformation Nycomed, Amersham]

	Iodgehalt (mg/ml)	Osmolarität (mOsm/kg H <sub>2</sub> O)	Viskosität (mPa • s) 37°C
Iopentol	350	810	12,0
Iodixanol	350	290	17,7
Iohexol	350	820	10,5

Tab. 2.3 Patientencharakteristika Koronarangiographie

Kontrastmittel	Iopentol	Iodixanol	Iohexol
<b>Patientenzahl (n)</b>	10	10	10
<b>Alter [a]</b>	65 (±4,4)	60 (±13,4)	64 (±11,7)
Maximum	74	82	80
Minimum	49	43	31
<b>Geschlecht:</b>			
männlich	3	4	4
weiblich	7	6	6
<b>Medikation</b>	∅	∅	∅

Tab. 2.4 Patientencharakteristika PTCA

<b>Kontrastmittel</b>	<b>Iopentol</b>	<b>Iodixanol</b>	<b>Iohexol</b>
<b>Patientenzahl (n)</b>	10	10	10
<b>Alter [a]</b>	59 ( $\pm 11,1$ )	60 ( $\pm 10,7$ )	60 ( $\pm 9,5$ )
Maximum	75	77	78
Minimum	39	41	46
<b>Geschlecht:</b>			
männlich	5	6	6
weiblich	5	4	4
<b>Medikation</b>	1), 2), 3)	1), 2), 3)	1), 2), 3)

- 1) 100U/kg KG Heparin i.v.
- 2) 1 mg Acetylsalizylsäure i.v.
- 3) 0,2 mg Nitro i.c. b. Bedarf

## 2.2 Probenabnahme

Am Tag nach der Auswahl wurde bei den Patienten die PTCA bzw. die Koronarangiographie durchgeführt:

Nach Lagerung des Patienten auf dem Untersuchungstisch, steriler Abdeckung, Desinfektion der Punktionsstelle und Lokalanästhesie, erfolgte unter aseptischen Bedingungen die Punktion der A./V.femoralis nach Seldinger mittels einer Angiographie-Nadel durch den Untersucher. Während die Nadel entsprechend positioniert gehalten wurde, führte der Untersucher das flexible Ende des Führungsdrahtes durch die Kanüle in das Gefäß, bis zur gewünschten Position, vor. Der Führungsdraht wurde nun gehalten, die Nadel zurückgezogen, die Punktionsstelle abgedrückt und die mit heparinisierte, isotoner Kochsalzlösung gespülte Einheit Schleuse/Dilatator über den Führungsdraht in das betreffende Gefäß geschoben, wobei

für die A.femoralis ein 6F (French), für die V.femoralis ein 5F-System zum Einsatz kam. Der Gefäßdilator wurde nun durch Lösen eines Einrastmechanismus am Ende der Schleuse zusammen mit dem Führungsdraht dem Gefäß entnommen und, zum Entfernen von Luft, über einen Seitenarm der Schleuse Blut aspiriert. Das hieraus gewonnene venöse Blut wurde verworfen und nun erneut Blut mittels zweier 10ml Natrium-Citrat-Monovetten [Sarstedt] nacheinander über einen Multiadapter [Sarstedt] langsam, unter Wahrung der Sterilität, aspiriert. Die 0,11 M Natriumcitratlösung, 1:10 mit Vollblut gemischt, verhindert die Gerinnung des Vollblutes durch Komplexbildung zweiwertiger Ionen, wie z.B.  $\text{Ca}^{2+}$  durch das Citrat. Es sollte durch die Blutentnahme selbst nicht zu einer artefiziellen Thrombozytenaktivierung kommen. Voraussetzung hierfür war, daß die Blutentnahme gleichermaßen standardisiert und schonend vorgenommen wurde. Für die Punktionsnadel war ein möglichst scharfer Schliff bei großem Innendurchmesser und geringer Gesamtlänge zu fordern, das Probenvolumen und die Entnahmezeit sollten so gewählt werden, daß die Transmissionszeit einer Zelle vom Gefäßlumen bis zur Stabilisatorlösung unter 1 Sekunde liegt [Tschöpe D., Markeranalyse und Funktionstests an Thrombozyten]. Für das hier verwendete Punktionsbesteck waren diese Voraussetzungen erfüllt.

Dann erfolgte die PTCA / Koronarangiographie in der Technik nach Judkins, unter Verwendung eines der drei zu charakterisierenden o.g. Kontrastmitteln, wobei deren prozedurale Durchführung unabhängig von der Studie verlief. Routinemäßig wurden dem Patienten während einer PTCA 100 U/kg KG (ca. 10.000 U) Heparin i.v., 1 g Acetylsalizylsäure (Aspisol<sup>®</sup>) i.v., sowie bei Bedarf 0,2 mg Nitro i.c. verabreicht. Während einer Koronarangiographie wurde keine Medikation gegeben. Abschließend erfolgte eine erneute Blutentnahme von 20 ml Natriumcitrat-Vollblut aus der venösen Schleuse. Die Blutproben wurden umgehend und schonend in das Labor transportiert, so daß spätestens 30 Minuten nach Abnahme mit der Präparation begonnen werden konnte.

### **2.3 Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP)**

Für einen Teil der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente war das plättchenreiche Plasma (PRP) das Ausgangsmaterial. Hierzu wurde je eine 10 ml Monovette venösen

Citratblutes vor PTCA oder Koronarangiographie und Kontrastmittelinjektion, sowie die korrespondierende Monovette nach PTCA bzw. Koronarangiographie, nach erfolgter Kontrastmittelgabe bei  $260 \times g_e$  für 10 min zentrifugiert. Dabei wurde das Blut in zwei Phasen getrennt, wobei sich in der unteren Schicht Erythrozyten und Leukozyten absetzten, in der oberen befand sich das plättchenreiche Plasma (PRP), welches vorsichtig, ohne die Grenzschicht aufzuwirbeln, abpipettiert wurde. Der in der Monovette verbleibende Rest wurde bei  $1850 \times g_e$  für 10 min zentrifugiert, und in Reagiergefäße [Sarstedt] von 1.5 ml fraktioniert bei  $-80^\circ\text{C}$  für eventuell weiterführende Untersuchungen des Labors verwahrt. Für den weiteren Versuchsablauf wurde mit einer Thrombozytensuspension von 2 ml mit konstanter Thrombozytenzahl von 25.000 Thrombozyten (TZ)/ $\mu\text{l}$  PRP gearbeitet. Hierzu mußte die Thrombozytenzahl des PRP mit Hilfe eines Zellzählers bestimmt und die Thrombozytenkonzentration entsprechend durch Verdünnung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei pH 7,8 eingestellt werden. Es wurden  $40\mu\text{l}$  des frisch gewonnenen PRP in 10ml Thrombozytenverdünnungslösung [BioChem ImmunoSystems] gegeben und die Zelldifferenzierung mit Hilfe der unterschiedlichen Leitfähigkeiten der verschiedenen Zelltypen in der Thrombozytenverdünnungslösung durch den Zellzähler vorgenommen.

## **2.4 Durchflußzytometrie**

### **2.4.1 Aufbau und Funktionsweise eines Durchflußzytometers**

Bei dem Durchflußzytometer handelt es sich um ein optisches Meßsystem, das es erlaubt, Streulicht- und Fluoreszenzsignale von Einzelzellen, die sich in konstantem Fluß an einen Laserstrahl vorbei befinden [Michelson, 1996], zu analysieren und z.B. Veränderungen der aktivierten Thrombozytenoberfläche zu erfassen. Das Streulicht und die Intensität der Fluoreszenz wird durch spezielle Photodioden registriert. Hierbei kann die Größe (Vorwärtsstreulicht, „forward angle light scatter“ FSC), die Granularität (Seitwärtsstreulicht, „side scatter“ SSC) und die Oberflächenexpression von Antigenen nach Bindung fluorochrommarkierter Antikörper bestimmt werden [Tschöpe, Schwippert, 1997], wobei unter Verwendung verschiedener Fluorochrome unterschiedlicher Lichtfrequenzspektren mehrere funktionelle Veränderungen der

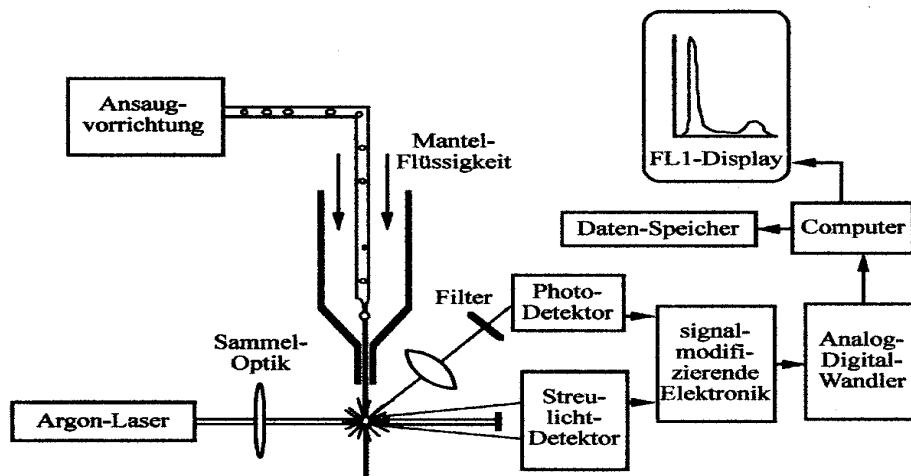
Thrombozytenmembran gleichzeitig detektiert werden können [Gawaz, 1999]. Als Lichtquelle wurde bei dem in dieser Arbeit verwendeten FACScan [Beckton Dickison] ein Argon-Laser benutzt, wobei in Abhängigkeit von der Gasfüllung des Lasers nur monochromatisches Licht einer bestimmten Wellenlänge, in unserem Fall 488nm, emittiert wurde. Mit Licht dieser Wellenlänge konnten alle in Tab. 2.3 aufgeführten Fluorochrome angeregt werden. Fluoreszierende Verbindungen (Fluorochrome) absorbieren hierbei Lichtenergie über einen weiten, aber jeweils charakteristischen Wellenlängenbereich. Die absorbierte Lichtenergie hebt die Elektronen auf ein höheres Energieniveau, beim Rücksprung auf das Ausgangsniveau emittiert das Elektron ein Photon. Hierbei geht ein Teil der Energie in Form von Wärme verloren, „Fluoreszenz“ kennzeichnet diesen Übergang. Die Frequenz, bei der die Verbindung angeregt wird, ist das jeweils charakteristische Exitationsspektrum, welches ungefähr dem Absorptionsspektrum entspricht. Das bei Rücksprung zum Grundniveau emittierte Licht entspricht dem Emissionsspektrum und ist wegen des Energieverlusts stets energieärmer und damit langwelliger als das Ausgangslicht [Raffael, 1988].

Tab 2.5 In dieser Arbeit verwendete Fluorochrome der Durchflußzytometrie

Fluorochrom	Absorption (nm)	Emission (nm)
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	488	530
Phycoerythrin (PE)	492	580
Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP)	488	680

Damit die zu analysierenden Zellen, einzeln, wie Perlen auf einer Perlenkette den Meßpunkt passieren, ist ein Vorgang, die „hydrodynamische Fokussierung“ erforderlich [Tschöpe, Schwippert, 1997]. Hierbei werden die Blutzellen mit Hilfe eines Mantelstromes zentral ausgerichtet. (Abb. 2.2)

Abb. 2.2 schematische Darstellung des Aufbaus eines Durchflußzytometers, modifiziert [Wheeless, 1991]



Durch das optische System werden die Zellen gleichermaßen angeregt und detektiert. Das Laserlicht wird zunächst durch Linsen und prismatische Strahlenexpander auf einen ausreichend großen Durchmesser im Meßpunkt aufgefächert. Nach Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle wird nun in einem Bereich das Vorwärtsstreulicht, in einem zweiten Bereich das Seitwärtsstreulicht und die Fluoreszenz gemessen. Mittels Lichtsammeloptik, Blenden, Strahlenteiler, dichroitische Filter, Bandpaß- und Kantenfilter ( Abb. 2.2) wird Seitwärtsstreulicht vom Fluoreszenzlicht getrennt und die Fluoreszenz in die einzelnen Farbbereiche aufgetrennt [Raffael, 1988 ].

Durch Photodioden und Photoröhren werden die optischen Signale in elektrische Impulse umgewandelt. Um nun Störsignale von echten Zellsignalen zu unterscheiden wird mit Hilfe einer elektrischen Schwelle (Threshold) ein echtes Signal „definiert“, das sich auf einen Auslöseparameter (Trigger) bezieht (z.B. Vorwärtsstreulicht). Ein Analog-/Digitalwandler konvertiert nun die in Volt gemessene Spannungszahl in eine Klassenzahl. Hierbei konnten Werte von 0 bis 1023 (1024-Klassenauflösung) angenommen werden. Die Meßwerte der Einzelzellen werden in der Reihenfolge gespeichert, in der sie den Meßpunkt passieren. So wird die ursprüngliche Korrelation für die Datenauswertung bewahrt. Dargestellt werden die Meßdaten in der Histogramm-



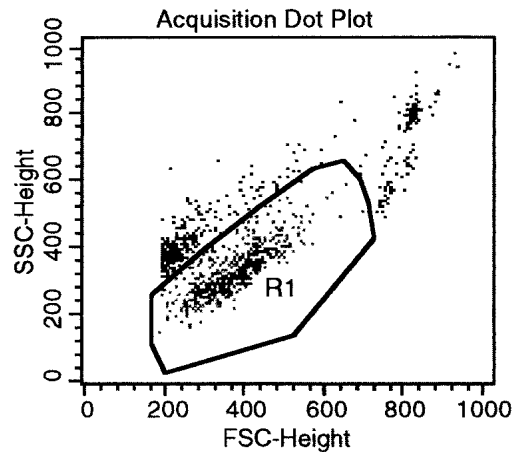
oder Häufigkeitsverteilung. Im Histogramm sind die Anzahl der Zellen (Ordinate) gegen die Klassen (Abzisse) aufgetragen (Abb. 2.4), wobei der Signalunterschied zweier Klassen von der Wahl des Verstärkers – linear oder logarithmisch – abhängig ist. Kleine Zellen, wie z.B. Thrombozyten werden im logarithmischen Modus gemessen, da für die optimale Auflösung der erfassten Zellpopulation schwache Signale gespreizt und starke Signale komprimiert werden. Große Zellen, wie z.B. Leukozyten werden im linearen FSC- bzw. SSC-Modus gemessen, da hier die stärkeren Signale gespreizt und hierdurch besser aufgelöst werden.

Mit der Zweiparameterdarstellung läßt sich die Relation zweier Zelleigenschaften einer Zellpopulation zueinander darstellen. Stellt man beispielsweise das Vorwärtsstreulicht (FSC) gegen das Seitwärtsstreulicht (SSC) („Dot Plot“) dar, lassen sich aus einer Leukozytenprobe Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten anhand ihres spezifischen Musters der Punktwolke identifizieren [Schmitz, Rothe, 1994; Raffael, 1988]. Über verschiedene Fluoreszenzkanäle (FL1- FL3) konnten bis zu drei verschiedene Fluorochrome (FITC, PE und PerCP) einbezogen werden.

## **2.4.2 Durchflußzytometrische Messung der Zellpopulation**

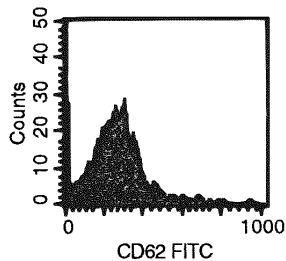
Bei der Messung war es wichtig, Zelltrümmer, andere Zellarten und Zellaggregate von den interessierenden Zellen zu trennen. Hierzu begann jede Messung mit der Analyse der physikalischen Eigenschaften aller Zellen der Probe im „Dot plot“-Diagramm für den FSC und SSC. Dabei erschien jeder Partikel (z.B. Thrombozyt) als ein Punkt, dessen Lage von der Größe des entsprechenden Streulichtimpulses abhing. Aufgrund der spezifischen Eigenschaften der Blutzellen entstand immer ein Bild mit typisch angeordneten Populationen. (Abb. 2.3). Während kleinere Populationen unten links überwiegend Thrombozyten darstellen, verkörpern die größeren Populationen Leukozyten und Assoziante. Es ist möglich, bei der Analyse nur Thrombozyten zu analysieren, dazu wurde im „Dot-plot“-Diagramm eine polygonale Linie um die Thrombozytenpopulation gezogen. Dieser Vorgang des Eingrenzens, das sogenannte „Gating“, berücksichtigt nur die in solch einem Fenster liegenden Ereignisse.

Abb. 2.3 Darstellung der Thrombozytenpopulation im „Dot-Plot“ für den FSC und SSC im Gate R1



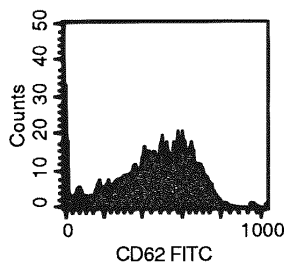
In unsere Auswertung gingen Meßwerte der Fluoreszenzintensität von jeweils 2000-10.000 Einzelzellen umfassenden Stichproben mit ein. Diese Stichproben erfüllten allerdings nicht die Kriterien einer Normalverteilung (s. Abb. 2.4), so daß die aus der Auswerteeinheit berechneten und für die Charakterisierung quantitativer, nicht normalverteilter Variablen geeigneten Medianwerte der Fluoreszenzintensität verwendet wurden. Anhand dieser Medianwerte der Stichproben der Thrombozyten-, Monozyten-, Erythrozyten-, bzw. Assoziatmessung mit den entsprechenden Antikörpern, konnten Informationen über Relativzahlen bzw. prozentuale Anteile aktivierter Thrombozyten und Leukozyten, Assoziationsraten etc. gesammelt werden (Abb. 2.4).

**Abb. 2.4** beispielhafte Darstellung einer Meßreihe im Histogramm für die Fluoreszenz 1 (CD62-FITC). Die Abzisse gibt die Fluoreszenzintensität der Verteilung, die Ordinate die Anzahl der Zellen pro Klasse an. Nebenstehend finden sich die statistischen Parameter der Verteilung.



Log Data Units: Channel Values  
 Tube: 0 U/ml Thrombin Panel: Alpha Granula Sekretion  
 Acquisition Date: 11-Jan-99 Total Events: 4000  
 X Parameter: FL1-H CD62 FITC (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Median
All	0, 1023	4000	100.00	100.00	240.75	44.06	245.00



Log Data Units: Channel Values  
 Tube: 0.3 U/ml Thrombin Panel: Alpha Granula Sekretion  
 Acquisition Date: 11-Jan-99 Total Events: 4000  
 X Parameter: FL1-H CD62 FITC (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Median
All	0, 1023	4000	100.00	100.00	470.01	34.38	488.00

### 2.4.3 Probenvorbereitung für Untersuchungen im Vollblut

Für die Bestimmung von Aktivierungsparametern auf Thrombozyten und Leukozyten ex vivo und nach in-vitro Thrombinaktivierung, sowie der Thrombozyten-Leukozyten-assoziationsrate wurde Citratblut von Patienten vor und nach Gabe des zu analysierenden Kontrastmittels bzw. PTCA innerhalb einer Stunde bearbeitet.

Um eine Schädigung der zu untersuchenden Zelltypen zu vermeiden, wurde eine nahezu zell-unschädliche Fixierung angewandt. Erst nach dieser Fixierung durfte eine Lyse der Erythrozyten erfolgen, da andernfalls die Thrombozyten durch das aus den Erythrozyten freigesetzte ADP artifiziell aktiviert würden.

Aliquots von jeweils 500µl Citrat-Vollblut wurden vor Thrombinaktivierung in-vitro mit 125mM GPRP [Bachem] versetzt. Durch GPRP, einem Tetrapeptid, aus den Aminosäuren Glycin, Prolin, Arginin und Prolin, das die Fibrinpolymerisation

verhindert, wird es ermöglicht, Thrombozyten nach Thrombinaktivierung als Einzelzellsuspension zu untersuchen [Michelson, 1993]. Nach 10 min. erschütterungsfreier Zellaktivierung bei RT wurden die Zellen für 30 min mit 0,4%iger Formaldehydlösung [Roth] im Verhältnis 1:1 fixiert. Durch einmaliges Waschen der Vollblutproben mit 2ml Tyrode-Puffer und anschließender Zentrifugation bei 540 x g<sub>e</sub> für 10 min bei RT wurde das Fixativ entfernt. Der überschüssige Puffer wurde nun abgesaugt und jeweils 100µl für die Antikörpermarkierung verwendet.

Die Markierung der Zellen im Citrat-Vollblut mit aktivierungsspezifischen Antikörpern erfolgte für 45 min unter leichter Bewegung der Proben. Die Entfernung überschüssiger Markersubstanzen erfolgte mit 2ml Tyrode-Puffer und Zentrifugation bei 540 x g<sub>e</sub> für 10 min bei RT. Nach dem Absaugen der Röhrchen, bis auf ein am Grund des Gefäßes verbleibendes Pellet erfolgte die Lyse der Erythrozyten. Als Lysereagenz wurde Lyse and Fix IOTest [Immunotech] verwendet und mit PBS pH 7.4 1:25 verdünnt. Die Proben wurden mit 1ml verdünntem Lysereagenz versehen und ca. 5 sec mittels eines Minishaker gemischt. Das Lysereagenz wurde so lange auf den Vollblutproben belassen bis sie kirschrot-klar wurden. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit 2ml Tyrode-Puffer und entsprechender Zentrifugation (s.o.) waren die Proben messbereit.

#### **2.4.4 Probenvorbereitung für Untersuchungen des PRP**

PRP wurde, wie oben beschrieben auf 25.000 Thrombozyten pro µl eingestellt und Aliquots von jeweils 500µl wurden mit 1,25mM GPRP versetzt. Die Aktivierungsreaktion wurde durch Zugabe von 1%iger Formaldehydlösung [Roth] im Verhältnis 1:1 abgestoppt und die Zellen für 30 min bei RT inkubiert bzw mit 2,5U/ml Hirudin [american diagnostica inc./Loxo] gestoppt. Das überschüssige Fixativ wurde mit 2ml Tyrode und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 870 x g<sub>e</sub>, RT und anschließendem Absaugen entfernt.

## **2.4.5 Detektion der Thrombozytenaktivierung**

Die Durchflußzytometrie ermöglicht es, Thrombozytenaktivierung durch Veränderungen der Membranglykoproteinen direkt oder indirekt zu detektieren. Durch Aktivierungsvorgänge ist ein Zuwachs oder eine Abnahme der Bindung von spezifischen Antikörpern auf der Thrombozytenoberfläche zu beobachten und kann als Median der mittleren Fluoreszenz angegeben werden [Kehrel et al., 1998].

### **2.4.5.1 $\alpha$ -Granula-Sekretion (CD62-Expression, TSP-1-Bindung)**

Die aktivierungsabhängige Exposition des  $\alpha$ -Granula-Membranproteins P-Selektin (CD62) auf der Thrombozytenoberfläche wurde mit Hilfe von FITC-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen P-Selektin durchflußzytometrisch detektiert. Hierzu wurde zu den fixierten Vollblutproben der FITC-konjugierte Klon CLB-Thromb/6 [Immunotech] in sättigender Konzentration von 5 $\mu$ g/ml hinzugegeben und für 45 min bei RT inkubiert.

Um die aktivierungsbedingte Sekretion von Thrombospondin-1 aus den  $\alpha$ -Granula nachzuweisen, wurde das eingangs fixierte Vollblut mit dem PE-konjugierten Klon P10 [Immunotech] in sättigender Konzentration von 2,5 $\mu$ g/ml versehen und ebenfalls für 45 min bei RT inkubiert. Bis zur durchflußzytometrischen Analyse wurden die Thrombozytenproben wie in Kap. 2.4.3 beschrieben behandelt.

### **2.4.5.2 „Dense-Bodies“-Sekretion (CD63-Expression, Mepacrine-Aufnahme und -Abgabe)**

Durch die aktivierungsabhängige Verschmelzung der „dense-bodies“-Membran mit der Thrombozytenoberfläche kommt es zur Expression von CD63 auf den Thrombozyten. Entsprechend der CD62-Markierung wurde zum Nachweis der CD63-Präsentation der FITC-markierte Klon CLB-gran/12 [Immunotech] in sättigender Konzentration von 5 $\mu$ g/ml zu den fixierten Vollblutproben hinzugefügt und ebenfalls 45 min bei RT inkubiert.

Mepacrine ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der im ruhenden Zustand innerhalb ca. einer Minute in die „dense-bodies“ der Thrombozyten eingelagert und gespeichert wird und während des Aktivierungsvorgangs in das Extrazellulärmedium abgegeben wird. Die Thrombozytenaktivierung äußert sich somit als Abnahme der Fluoreszenzintensität [Wall et al., 1995; Gawaz et al., 1993].

Die Mepacrine-Markierung der Thrombozyten erfolgte im verdünnten PRP. Eine auf 25.000/ $\mu$ l eingestellte Thrombozytensuspension wurde mit Mepacrine in einer Endkonzentration von 0,1mM 5 min bei RT vorinkubiert. Nach Aktivierung mit 0,3U/ml Thrombin für 5 min bei RT wurden die Zellen mit 1%-iger Formaldehydlösung im Verhältnis 1:1 für 30 min bei RT fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und ein Probenvolumen von 500 $\mu$ l im Durchflußzytometer gemessen. Jeweils 5000 Zellen wurden zur Messung herangezogen.

### **2.4.5.3 Spaltung und Internalisierung des Thrombinrezeptors PAR-1**

Werden Thrombozyten in vivo bzw. in vitro durch Thrombin aktiviert, so erfolgt je nach Stärke und Dauer der Aktivierung eine proteolytische Spaltung des Thrombinrezeptors PAR-1 am aminoterminalen Ende zwischen den Aminosäuren Arg41 und Ser42. Darauf folgt eine Internalisierung von PAR-1. Mit Hilfe spezifischer Antikörper lässt sich der Spaltungs- und Internalisierungszustand des Thrombinrezeptors PAR-1 ermitteln [Brass et al., 1994; Coughlin, 1993; Siess, 1997]. Der Klon SPAN12 [Immunotech] bindet nur an den ungespaltenen, intakten Thrombinrezeptor der Thrombozyten, eine aktivierungsabhängige Spaltung führt zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals.

Der Klon WEDE15 [Immunotech] dagegen ist gegen ein spaltungsinsensitives Epitop distal der Spaltungsstelle des PAR-1 gerichtet und bindet sowohl an gespaltene, als auch intakte, nicht jedoch an internalisierte Rezeptoren. Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität erklärt sich somit aus der Internalisierung von PAR-1 bzw durch Abspaltung von Membrananteilen durch Mikropartikelbildung.

Ausgangsmaterial für die Versuchsansätze zum Spaltungs- und Internalisierungszustand des Thrombinrezeptors PAR-1 war PRP. Eingestellte PRP-Proben (25.000 TZ/ $\mu$ l) wurden nicht mit Formaldehyd fixiert, sondern mit Hirudin in einer Konzentration von 2,5U/ml versehen, da die Antikörper SPAN12 und WEDE15 ihre Epitope nur an unfixierten Thrombozyten erkennen können. Hirudin ist ein spezifischer Inhibitor der Serinprotease Thrombin, der durch Anlagerung an die B-Kette des Thrombinmoleküls seine katalytische Aktivität verliert [Nowak, 1999]. Nach einmaligem Waschen mit Tyrode-Puffer und anschließendem Absaugen des Überstandes, wurden die Thrombozyten mit den PE-konjugierten Antikörpern SPAN12 bzw. WEDE15 in sättigenden Konzentrationen (2 $\mu$ g/ml) für 60 min bei RT inkubiert. Nach Entfernen der überschüssigen Antikörper waren die Proben bereit zur durchflußzytometrischen Analyse.

#### **2.4.5.4 Von Willebrand Faktor-Bindung**

Die aktivierungsabhängige Bindung des von Willebrand Faktors über die Glykoproteine GPIIb $_{\alpha}$  und GP IIb/IIIa wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 4F9 [DAKO] durchflußzytometrisch bestimmt. Fixierte Thrombozyten wurden im eingestellten PRP (25.000/ $\mu$ l) mit sättigender Konzentration (10 $\mu$ g/ml) an 4F9 für 60 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Tyrode-Puffer gewaschen und mit dem FITC-konjugierten Sekundärantikörper anti-Maus-IgG [Sigma] (1:100) für 60 min bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Tyrode-Puffer sowie entsprechender Lyse-Reaktion (s. Kap. 2.4.3) konnte die vWF-Bindung durchflußzytometrisch detektiert werden.

#### **2.4.5.5 Fibrinogenbindung**

Der GPIIb/IIIa-Komplex stellt den thrombozytären Hauptrezeptor für Fibrinogen dar. Zum Nachweis der aktivierungsabhängigen Bindung von Fibrinogen an den aktivierten GPIIb/IIIa können Antikörper gegen gebundenes Fibrinogen verwendet werden.

Hierzu diente ein FITC-gekoppelter polyklonaler Antikörper [DAKO], der den fixierten PRP-Proben in sättigender Konzentration zugesetzt, und für 45 min bei RT inkubiert

wurde. Nach Waschen der markierten Proben und anschließender Erythrozyten-Lyse (s. Kap. 2.4.3) konnte die Fibrinogen-Bindung der Thrombozyten durchflußzytometrisch detektiert werden.

## **2.4.6 In vitro-induzierte Thrombozytenaktivierung**

Mit Hilfe von  $\alpha$ -Thrombin wurde die Reaktivität und die Sekretionsfähigkeit der Thrombozyten vor und nach Applikation des jeweiligen Kontrastmittels bzw PTCA durchflußzytometrisch untersucht.

Hierzu wurden PRP bzw. Vollblutproben vor Thrombinaktivierung mit dem Peptid GPRP in einer Konzentration von 1,25mM für 5 min bei RT vorinkubiert und so die Fibrinpolymerisation weitestgehend verhindert.  $\alpha$ -Thrombin [Sigma] wurde in der Konzentration von 0,3U/ml in entsprechenden Reagiergefäßen vorgelegt. Aliquots der jeweiligen Thrombozyten-Suspensionen wurden auf die Thrombinlösung pipettiert und bei RT erschütterungsfrei für 3 min (PRP) bzw. 10 min (Vollblut) inkubiert. Anschließend wurde die Aktivierungsreaktion mit Formaldehyd bzw. Hirudin (s. Kap. 2.4.3; 2.4.4) gestoppt.

## **2.4.7 Detektion der Leukozytenaktivierung**

Der Aktivierungszustand der Monozyten und der neutrophilen Granulozyten (PMNL) wurde anhand der Oberflächenbindung von TSP-1 und der Expression von CD11b durchflußzytometrisch erfasst. Monozyten wurden mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen CD14 markiert und indentifiziert, PMNL wurden anhand ihrer charakteristischen Streulichteigenschaften im SSC identifiziert.

### **2.4.7.1 Expression von CD11b**

Die aktivierungsabhängige Expression von CD11b auf Monozyten und PMNL ist ein direkter Marker für den Aktivierungszustand der Leukozyten. Zur Bestimmung der Präsentation von CD11b-Molekülen auf der Leukozytenoberfläche wurden entsprechend fixierte Vollblutproben (s. Kap. 2.4.3) mit einem PE-markierten



monoklonalen Antikörper gegen CD11b, Klon D12 [Becton Dickinson] in sättigender Konzentration von 5µg/ml für 45min bei RT inkubiert. Um durchflußzytometrisch Monozyten von den übrigen Leukozyten unterscheiden zu können, wurden die Vollblutproben mit einem FITC-markierten monoklonalen Antikörper Klon MφP9 gegen das monozytenspezifische Antigen CD14 in sättigender Konzentration (5µg/ml) für 45 min bei RT inkubiert.

Zur Identifizierung der PMNL wurden deren charakteristische Streulichteigenschaften herangezogen, so daß auf eine spezifische Antikörpermarkierung der PMNL verzichtet werden konnte.

Anschließend wurden die Proben analog zu den Untersuchungen der Thrombozytenaktivierung weiterbehandelt (siehe Kap. 2.4.3) und durchflußzytometrisch analysiert.

#### **2.4.7.2 TSP-1-Bindung der Monozyten und PMNL**

Monozyten und PMNL können aktivierungsabhängig über spezifische Rezeptoren TSP-1 binden. Diese TSP-1-Bindung der Leukozyten konnte mit Hilfe eines spezifischen PE-markierten monoklonalen Antikörpers gegen TSP-1, Klon P10 nachgewiesen werden. Fixierte Vollblutproben wurden mit diesem Antikörper in sättigender Konzentration von 3µg/ml für 45 min bei RT inkubiert. Zur Abgrenzung der Monozyten von anderen leukozytären Zellen wurden die Proben, wie bei der CD11b-Detektion, mit anti-CD14-FITC Antikörper, Klon MφP9 inkubiert. Die Proben wurden analog weiterbehandelt und im FACS analysiert.

#### **2.4.8 In vitro-induzierte Leukozytenaktivierung**

Analog zu den aktivierungsinduzierten Thrombozytenfunktionsuntersuchungen wurden Leukozyten in Citratblutproben vor und nach Applikation des jeweiligen Kontrastmittels mit  $\alpha$ -Thrombin in vitro aktiviert. Vor Thrombinaktivierung wurden die Citratblutproben mit GPRP in einer Endkonzentration von 1,25mM für 5 min bei RT vorinkubiert, anschließend wurde  $\alpha$ -Thrombin den Proben in der Konzentration von

0,3U/ml zugesetzt und für 10 min bei RT aktiviert. Die Zellen wurden fixiert und analog Kap. 2.4.3 weiterbehandelt.

### **2.4.9 Detektion von Thrombozyten-Leukozyten-Assoziaten**

Die Assoziation von Thrombozyten mit Monozyten bzw. PMNL wurde in Citratblutproben ex vivo und nach Thrombinaktivierung in vitro durchflußzytometrisch erfasst. Zur Detektion der Thrombozyten-Leukozyten-Assoziate wurden die Thrombozyten mit einem PerCP-konjugierten monoklonalen Antikörper (Klon Beb1) gegen das Thrombozyten-spezifische Antigen GPIX (CD42a) und die Monozyten mit Hilfe eines PE-konjugierten monoklonalen Antikörper (Klon MφP9) gegen CD14 in sättigender Konzentration für 45 min bei RT nach Zellaktivierung und Zellfixierung markiert. Die PMNL wurden durch ihre im Durchflußzytometer charakteristischen Streulichteigenschaften im SSC identifiziert. Nach Detektion entsprechend CD14-positiver Zellen (Monozyten) bzw. Zellen mit PMNL-charakteristischen Streulichteigenschaften im SSC wurden CD42a-positive, mit Thrombozyten assoziierte Leukozyten „gegatet“ und deren prozentualer Anteil zur Leukozyten-Gesamtpopulation ins Verhältnis gesetzt.

#### **2.4.9.1 „Tissue-Faktor“-Bindung von Thrombozyten-Monozyten-Assoziaten**

Die „Tissue-Faktor“ (TF) Expression von Thrombozyten-Monozyten-Assoziaten wurde durchflußzytometrisch untersucht. TF wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, Monozyten und Endothelzellen sind typische Beispiele für Zellen, bei denen die Synthese von TF induzierbar ist. Eine Reihe von Mediatoren wie Endotoxin, Zytokine, Immunkomplexe und aktivierte Thrombozyten können die aktivierungsabhängige TF-Expression der Monozyten hervorrufen [Celi et al., 1994]. Zur Detektion der Thrombozyten-Monozyten-Assoziate wurden die Thrombozyten mit einem monoklonalen Antikörper gegen GP IX (anti-CD42a-PerCP, Klon: Beb1), die Monozyten mit einem PE-konjugierten, monoklonalen Antikörper gegen CD14 (Klon MφP9) markiert. Gleichzeitig wurden die Proben mit einem FITC-markierten monoklonalen Antikörper gegen „Tissue-Faktor“ (Klon: B.16/C) in sättigender

Konzentration für 30 min bei RT inkubiert. Bis zur durchflußzytometrischen Analyse wurden die Proben (s. Kap. 2.4.3) weiterbehandelt.

### **2.4.10 TSP-1-Bindung der Erythrozyten**

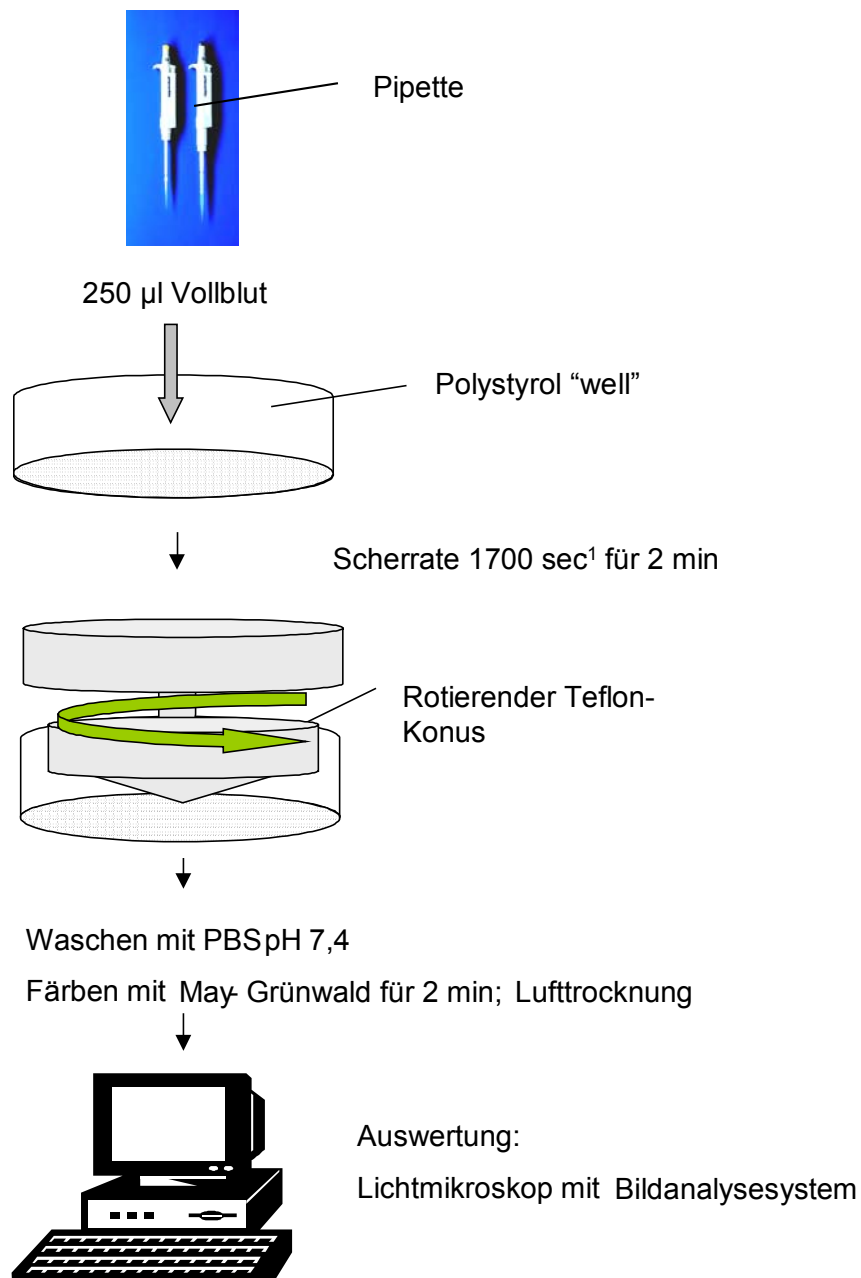
Nach aktivierungsbedingter Sekretion von TSP-1 z.B. aus den  $\alpha$ -Granula kann TSP-1 an Zellen wie Monozyten, PMNL und Erythrozyten zurückbinden. Zur Detektion der TSP-1-Beladung der Erythrozyten wurden bei fixierten Vollblutproben die Erythrozyten mit FITC-markierten, monoklonalen Antikörper gegen Glykophorin A (Klon 11E4B7.6) in sättigender Konzentration von 2 $\mu$ g/ml für 45min bei RT markiert. Glykophorin A ist ein Sialoglykoprotein, das auf Erythrozyten und deren Vorläuferzellen (Proerythroblasten, Retikulozyten) exprimiert wird. Für den Nachweis der TSP-1-Bindung wurde der PE-konjugierte Klon P10 in sättigender Konzentration von 2,5 $\mu$ g/ml zugesetzt und für 45 min bei RT koinkubiert. Die nachfolgende Behandlung der Proben bis zur FACS-Analyse erfolgte, mit Ausnahme der Erythrozyten-Lyse, wie in Kap. 2.4.3 beschrieben.

## **2.5 Scheraggregometrie**

Im Rahmen dieser Dissertation wurde mit einer in Israel entwickelten Apparatur zur gezielten Einwirkung von Scherkräften, z.B. zur Simulation von stenosierten Gefäßen, der Einfluß der zu untersuchenden nichtionischen Kontrastmittel während Koronarangiographie bzw. PTCA auf die prozentuale thrombozytäre Oberflächenbedeckung einer vorgefertigten Polystyrol-Platte mit eingelassenen Vertiefungen („wells“) dargestellt. (Methodik verwandt in: „A new method for quantitative analysis of whole blood platelet interaction with extracellular matrix under flow conditions“, Varon, D. et al. Thrombosis Research, vol. 85, 283-294; 1997) Hierzu wurde jeweils 250 $\mu$ l Vollblut vor und nach Applikation des entsprechenden Kontrastmittels und Koronarangiographie bzw. PTCA in die vorgeformten, unbeschichteten „Wells“ mit einem Durchmesser von 16 mm gegeben. Mit einem speziell angefertigten, frei beweglich rotierenden 14 mm Teflon-Konus mit einem Konuswinkel von 2,45° wurde anschließend für 2 min eine Scherkraft von 1700 s<sup>-1</sup> appliziert. Der Konus wurden nach der Rotation entnommen und die Oberfläche der

Platte mit PBS pH 7,4 mehrmals gewaschen und für 2 min mit May-Grünwald Färbung gefärbt. Nach Absaugung der überschüssigen Färbelösung, wurden die Proben luftgetrocknet, anschließend wurden die Thrombozyten unter einem inversen Mikroskop mit einer Videokamera detektiert. Mit Hilfe eines Bildverarbeitungsprogramms (Optimas 5.2, entwickelt von R. B. Dickinson, USA) konnte die Anzahl der adhärenen Thrombozyten und die prozentuale Oberflächenbedeckung der „well“-Platten bestimmt werden (s. Abb. 2.5).

Abb. 2.5 Schematische Darstellung zum Ablauf der Scheraggregometrie



## **3 Ergebnisse**

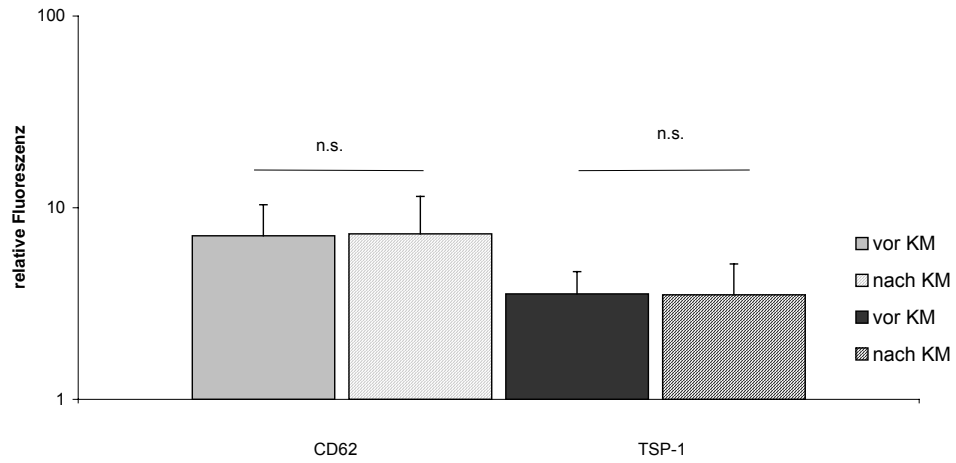
### **3.1 Durchflußzytometrische Untersuchungen der Kontrastmittelwirkung während Koronarangiographie**

#### **3.1.1 Durchflußzytometrische Untersuchungen zum ex-vivo Aktivierungszustand der Thrombozyten**

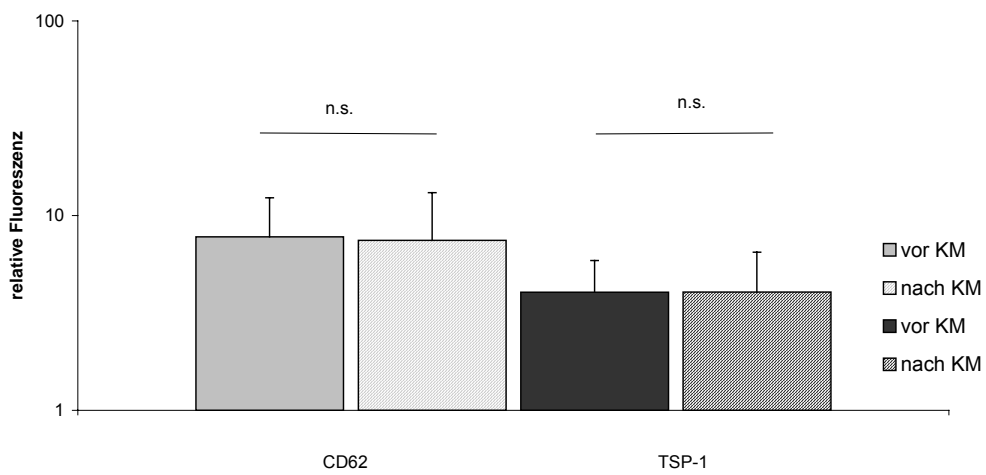
##### **3.1.1.1 $\alpha$ -Granula-Sekretion der Thrombozyten**

Die Degranulation der  $\alpha$ -Granula mit anschließender Sekretion ihrer Inhaltsstoffe wurde quantifiziert anhand der P-Selektin-Expression auf der Thrombozytenoberfläche und der TSP-1-Bindung an die Thrombozytenoberfläche. Bei Koronarangiographie unter Verwendung des nichtionischen Monomers Iopentol wurde ex-vivo eine gleichbleibende P-Selektin- und TSP-1-Expression im Vergleich zur Probe vor Kontrastmittelinjektion beobachtet (Abb. 3-1a). Bei Verwendung des nichtionischen Dimers Iodixanol zeigte sich ebenfalls keine Veränderung der CD62-Expression der Thrombozyten und der TSP-1-Bindung der Thrombozyten ex-vivo im Vergleich zur den Proben, die vor Kontrastmittelgabe entnommen wurden (Abb. 3-1b). Während Koronarangiographie mit Applikation des nichtionischen Monomers Iohexol zeigte sich ex-vivo ein ähnliches Verhalten wie bei Iopentol und Iodixanol, auch hier kam es wie zuvor zu keiner veränderten Expression bzw. Bindung der  $\alpha$ -Granulainhaltsstoffe CD62 und TSP-1 (Abb. 3-1c). Der Vergleich der drei nichtionischen Kontrastmittel zeigte, daß sich die ex-vivo Aktivierungszustände der Proben, die nach Kontrastmittelinjektion entnommen wurden, gemessen an der  $\alpha$ -Granula-Sekretion, nicht signifikant unterschieden (Abb. 3-1d).

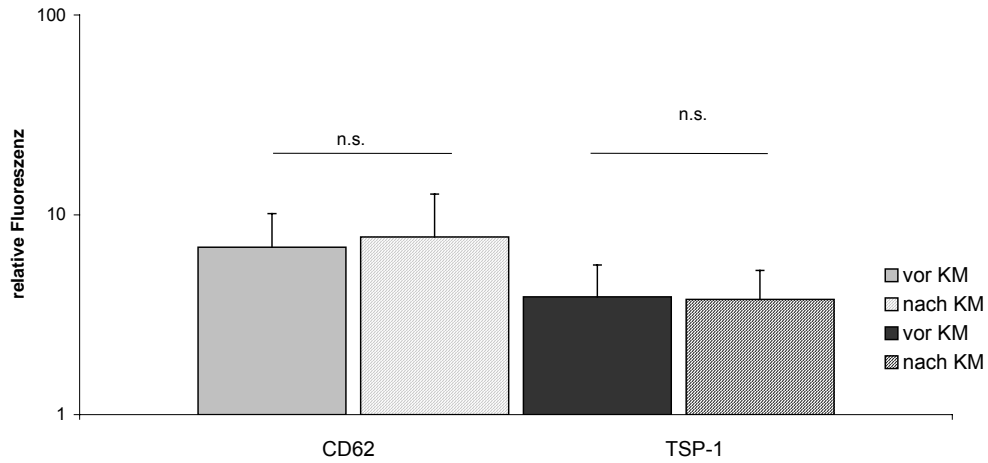
**Abb 3-1a** Einfluß des Kontrastmittels Iopentol auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der alpha-Granula der Thrombozyten



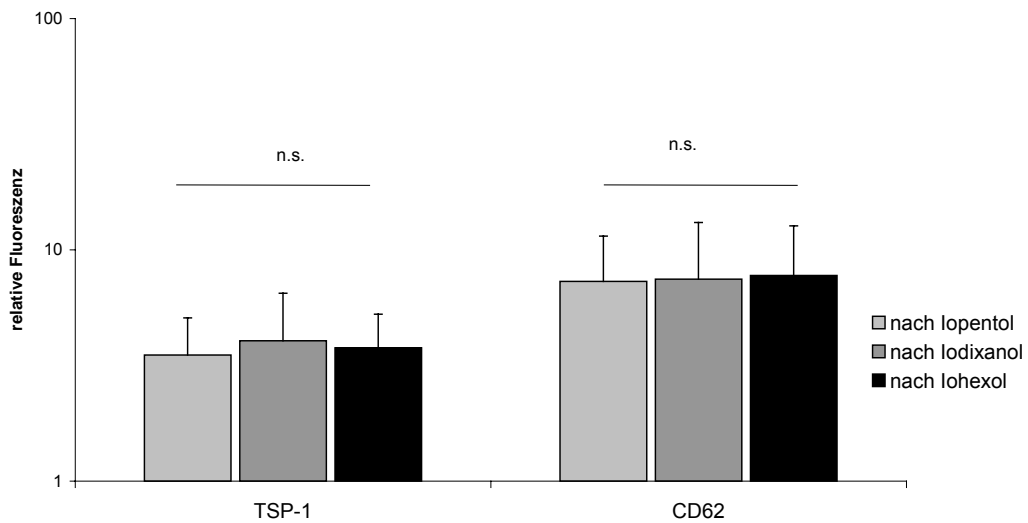
**Abb. 3-1b** Einfluß des Kontrastmittels Iodixanol auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der alpha-Granula der Thrombozyten



**Abb 3-1c** Einfluß des Kontrastmittels Iohexol auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der alpha-Granula der Thrombozyten



**Abb. 3-1d** Vergleich der ex-vivo Thrombozytenaktivierung gemessen an der alpha-Granula-Sekretion durch die Kontrastmittel



### 3.1.1.2 „Dense Bodies“-Sekretion der Thrombozyten

„Dense-bodies“ sind, wie auch  $\alpha$ -Granula in der Lage, aktivierungsabhängig mit der Thrombozytenmembran zu verschmelzen, wobei CD63 an der Membranoberfläche exprimiert wird und die Granulainhaltsstoffe sezerniert werden. Die CD63-Expression

wurde mit Hilfe eines FITC-markierten monoklonalen Antikörper gegen CD63 detektiert. Unstimulierte Thrombozyten können Mepacrine in die „dense-bodies“ einlagern, dieses spiegelt sich in einem Fluoreszenzsignal wider. Zur Quantifizierung der „dense-bodies“-Sekretion wurde die CD63-Expression, sowie die Aufnahme des in die „dense-bodies“ eingelagerten Farbstoffs Mepacrine ex-vivo nach Kontrastmittelapplikation analysiert. Nach Injektion des Kontrastmittels Iopentol veränderte sich die CD63- und Mepacrine-Aufnahme ex-vivo nicht im Vergleich zu den Proben, die vor Kontrastmittelinjektion entnommen wurden (Abb. 3-2a). Nach Koronarangiographie unter Verwendung des nichionischen Dimers Iodixanol zeigte sich keine Änderung der CD63-Expression, sowie der Mepacrine-Aufnahme ex-vivo (Abb. 3-2b). Das nichtionische Monomer Iohexol zeigte ex-vivo ebenfalls keinen Einfluß auf die CD63-Expression und die Mepacrine-Aufnahme (Abb. 3-2c). Abb. 3-2d ist zu entnehmen das sich die CD63-Expression, sowie die Mepacrine-Aufnahme in die „dense-bodies“ in den Proben nach Kontrastmittelgabe, unabhängig von der Art des Agens, nicht signifikant veränderte.

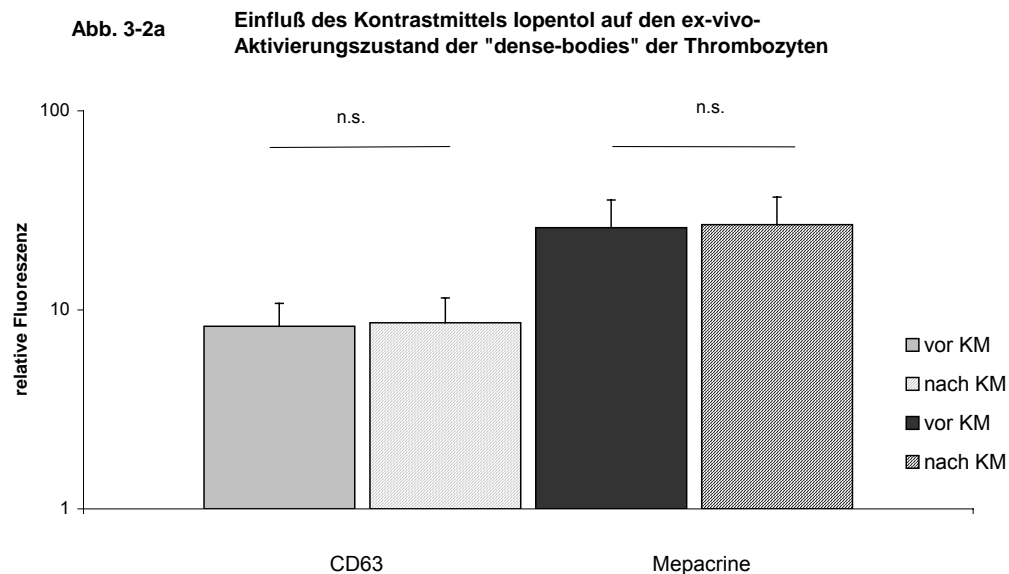




Abb. 3-2b

Einfluß des Kontrastmittels Iodixanol auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der "dense-bodies" der Thrombozyten

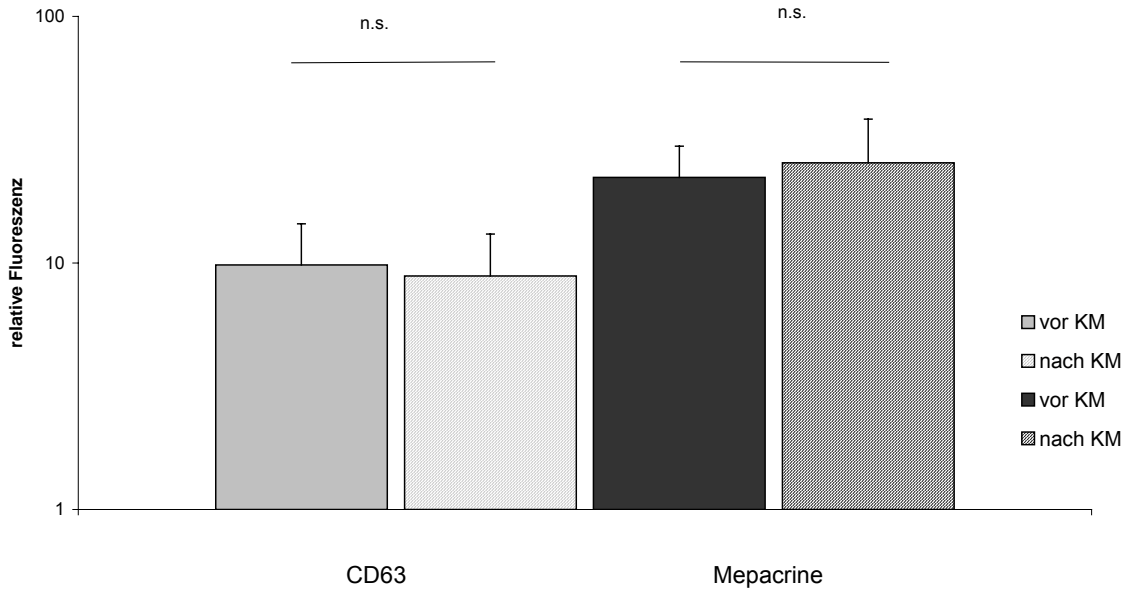
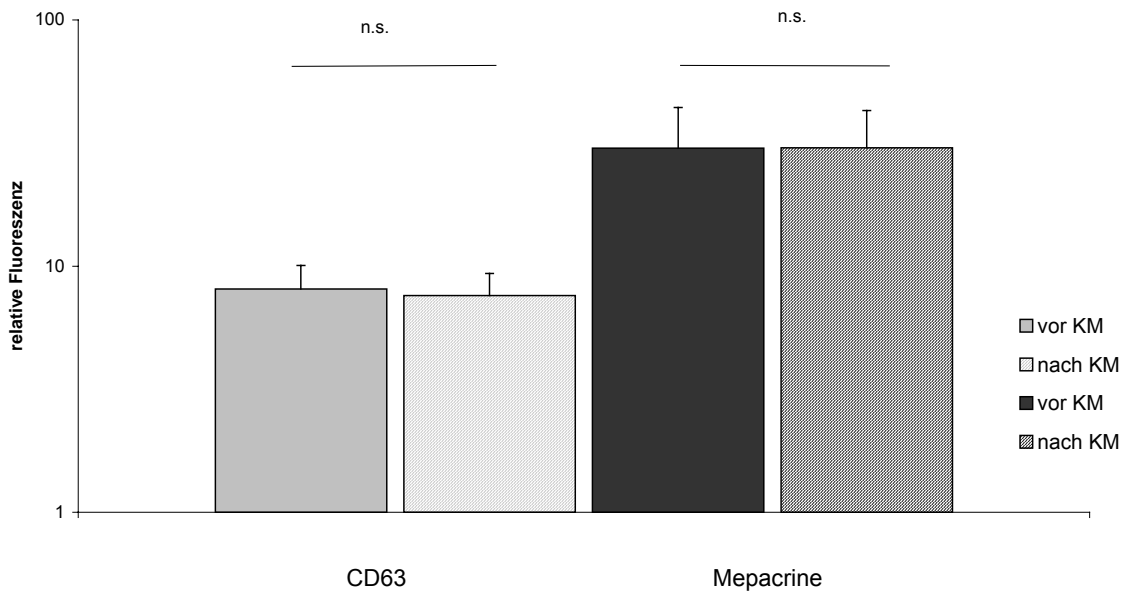
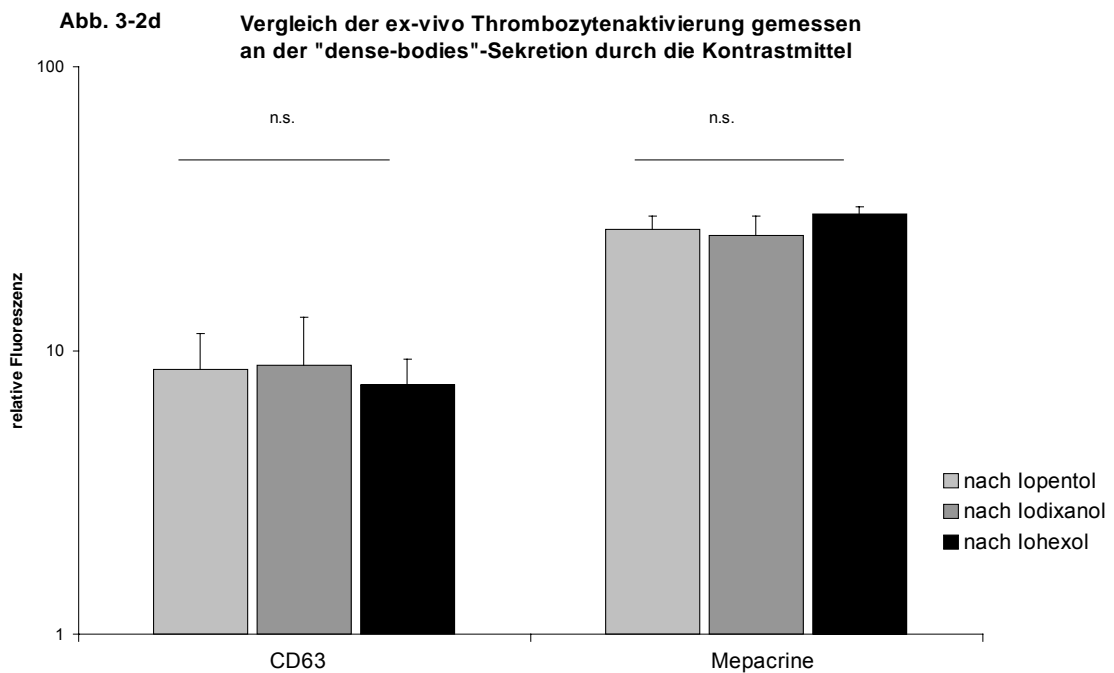


Abb. 3-2c

Einfluß des Kontrastmittels Iohexol auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der "dense-bodies" der Thrombozyten

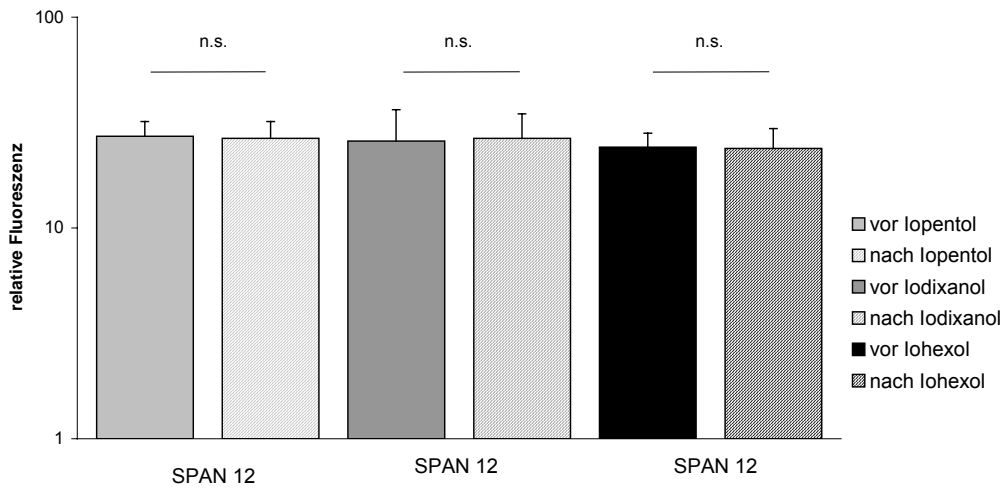




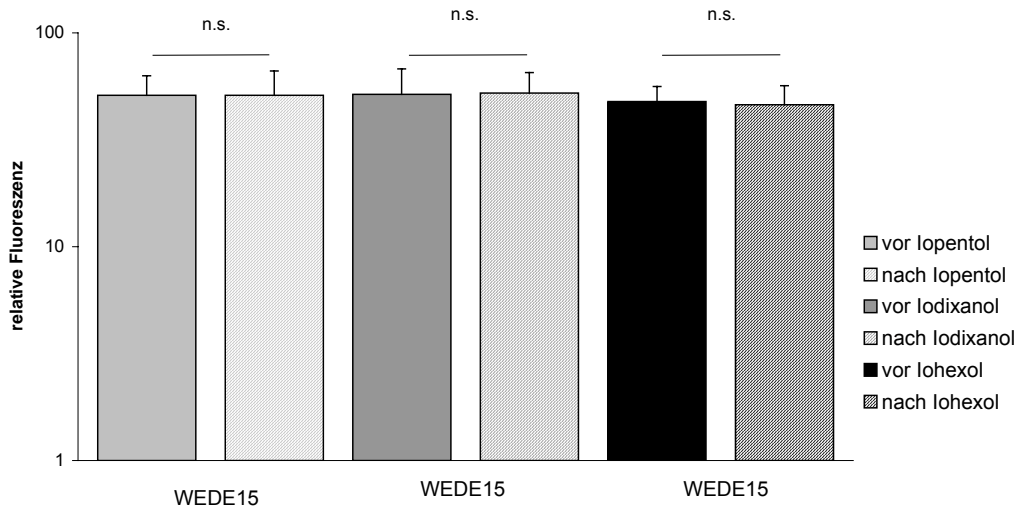
### 3.1.1.3 Spaltungs- und Internalisierungszustand des Thrombinrezeptors PAR-1

Die Antikörper SPAN12 und WEDE15 wurden im Rahmen dieser Arbeit benutzt, um mit dem Spaltungs- und Internalisierungsgrad die Aktivierung des Thrombinrezeptors der Thrombozyten durch die drei zu untersuchenden Kontrastmittel zu quantifizieren. SPAN12 bindet nur an das intakte, ungespaltene Endstück des Thrombinrezeptors, ein reduziertes Fluoreszenzsignal würde auf eine erhöhte Anzahl gespaltener Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche hindeuten. WEDE15 bindet sowohl an intakte als auch an gespaltene Rezeptoren [Brass, 1994], nicht jedoch an internalisierte Rezeptoren, so daß eine starke Aktivierung, die mit Rezeptorinternalisierung einhergeht, zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals führen würde. An Abb. 3.3 ist ersichtlich, daß es im Verlauf der Koronarangiographie mit den drei Kontrastmitteln zu keiner Aktivierung des Thrombinrezeptors PAR-1 kommt: Die Fluoreszenzsignale der Antikörper SPAN12 und WEDE15 sind vergleichbar in den Proben vor und nach Kontrastmittelgabe für alle drei nichtionischen Substanzen.

**Abb. 3-3a Spaltungs- und Internalisierungszustand des Thrombinrezeptors PAR-1 ex-vivo**



**Abb. 3-3b Spaltungs- und Internalisierungszustand des Thrombinrezeptors PAR-1 ex-vivo**



### 3.1.1.4 vWF- und Fibrinogenbindung der Thrombozyten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die vWF- und Fibrinogenbindung der Thrombozyten ex-vivo in den Proben vor und nach Kontrastmittelgabe durchflußzytometrisch quantifiziert. Eine erhöhte vWF-Bindung der Thrombozyten könnte auf eine

Endothelverletzung durch das Kontrastmittel zurückzuführen sein. Hierbei könnte der in den Weibel-Palade-Körpern des Endothels vorhandene vWF durch die Verletzung sezerniert werden und an den Thrombozyten binden [Dehmer et al., 1999], andererseits auch aus den  $\alpha$ -Granula des Thrombozyten selbst aktivierungsbedingt sezerniert und gebunden werden [Herrmann et al., 1997]. Eine erhöhte Fibrinogen-Bindung in den PRP-Proben nach Kontrastmittelgabe könnte ebenfalls auf eine in-vivo Aktivierung hindeuten, da die Fibrinogen-Bindung an die RDG-Erkennungssequenz des GP IIb/IIIa-Rezeptors die aktivierungsbedingte Konformationsänderung des Rezeptors voraussetzt [Phillips et al., 1991] (s. Kap.1).

Die vWF-Bindung des Thrombozyten unterscheidet sich in den Blutproben nach Iopentol-, Iohexol- bzw. Iodixanolgabe nicht von den Referenzwerten vor Kontrastmittelinjektion (Abb. 3-4a). Bei Verwendung der nichtionischen Monomere Iopentol und Iohexol und des Dimers Iodixanol kommt es in den Proben nach Kontrastmittelgabe zu keiner Änderung der Fibrinogenbindung der Thrombozyten (Abb. 3-4b).

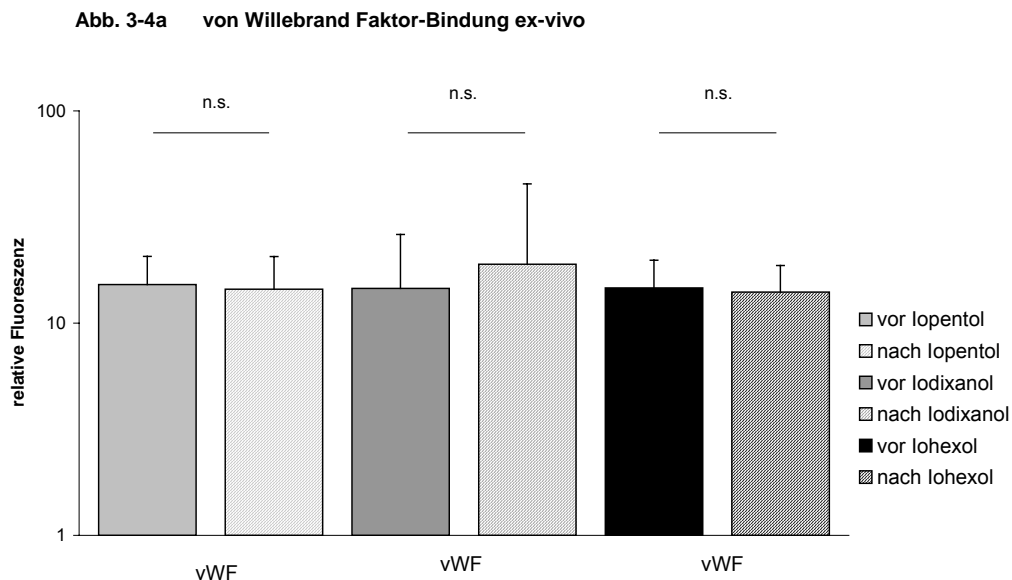
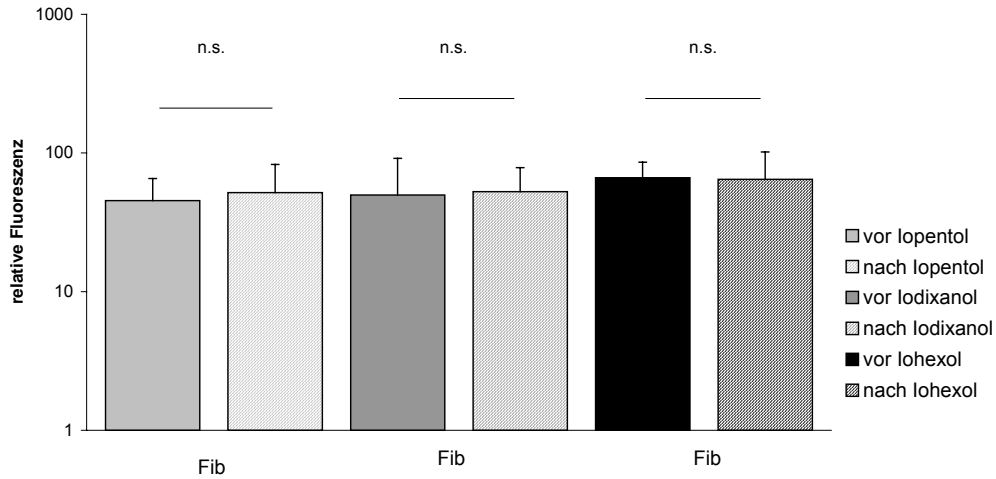


Abb. 3-4b Fibrinogen-Bindung ex-vivo



### 3.1.2 Durchflußzytometrische Untersuchungen zur thrombin-induzierten Thrombozytenaktivierung

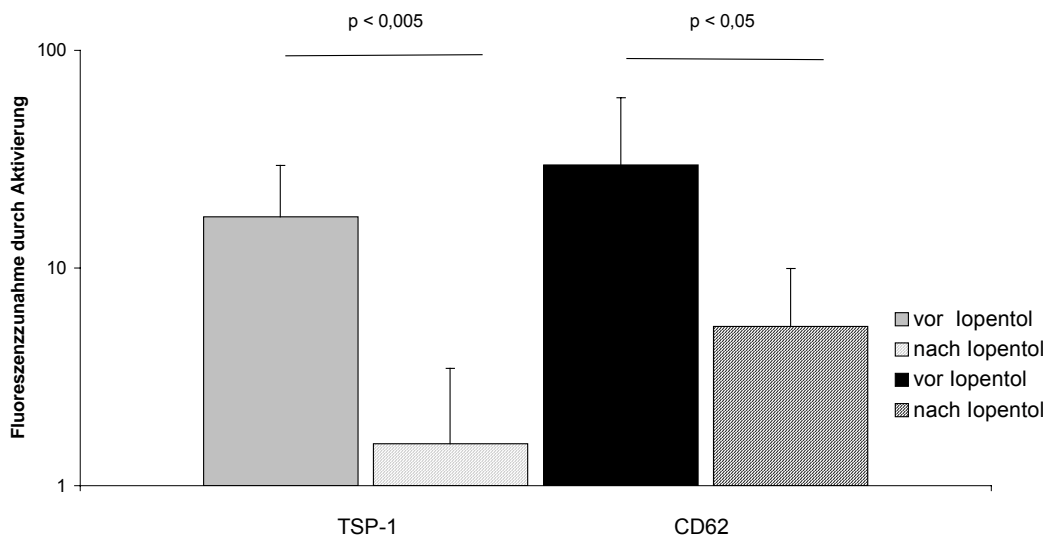
#### 3.1.2.1 $\alpha$ -Granula-Sekretion der Thrombozyten

Um die Reaktivität und Sekretionsfähigkeit der Thrombozyten vor und nach Applikation des jeweiligen Kontrastmittels zu untersuchen, wurden Vollblutproben vor und nach Koronarangiographie mit dem entsprechenden Kontrastmittel mit Thrombin für 3min inkubiert. Die CD62-Expression und die TSP-1-Bindung an thrombin-stimulierten Thrombozyten wurde durchflußzytometrisch erfasst und als Differenz zum ex-vivo Aktivierungszustand dargestellt.

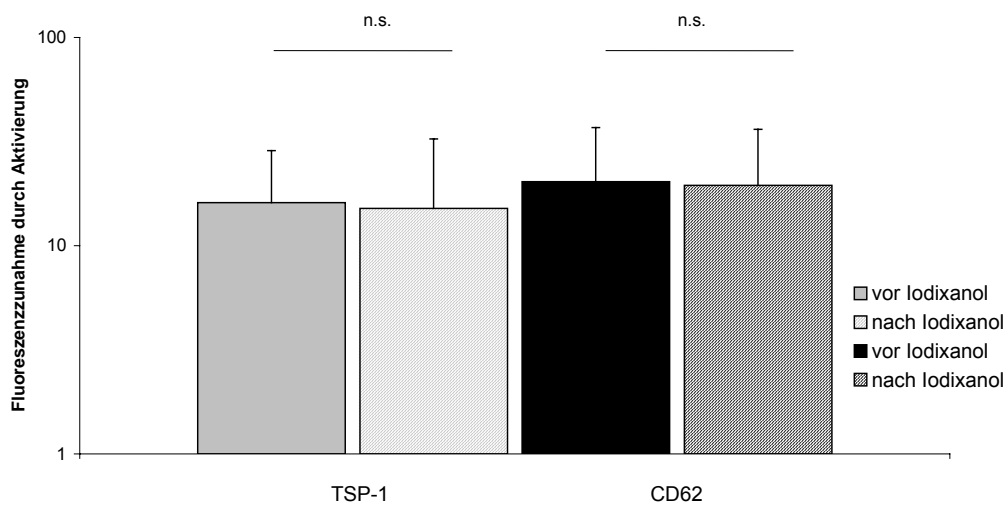
Nach Stimulation der Proben, die vor Applikation des nichtionischen Monomers Iopentol entnommen wurden, mit 0,3 U/ml Thrombin war die CD62-Expression im Vergleich zur Probe nach Kontrastmittelinjektion signifikant reduziert (Abb. 3-5a). Auch die thrombin-induzierte TSP-1-Bindung an die Thrombozytenoberfläche fiel in den Proben nach Iopentolgabe signifikant geringer aus. Bei Verwendung des nichtionischen Dimers Iodixanol zeigte sich im Vergleich zu den Proben vor Iodixanolgabe dieselbe thrombin-induzierte CD62-Expression und TSP-1-Bindung in den Proben nach Iodixanolapplikation (Abb. 3-5b). Abb. 3-5c ist zu entnehmen, daß es

unter Verwendung des Kontrastmittels Iohexol zu keiner signifikant veränderten thrombin-induzierten TSP-1-Bindung kommt; die CD62-Expression an der Thrombozytenoberfläche ist nach Iohexolgabe und Thrombinstimulation in-vitro signifikant reduziert (Abb. 3-5c).

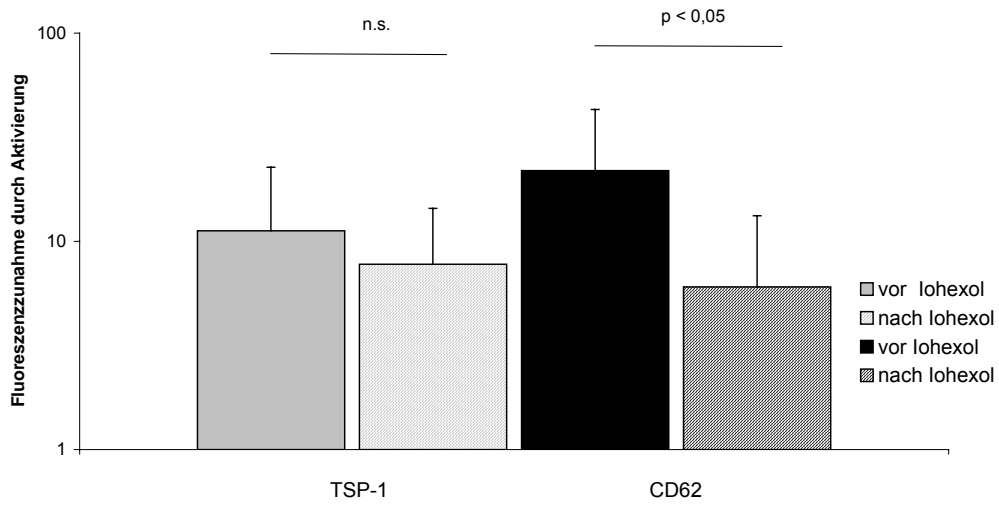
**Abb. 3-5a** Einfluß des Kontrastmittels Iopentol auf die alpha-Granula-Sekretion nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)



**Abb. 3-5b** Einfluß des Kontrastmittels Iodixanol auf die alpha-Granula-Sekretion nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)



**Abb. 3-5c** Einfluß des Kontrastmittels Iohexol auf die alpha-Granula-Sekretion nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)



**Abb. 3-5d** Vergleich der TSP-1-Bindung nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)

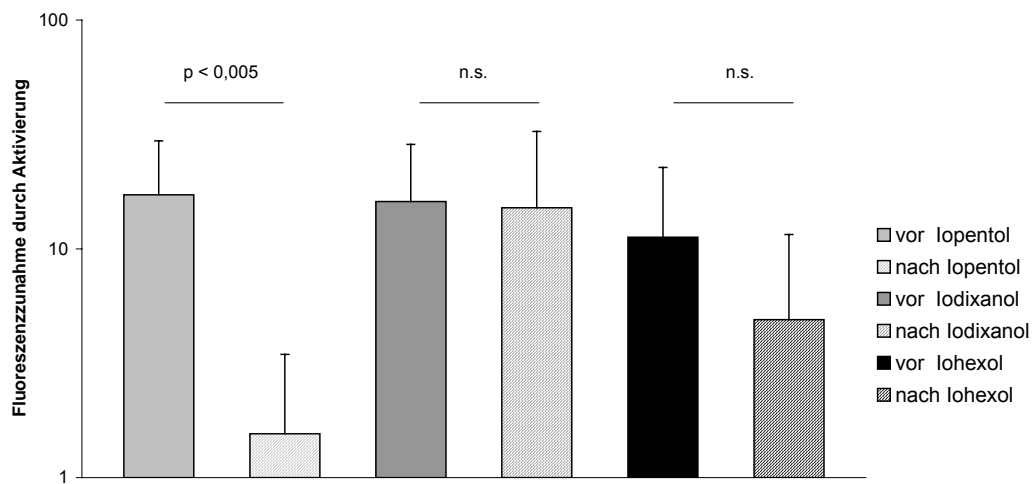
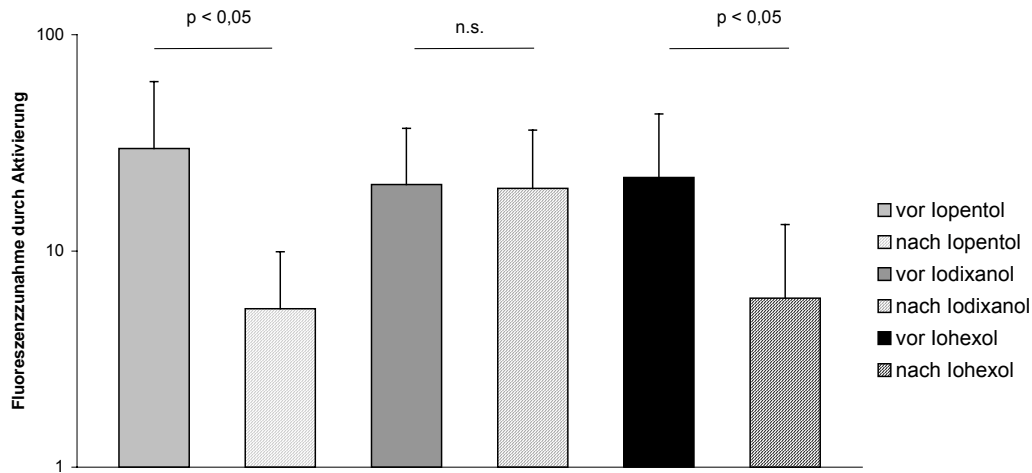


Abb. 3-5e Vergleich der CD-62-Expression nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)



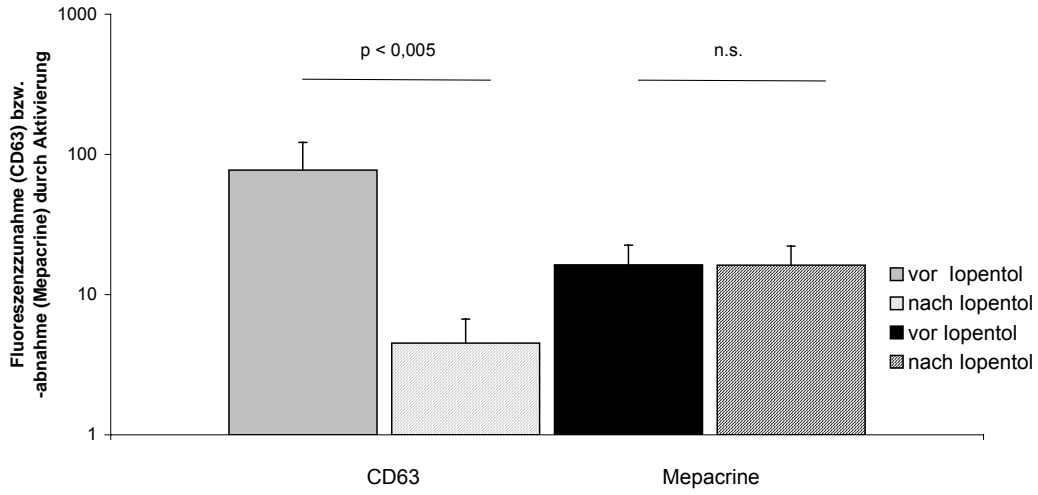
### 3.1.2.2 „Dense Bodies“-Sekretion der Thrombozyten

Abb. 3-6 zeigen exemplarisch die durchflußzytometrische Detektion der aktivierungsbedingten CD63-Expression, sowie die Abgabe des zuvor in die „dense bodies“ eingelagerten Mepacrine.

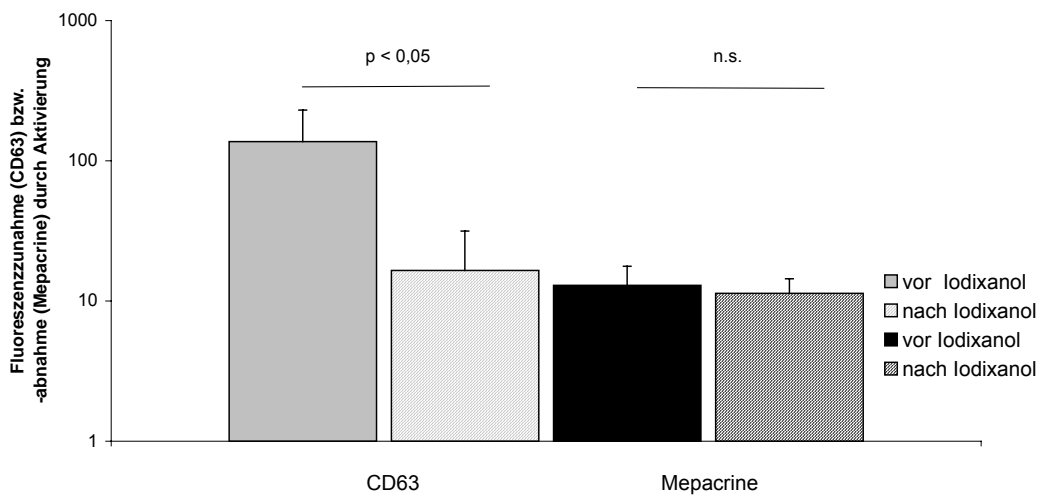
Nach Thrombinaktivierung in-vitro zeigte sich eine signifikant reduzierte CD63-Expression in den Proben nach Iopentolgabe im Hinblick auf den Vergleichswert in den Proben vor Kontrastmittelinjektion (Abb. 3-6a). Diese Reduktion der thrombin-induzierten CD63-Expression war bei Verwendung dieses Kontrastmittels stärker ausgeprägt als nach Verwendung von Iodixanol und Iohexol (Abb. 3-6 b-d). Die durchflußzytometrische Erfassung der thrombin-induzierten Mepacrineabgabe zeigte in den Blutproben nach Applikation der zu untersuchenden Kontrastmittel keine Unterschiede im Vergleich zu den Proben vor Kontrastmittelgabe (Abb. 3-6).



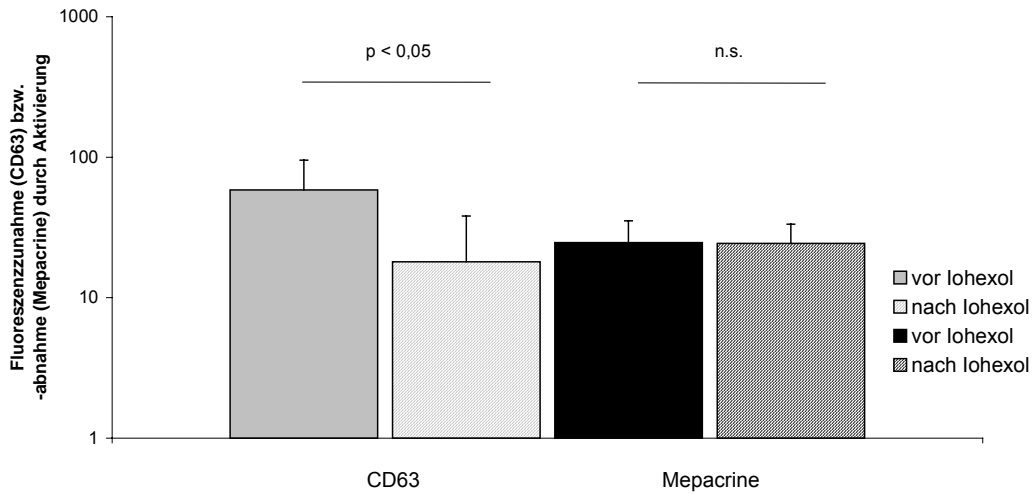
**Abb. 3-6a** Einfluß des Kontrastmittels Iopentol auf die "dense-bodies"-Sekretion nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)



**Abb. 3-6b** Einfluß des Kontrastmittels Iodixanol auf die "dense-bodies"-Sekretion nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)



**Abb. 3-6c** Einfluß des Kontrastmittels Iohexol auf die "dense-bodies"-Sekretion nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)



**Abb. 3-6d** Vergleich der CD-63-Expression nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)

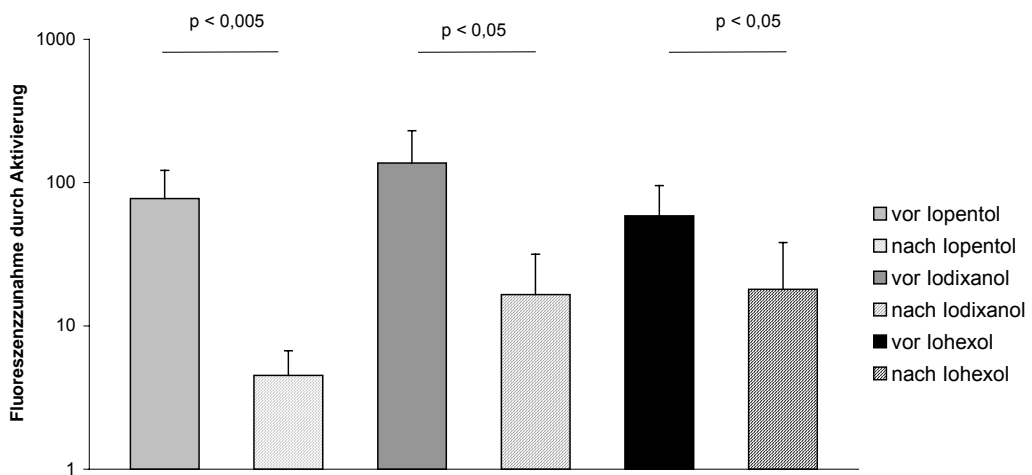
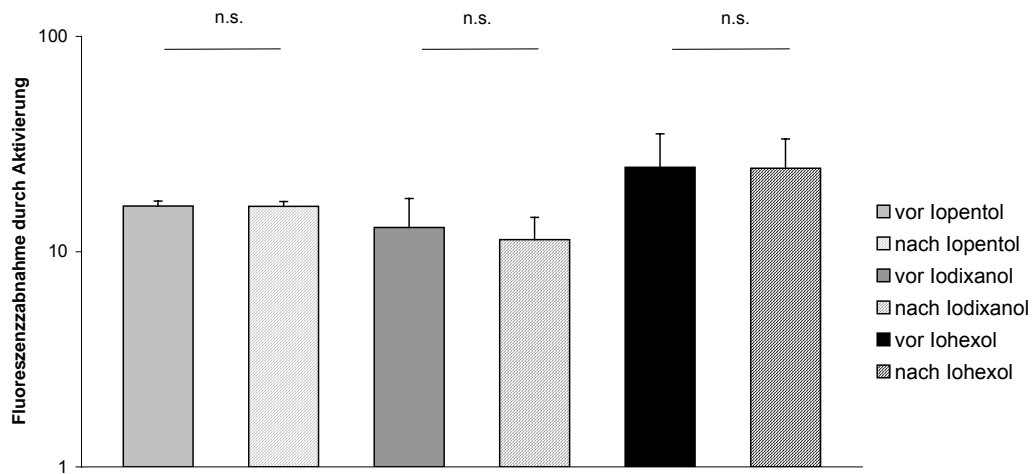


Abb. 3-6e Vergleich der Mepacrine-Sekretion nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)

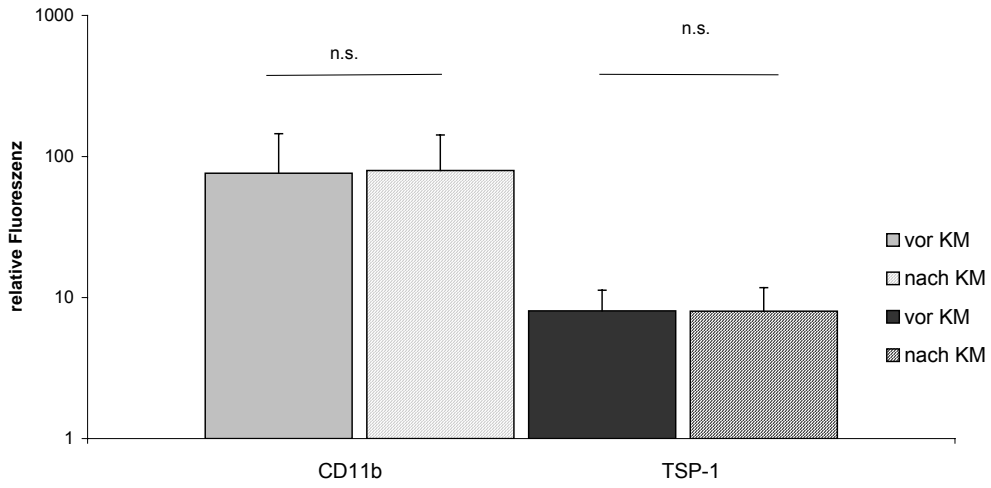


### 3.1.3 Durchflußzytometrische Untersuchungen zum ex-vivo Aktivierungszustand der Leukozyten

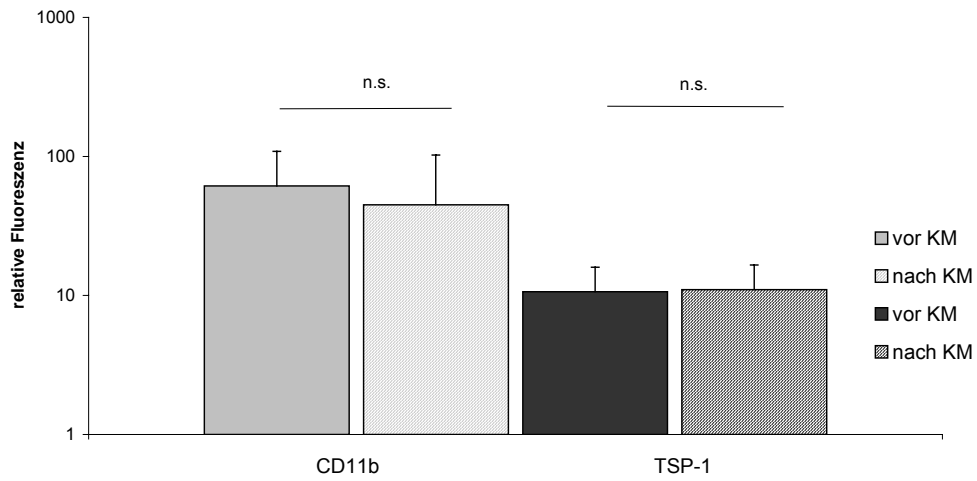
#### 3.1.3.1 Aktivierungszustand der Monozyten

Die Aktivierung der Monozyten wurde mit Hilfe der aktivierungsabhängigen Expression von CD11b und der TSP-1-Bindung auf der Monozytenoberfläche durchflußzytometrisch erfaßt. In den Proben nach Applikation der drei Kontrastmittel Iopentol, Iodixanol und Iohexol verursachte keines der nichtionischen Substanzen ex-vivo veränderte CD11b-Expression bzw. TSP-1-Bindung im Vergleich zu den Proben vor Koronarangiographie und Kontrastmittelgabe (Abb. 3-7).

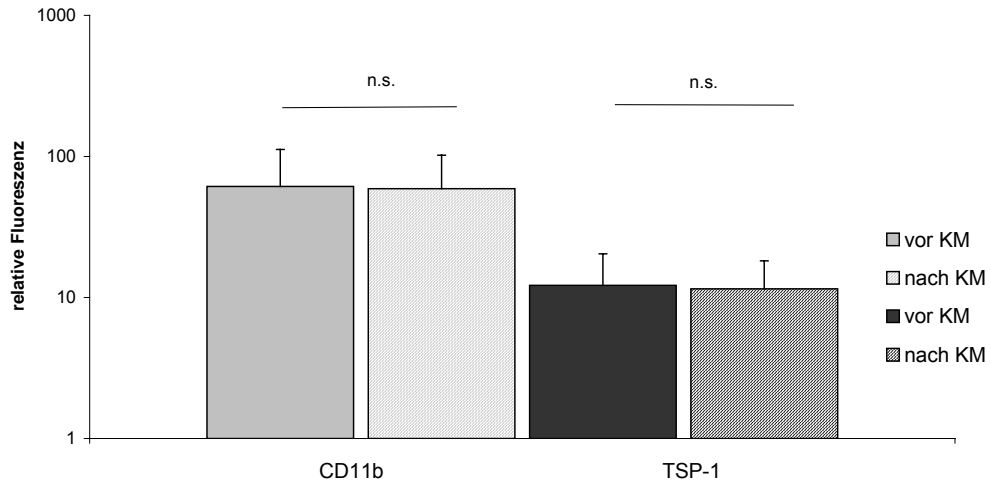
**Abb. 3-7a** Einfluß des Kontrastmittels Iopentol auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Monozyten



**Abb. 3-7b** Einfluß des Kontrastmittels Iodixanol auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Monozyten



**Abb. 3-7c** Einfluß des Kontrastmittels Iohexol auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Monozyten



**Abb. 3-7d** Vergleich der ex-vivo Monozytenaktivierung gemessen an der CD11b-Expression durch die Kontrastmittel

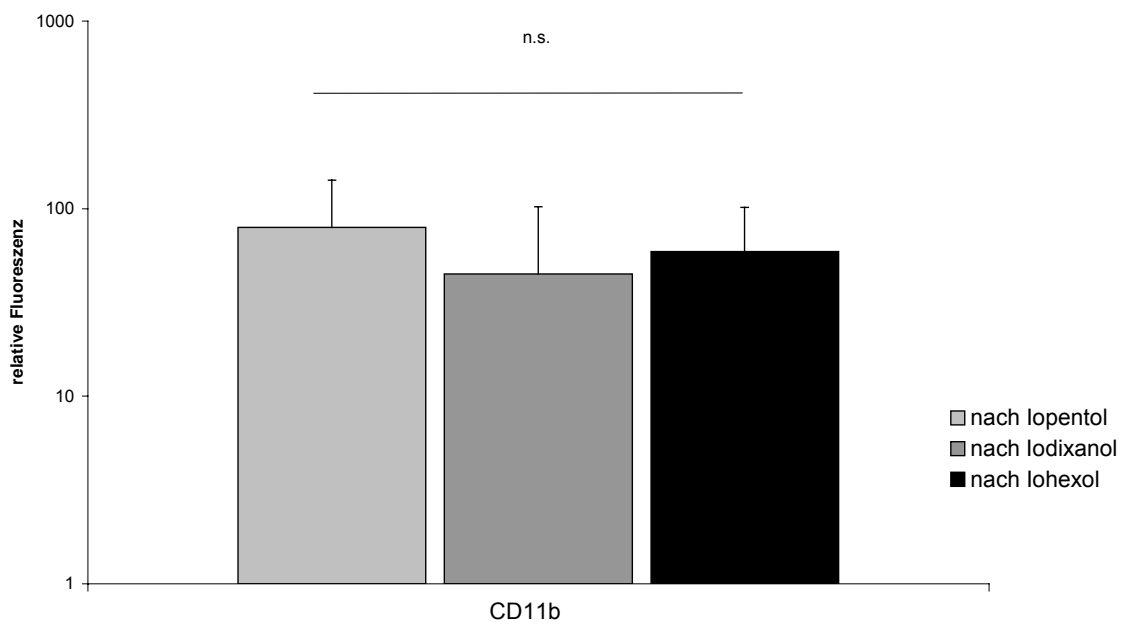
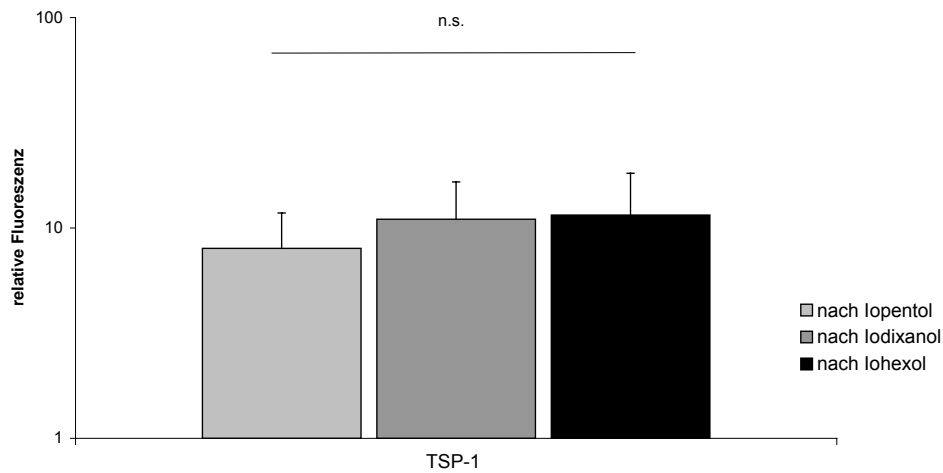


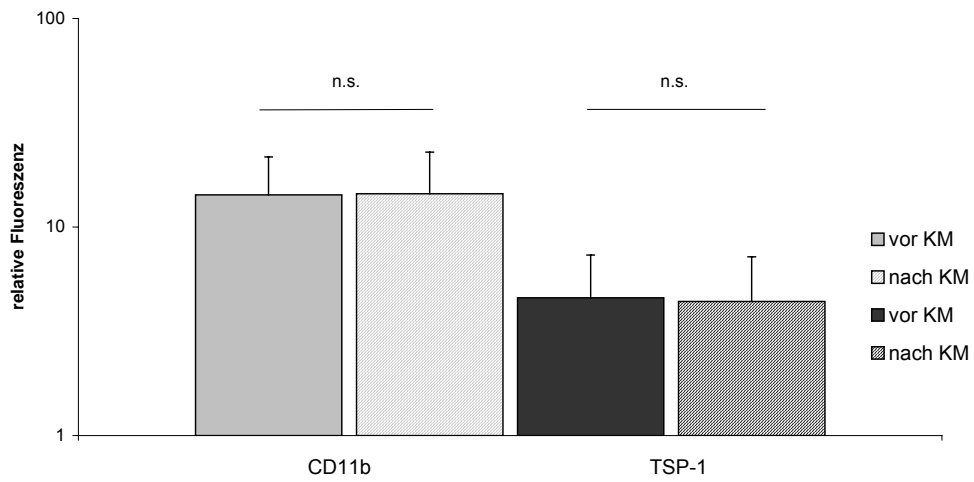
Abb. 3-7e Vergleich der ex-vivo Monozytenaktivierung gemessen an der TSP-1-Bindung durch die Kontrastmittel



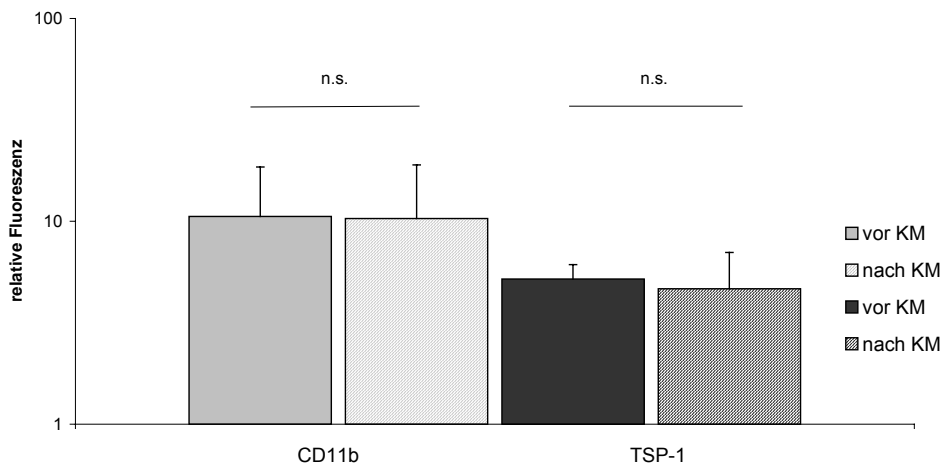
### 3.1.3.2 Aktivierungszustand der PMNL

Um den Aktivierungsgrad der PMNL durchflußzytometrisch zu detektieren, wurde ebenfalls die CD11b-Oberflächenexpression und TSP-1-Bindung der PMNL ex-vivo gemessen. Wie zuvor bei den Monozyten, zeigte sich ex-vivo keine Änderung der CD11b-Expression und der TSP-1-Bindung in den Vollblutproben nach Injektion eines der drei Kontrastmittel im Vergleich zur den vor Koronargangiographie und Kontrastmittelapplikation entnommenen Proben (Abb. 3-8).

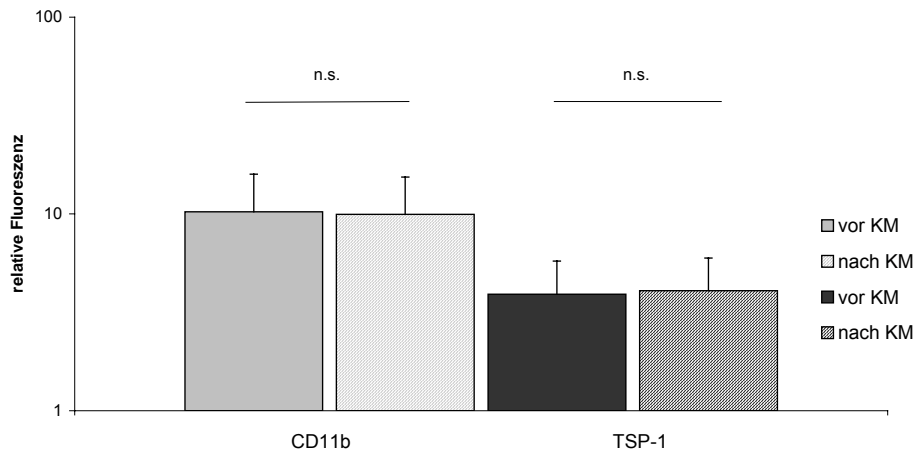
**Abb. 3-8a** Einfluß des Kontrastmittels Iopentol auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der PMNL



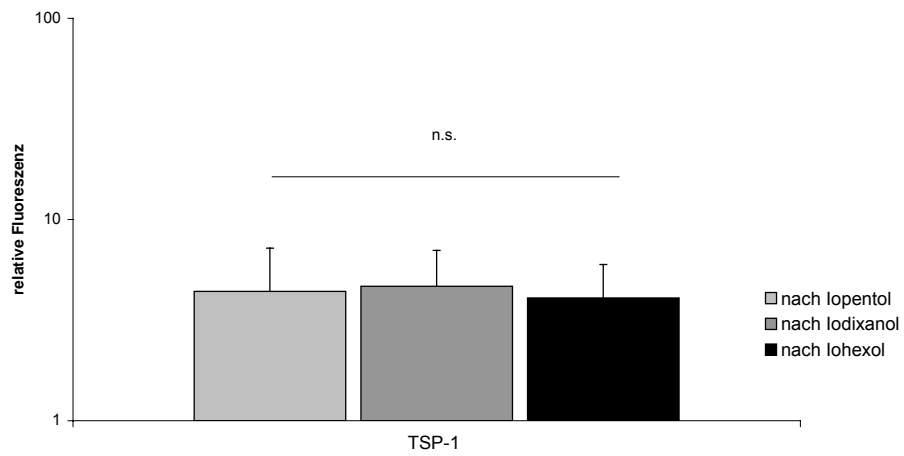
**Abb. 3-8b** Einfluß des Kontrastmittels Iodixanol auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der PMNL



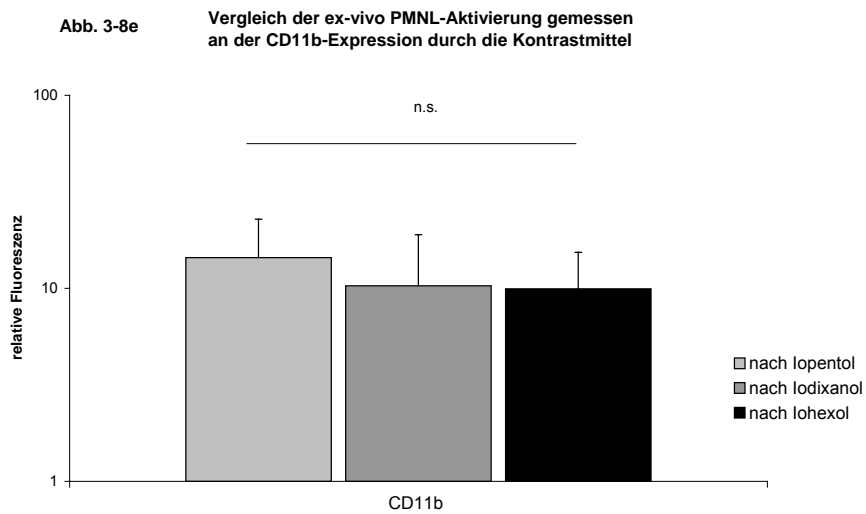
**Abb. 3-8c** Einfluß des Kontrastmittels Iohexol auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der PMNL



**Abb. 3-8d** Vergleich der ex-vivo PMNL-Aktivierung gemessen an der TSP-1-Bindung durch die Kontrastmittel





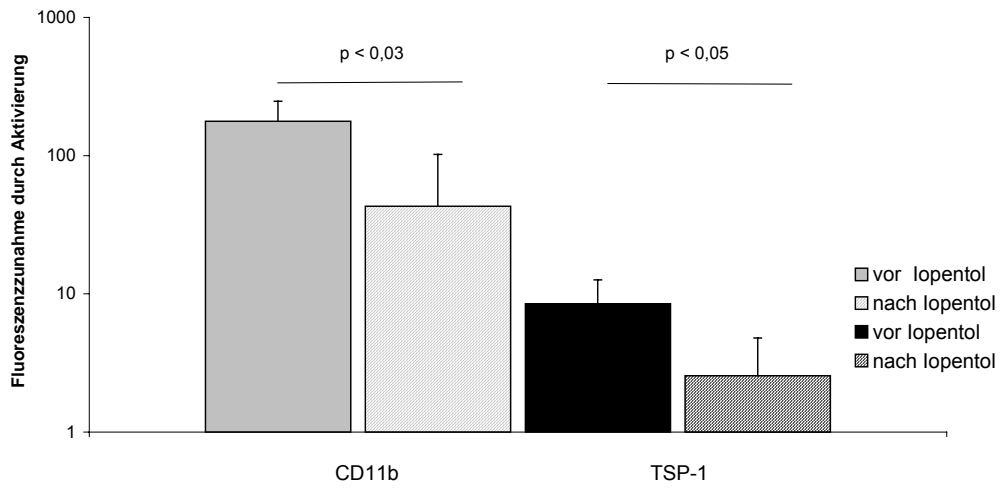


### 3.1.4 Durchflußzytometrische Untersuchungen zur thrombin-induzierte Leukozytenaktivierung

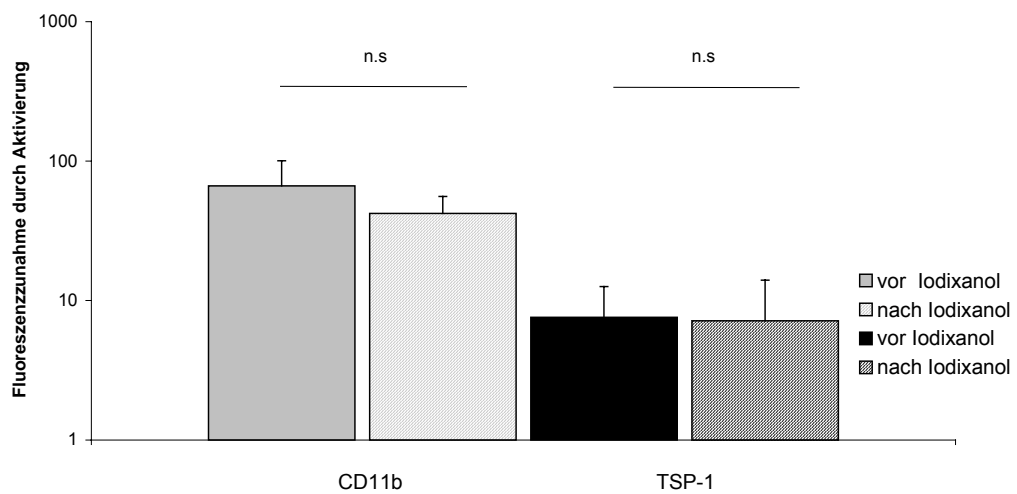
#### 3.1.4.1 In-vitro-induzierte Monozytenaktivierung

Die thrombin-induzierte CD11b-Oberflächenexpression und die TSP-1-Bindung auf Monozyten wurde im Vollblut durchflußzytometrisch detektiert (Abb. 3-9). Wie zuvor bei den Untersuchungen der Thrombozyten konnte eine aktivierungsabhängige CD11b-Expression und TSP-1-Bindung der Monozyten in den Vollblutproben vor und nach Kontrastmittelapplikation beobachtet werden. In den Proben nach Gabe des nichtionischen Monomers Iopentol war sowohl die CD11b-Expression als auch die TSP-1-Bindung der Monozyten signifikant reduziert (Abb. 3-9a). In den Proben nach Iodixanolgabe wurden vergleichbare Werte der Aktivierungsparameter, gemessen an den Ausgangswerten der Proben vor Iodixanolgabe detektiert (Abb. 3-9b). Die thrombin-induzierte CD11b-Oberflächenexpression und TSP-1-Bindung der Monozyten fiel in den Proben nach Iohexolgabe, ähnlich wie zuvor unter Verwendung von Iopentol, signifikant geringer aus (Abb. 3-9c).

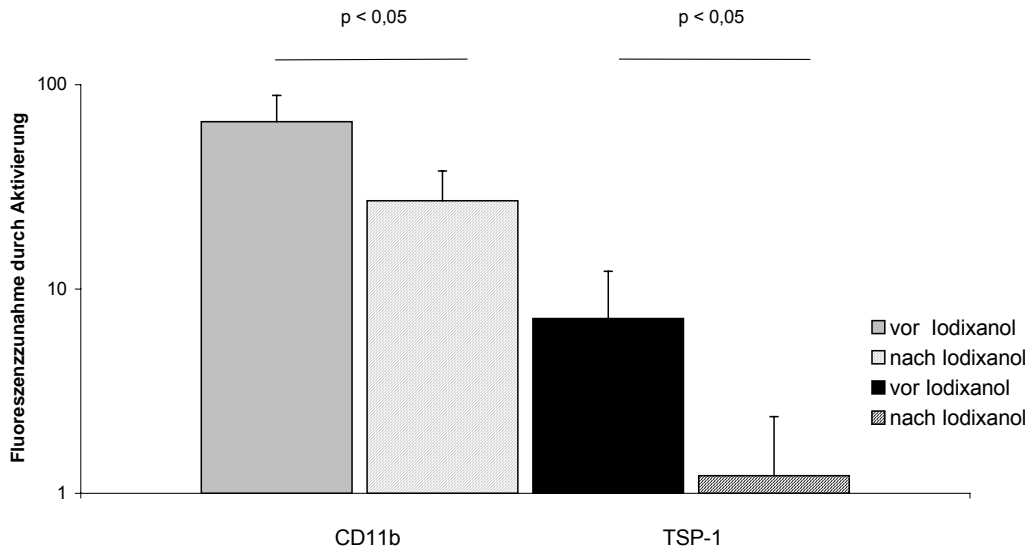
**Abb. 3-9a** Einfluß des Kontrastmittels Iopentol auf die Monozytenaktivierung nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)



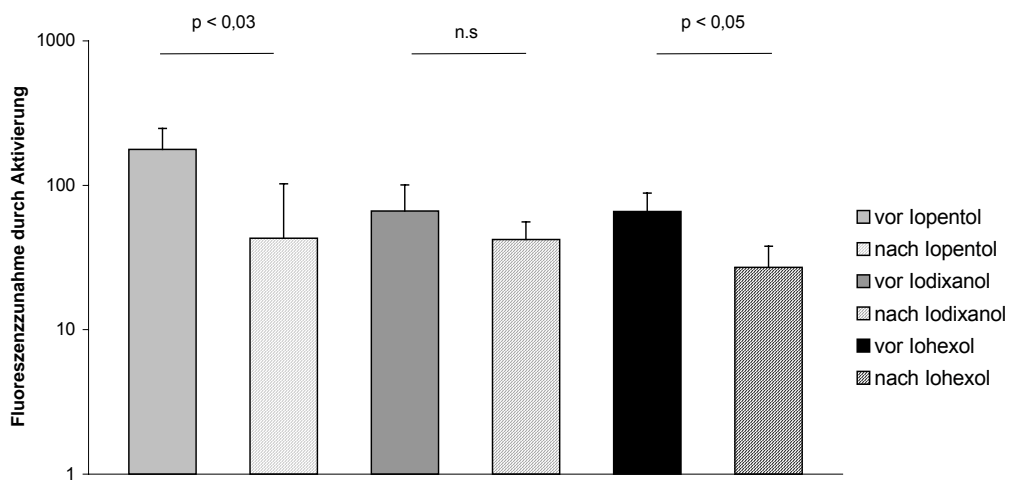
**Abb. 3-9b** Einfluß des Kontrastmittels Iodixanol auf die Monozytenaktivierung nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)

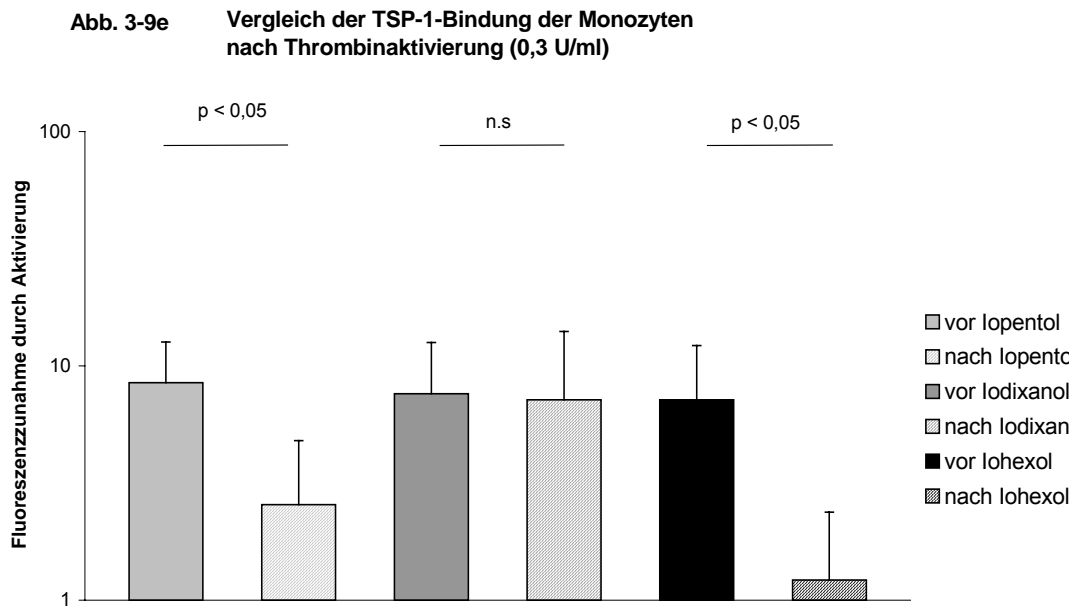


**Abb. 3-9c** Einfluß des Kontrastmittels Iohexol auf die Monozytenaktivierung nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)



**Abb. 3-9d** Vergleich der CD11b-Expression der Monozyten nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)

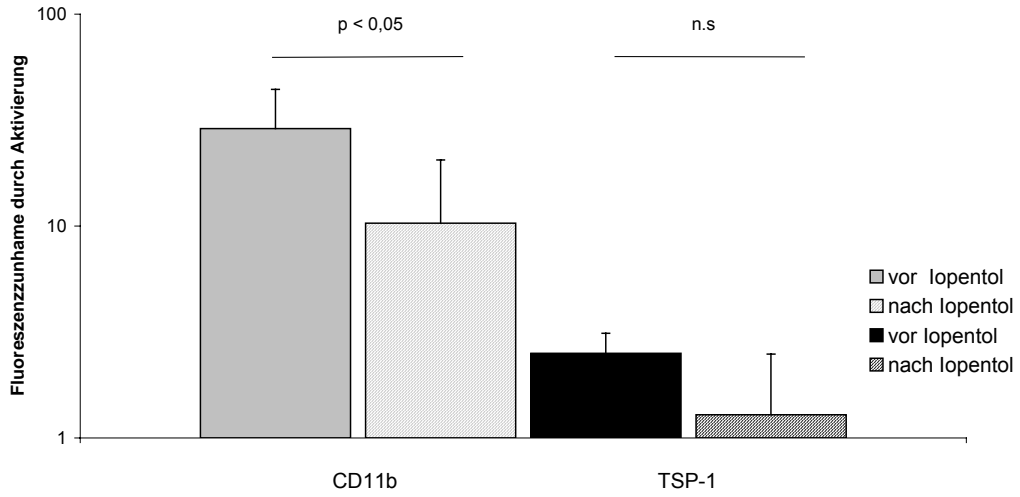




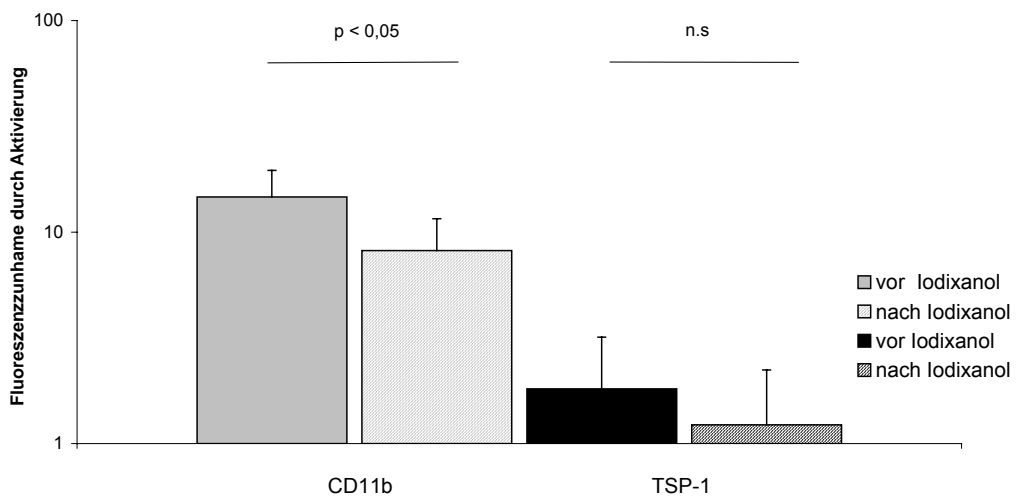
### 3.1.4.2 In-vitro-induzierte PMNL-Aktivierung

Analog zu der aktivierungsabhängigen CD11b-Expression und TSP-1-Bindung der Monozyten konnte eine thrombin-induzierte Aktivierung der PMNL beobachtet werden. An Abb. 3-10 ist ersichtlich, daß die thrombin-induzierte CD11b-Expression der PMNL in den Proben nach Iopentolgabe signifikant geringer ausfiel als in den Proben vor Kontrastmittelinjektion; für die TSP-1-Bindung war der Effekt von Iopentolgabe aber nicht signifikant. In den Proben, die nach Applikation des nichtionischen Dimers Iodixanol analysiert wurden, zeigte sich ebenfalls eine Hemmung der thrombin-induzierten CD11b-Expression (Abb. 3-10b). Die Iodixanolgabe hatte keinen signifikanten Einfluß auf die TSP-1-Bindung der PMNL. Nach Thrombinstimulation in-vitro war in den Proben nach Iohexolgabe eine Inhibition sowohl der CD11b-Expression als auch der TSP-1-Bindung zu beobachten (Abb. 3-10c).

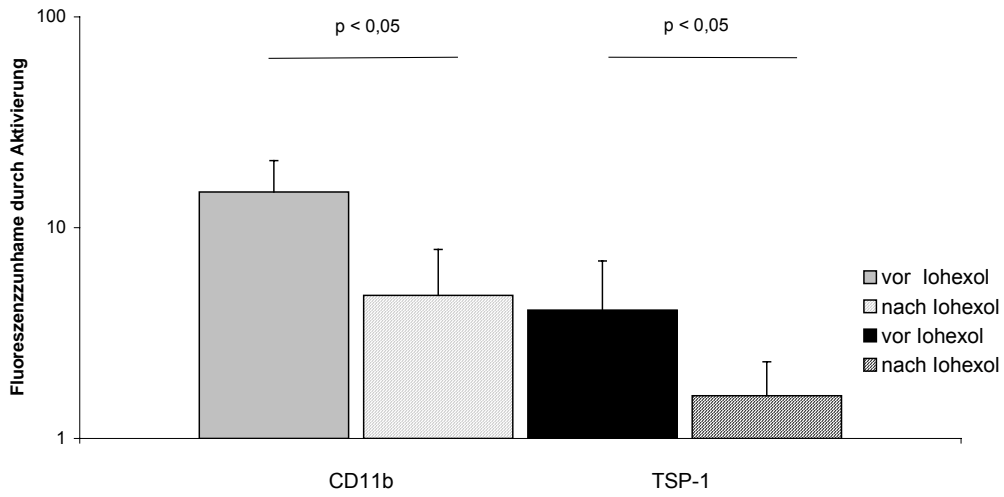
**Abb. 3-10a** Einfluß des Kontrastmittels Iopentol auf die PMNL-Aktivierung nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)



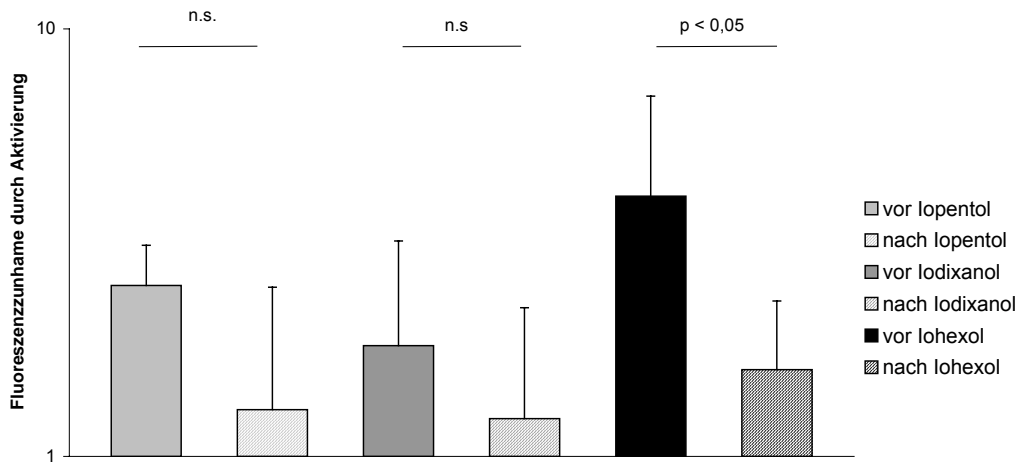
**Abb. 3-10b** Einfluß des Kontrastmittels Iodixanol auf die PMNL-Aktivierung nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)

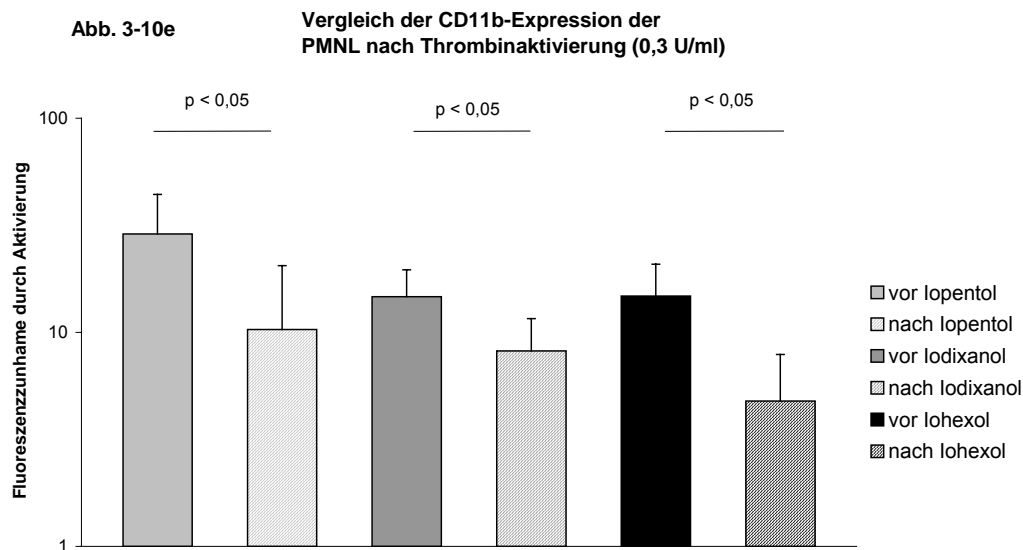


**Abb. 3-10c** Einfluß des Kontrastmittels Iohexol auf die PMNL-Aktivierung nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)



**Abb. 3-10d** Vergleich der TSP-1-Bindung der PMNL nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)



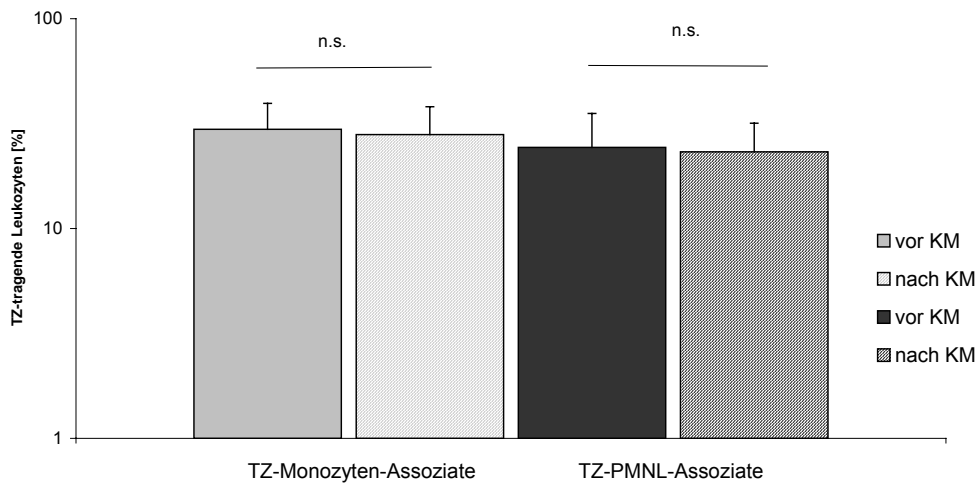


### 3.1.5 Durchflußzytometrische Untersuchung der Thrombozyten-Leukozyten-Assoziation

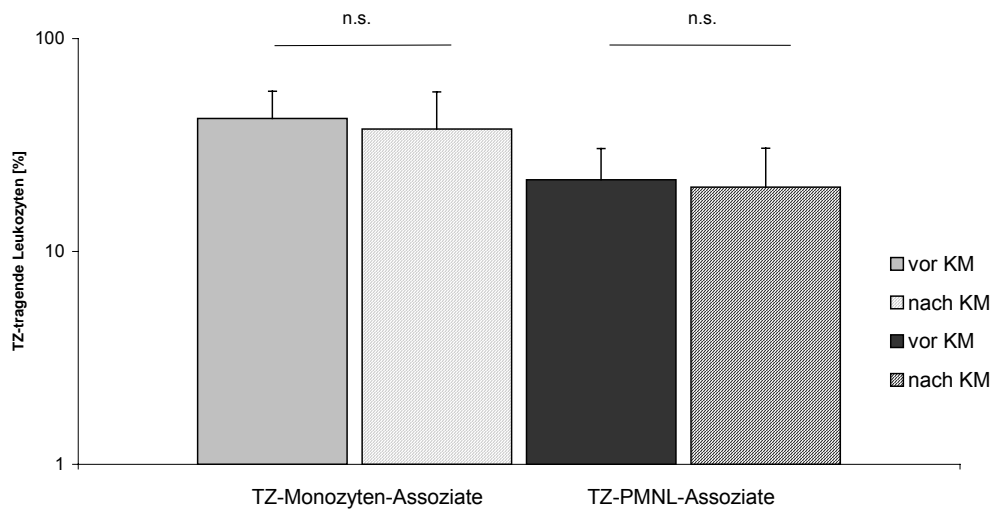
Thrombozyten besitzen die Fähigkeit u.a. durch direkte Interaktion mit Leukozyten einen Entzündungsprozess im Gefäßbett und der Gefäßwand zu initiieren und zu unterhalten [Peters et al., 1997]. Hierzu binden Thrombozyten an Leukozyten und bilden mit diesen Konjugate [Redlich et al., 1997]. Mit einer Vollblutanalyse der Assoziatbildung zwischen Thrombozyten und Monozyten bzw. Neutrophilen, soll untersucht werden, ob und in wie fern die zu charakterisierenden nichtionischen Kontrastmittel Einfluß auf die Konjugatbildung haben.

Ex-vivo zeigte sich, daß unabhängig von der Kontrastmittelgabe erhöhte Assoziationsraten von Thrombozyten und Monozyten bzw. PMNL vorlagen. Diese betragen bei Thrombozyten-Monozyten-Assoziaten 30-40% (Abb. 3-11); bei den PMNL-Konjugaten 15-30%; im Vollblut gesunder Probanden sind typischerweise 10% der Monozyten bzw. PMNL mit Thrombozyten assoziiert, nach Thrombinstimulation ex-vivo maximal 30% (Monozyten) und 20% (PMNL). Bei den Vollblutproben veränderte sich nach Applikation bei keinem der drei Kontrastmittel ex-vivo die Thrombozyten-Leukozyten-Assoziationsrate (Abb. 3-11).

**Abb. 3-11a** Einfluß des Kontrastmittels Iopentol auf die Zahl der Thrombozyten-Leukozyten-Assoziante ex-vivo

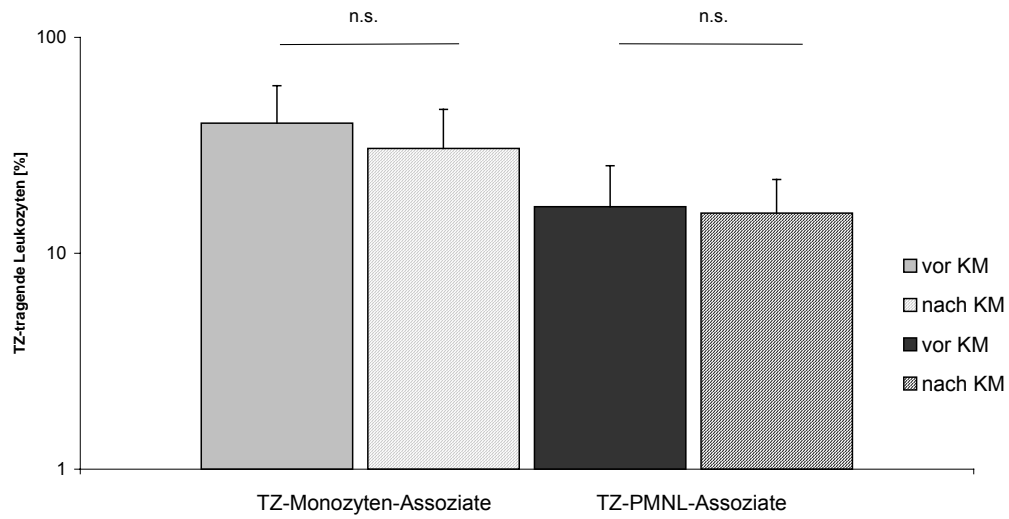


**Abb. 3-11b** Einfluß des Kontrastmittels Iodixaol auf die Zahl der Thrombozyten-Leukozyten-Assoziante ex-vivo

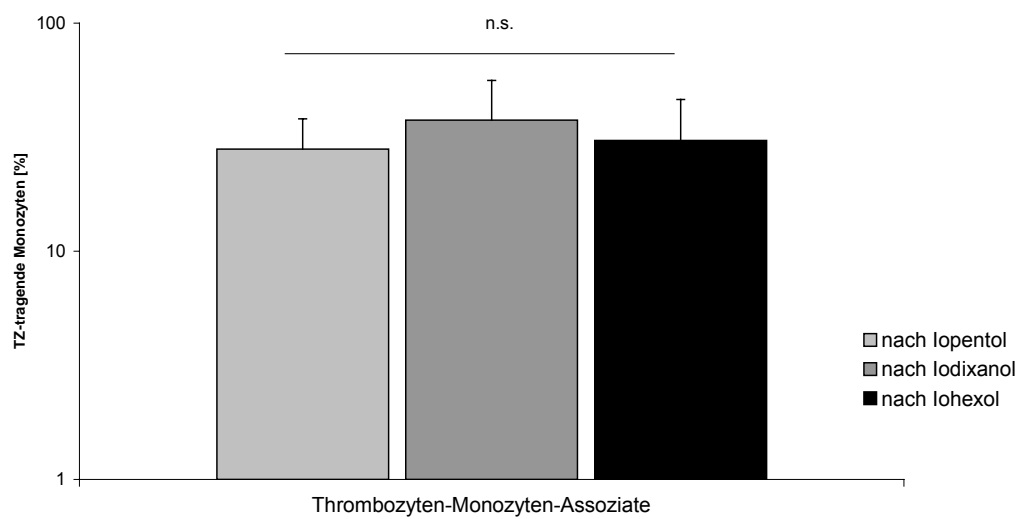




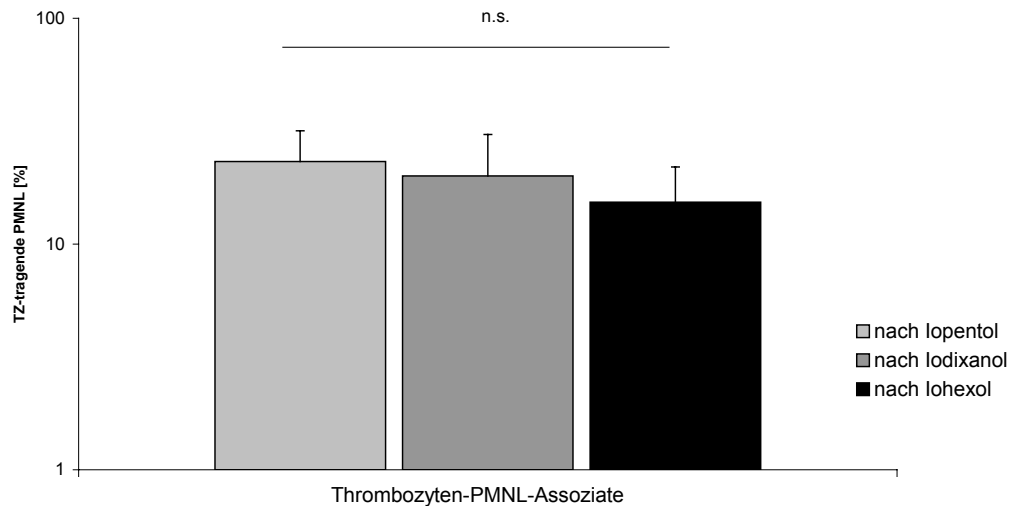
**Abb. 3-11c** Einfluß des Kontrastmittels Iohexol auf die Zahl der Thrombozyten-Leukozyten-Assoziante ex-vivo



**Abb. 3-11d** Vergleich der Thrombozyten-Monozyten-Assoziationsraten ex-vivo nach Kontrastmittelapplikation

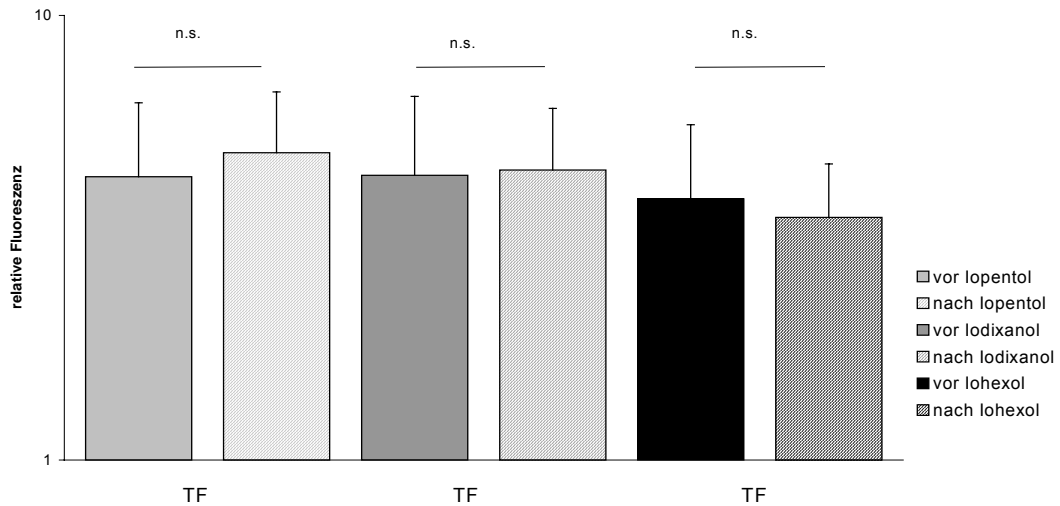


**Abb. 3-11e** Vergleich der Thrombozyten-PMNL-Assoziationsraten ex-vivo nach Kontrastmittelapplikation



### 3.1.6 “Tissue-Factor”-Expression von Thrombozyten-Monozyten-Assoziaten

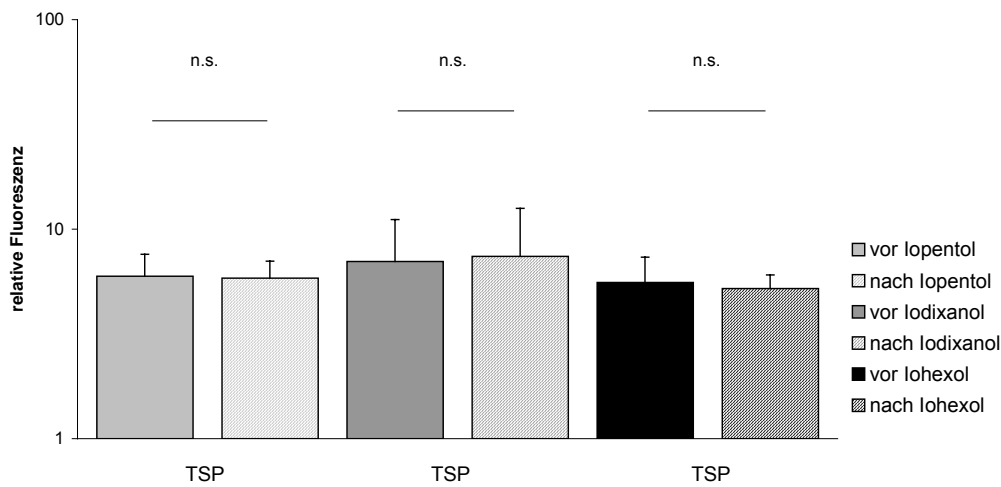
Thrombozyten beeinflussen durch ihre Aktivierung andere Zellen im Blut. So werden z.B. durch Interaktion und Bindung des thrombozytären P-Selektin und anderer möglicher Liganden [Celi et al., 1994] des Thrombozyten, die Monozyten zur de novo-Synthese und zur Expression von Tissue Factor, dem Initiator der plasmatischen Gerinnung [Osterud, 1997], angeregt. Dieser Mechanismus könnte in der Umgebung von Gefäßverletzungen eine Thrombose initiieren oder zumindest unterhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in-vivo der Einfluß der drei nichtionischen Kontrastmittel auf die TF-Bindung der Thrombozyten-Monozyten-Assoziate mittels FACS-Analyse untersucht. Nach Applikation keines der drei Kontrastmittel kommt es in den untersuchten Vollblutproben zu Veränderungen in der TF-Expression der Assoziate (Abb. 3-12).

**Abb. 3-12** "Tissue-Factor"-Expression der Thrombozyten-Monozyten-Assoziat ex-vivo

### 3.1.7 Thrombospondin-1-Bindung der Erythrozyten

TSP vermittelt als adhäsives Glykoprotein Zell-Zell-Interaktionen, so zum Beispiel die Thrombozyten-Aggregation, wenn es auf der Oberfläche exprimiert wird [Leung, 1984; Silverstein et al., 1989; Santoro, 1987]. TSP scheint auch an der Aggregation malaria-infizierter Erythrozyten an der Gefäßwand beteiligt zu sein [Roberts et al., 1985], so daß es in unserem Zusammenhang interessant sein dürfte, die Thrombospondinbeladung der Erythrozyten zu analysieren. Hierbei könnte eine erhöhte Thrombospondinbindung der Erythrozyten nach Kontrastmittelgabe eine Erythrozytenaggregation und damit Veränderungen der rheologischen Eigenschaften bewirken. Die durchflußzytometrischen Analysen der Thrombospondinbindung der Erythrozyten zeigen, daß es ex-vivo zu keiner Veränderung der TSP-1-Beladung in den Proben nach Injektion der Kontrastmittel im Vergleich zur TSP-1-Bindung in den Proben vor Kontrastmittelgabe kommt (Abb. 3-13). Dies trifft für alle drei nichtionischen Substanzen zu.

Abb. 3-13 Thrombospondin-1-Bindung der Erythrozyten ex-vivo



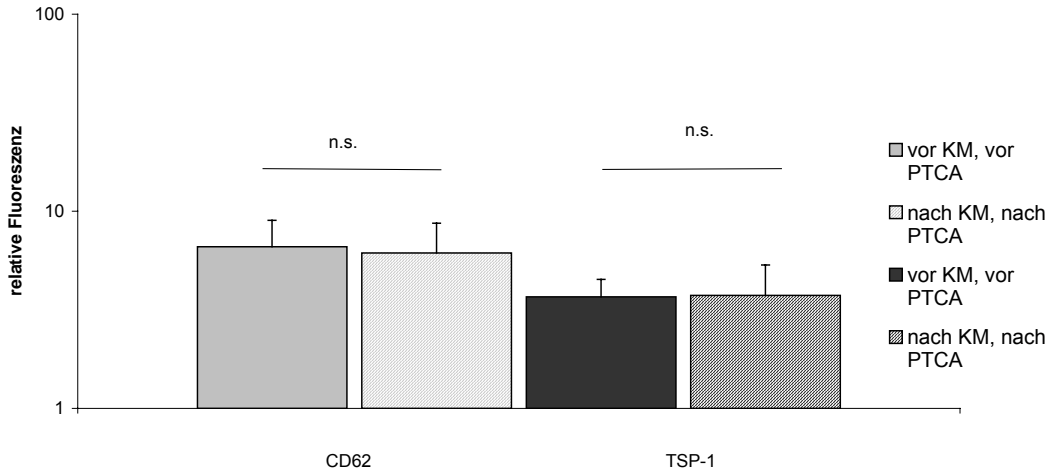
## 3.2 Ergebnisse der durchflußzytometrischen Untersuchungen der Kontrastmittelwirkung während PTCA

### 3.2.1 ex-vivo Aktivierungszustand der Thrombozyten

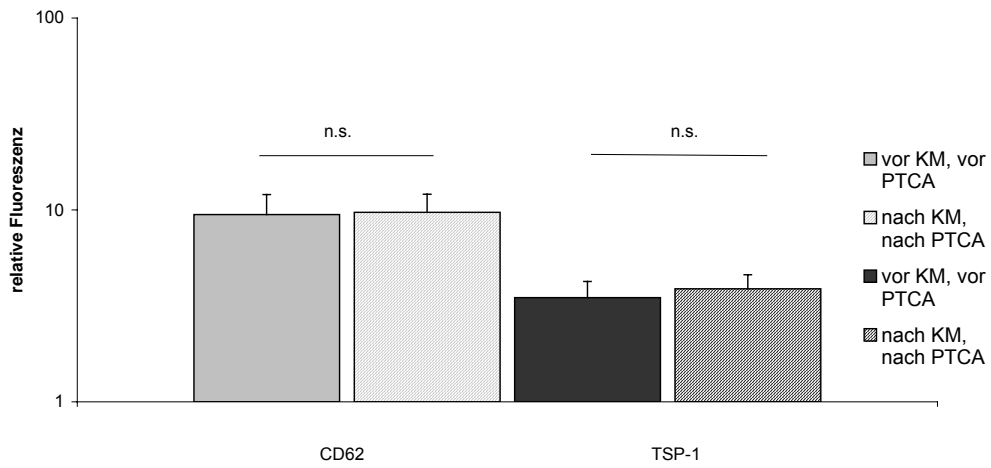
#### 3.2.1.1 $\alpha$ -Granula-Sekretion der Thrombozyten

Die thrombozytäre  $\alpha$ -Granula-Sekretion wurde anhand der CD62-Expression und TSP-1-Bindung an den Thrombozyten quantifiziert, um den Einfluß der drei Kontrastmittel während traumatisierender Eingriffe, wie z.B. der PTCA, zu untersuchen. Es zeigte sich in den Proben nach PTCA mit den nichtionischen Kontrastmitteln weder bei Iopentol, noch bei Iodixanol und Iohexol eine veränderte CD62-Expression und TSP-1-Bindung ex-vivo im Vergleich zu den Proben vor PTCA und Kontrastmittelgabe (Abb. 3-14). In den Proben nach Durchführung der PTCA mit dem nichtionischen Monomer Iopentol fiel die CD62-Expression im Vergleich zu den Proben, bei denen die PTCA mit einem der beiden anderen Substanzen durchgeführt worden war, geringer aus (Abb. 3-14d).

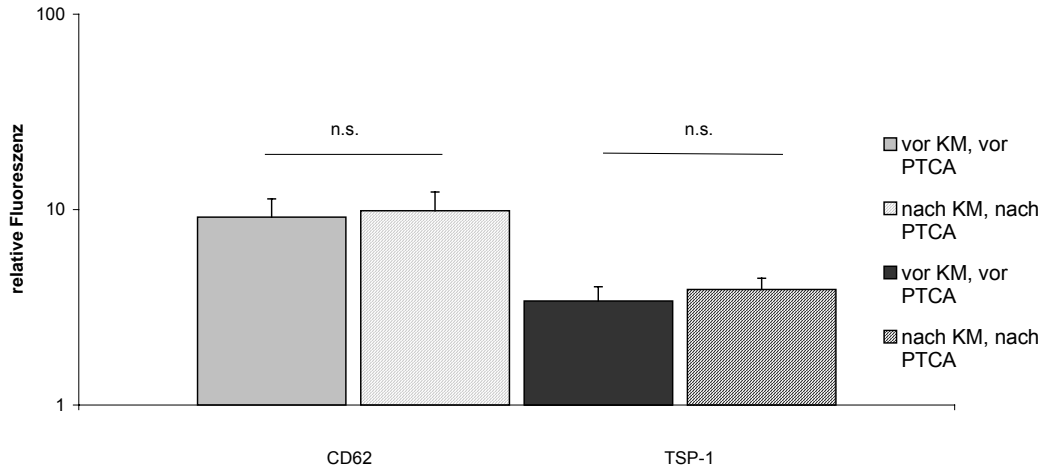
**Abb. 3-14a** Einfluß von Kontrastmittel Iopentol und PTCA auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Thrombozyten



**Abb. 3-14b** Einfluß von Kontrastmittel Iodixanol und PTCA auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Thrombozyten



**Abb. 3-14c** Einfluß von Kontrastmittel Iohexol und PTCA auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Thrombozyten



**Abb. 3-14d** Vergleich der ex-vivo Thrombozytenaktivierung unter PTCA

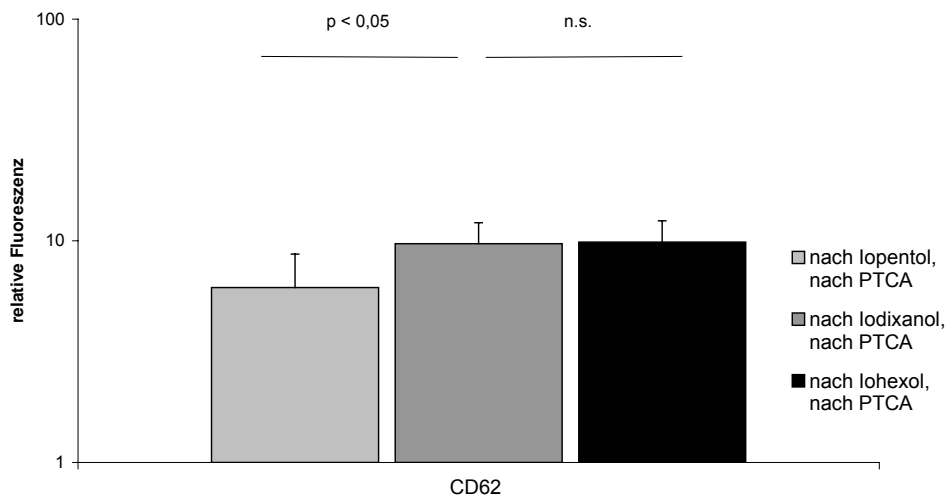
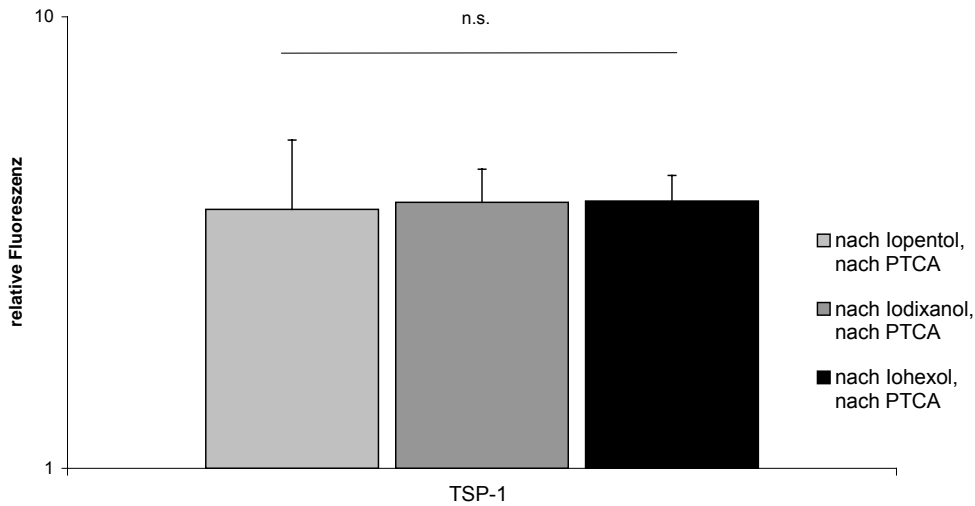


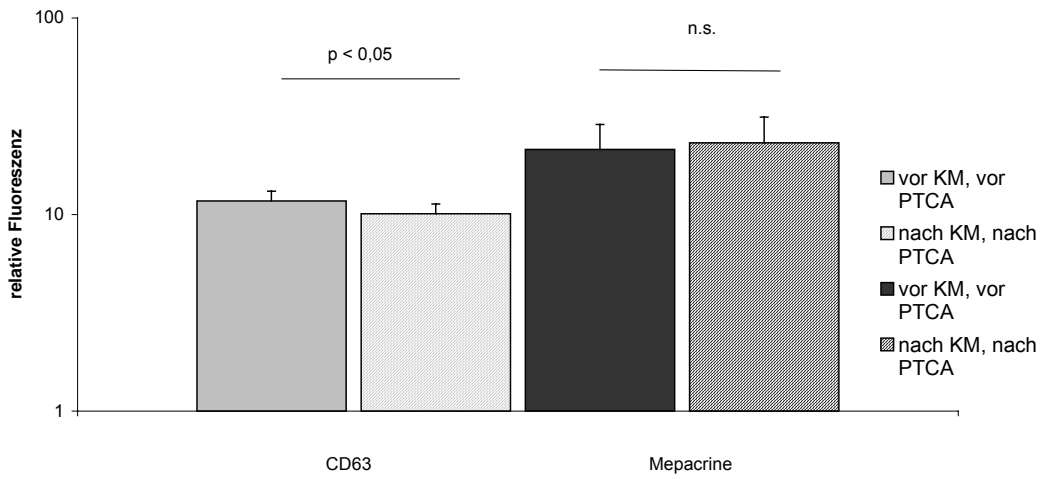
Abb. 3-14e Vergleich der ex-vivo Thrombozytenaktivierung unter PTCA



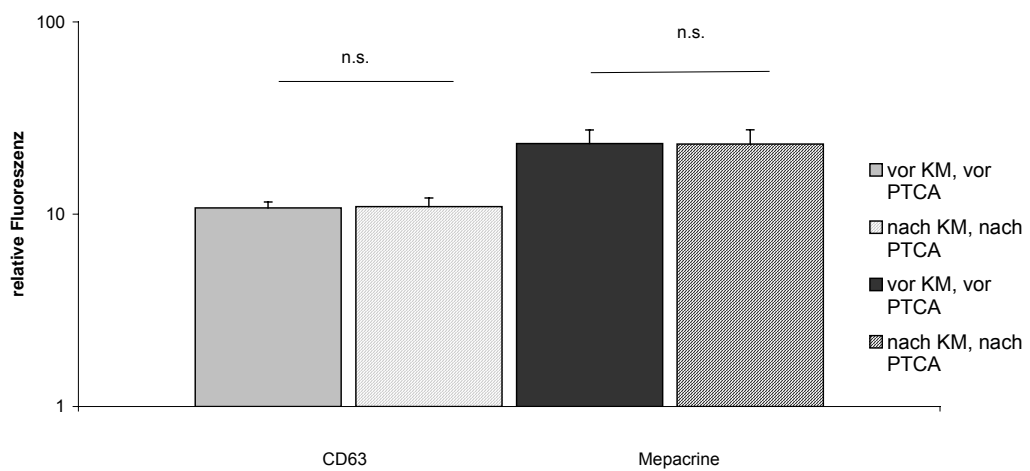
### 3.2.1.2 „Dense-bodies“-Sekretion der Thrombozyten

Die „dense-bodies“-Sekretion wurde, wie Eingangs bei den Kontrastmitteluntersuchungen während Koronarangiographie, anhand der CD63-Expression und der Mepacrine-Aufnahme und -Abgabe ex-vivo quantifiziert. Die Proben, die nach PTCA mit dem Kontrastmittel Iopentol entnommen wurden, zeigten eine geringere CD63-Expression verglichen mit der CD63-Expression in den Proben, die vor PTCA und Iopentolgabe entnommen wurden (Abb. 3-15a). Die Proben, die nach PTCA und Iodixanol bzw. Iohexolgabe untersucht wurden, zeigten vergleichbare CD63-Expression im Vergleich zu den vor Intervention und Kontrastmittelapplikation entnommenen Proben (Abb. 3-15 a,b). Die Mepacrineaufnahme in die „dense-bodies“ blieb in den Proben unbeeinflusst von Kontrastmittelgabe und PTCA; hier wurden bei allen drei Substanzen in den Blutproben vergleichbare Werte vor und nach Kontrastmittelinjektion und Koronarintervention gemessen (Abb. 3-15).

**Abb. 3-15a** Einfluß von Kontrastmittel Iopentol und PTCA auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Thrombozyten

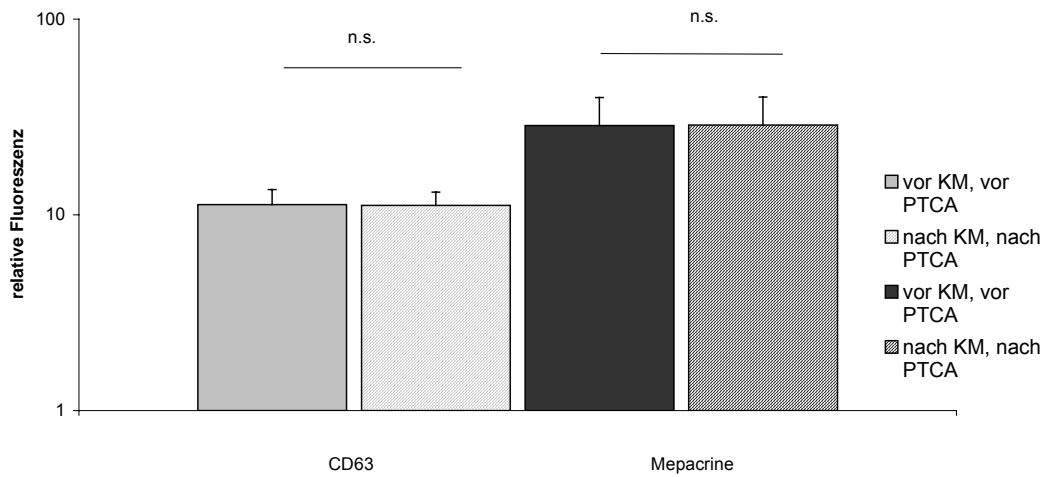


**Abb. 3-15b** Einfluß von Kontrastmittel Iodixanol und PTCA auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Thrombozyten





**Abb. 3-15c** Einfluß von Kontrastmittel Iohexol und PTCA auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Thrombozyten



**Abb. 3-15d** Vergleich der ex-vivo Thrombozytenaktivierung unter PTCA

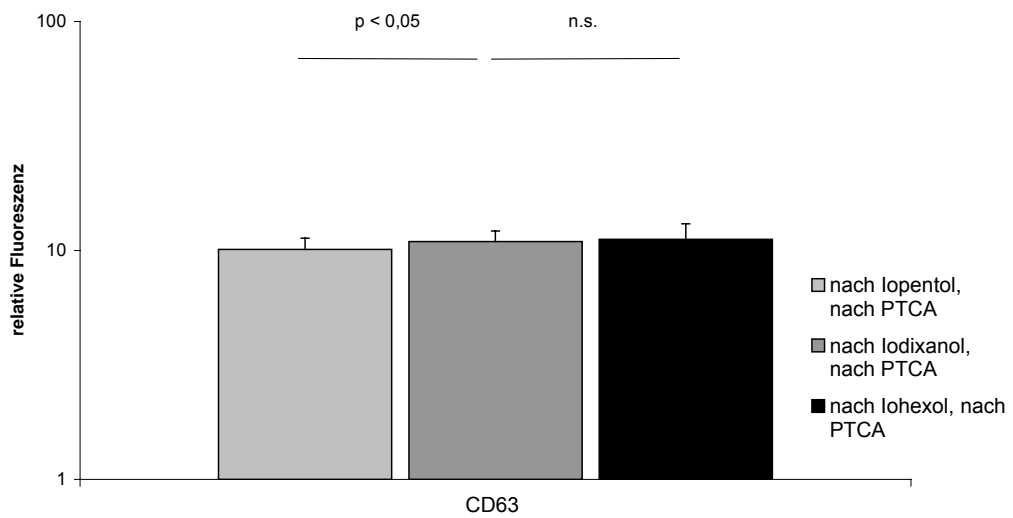
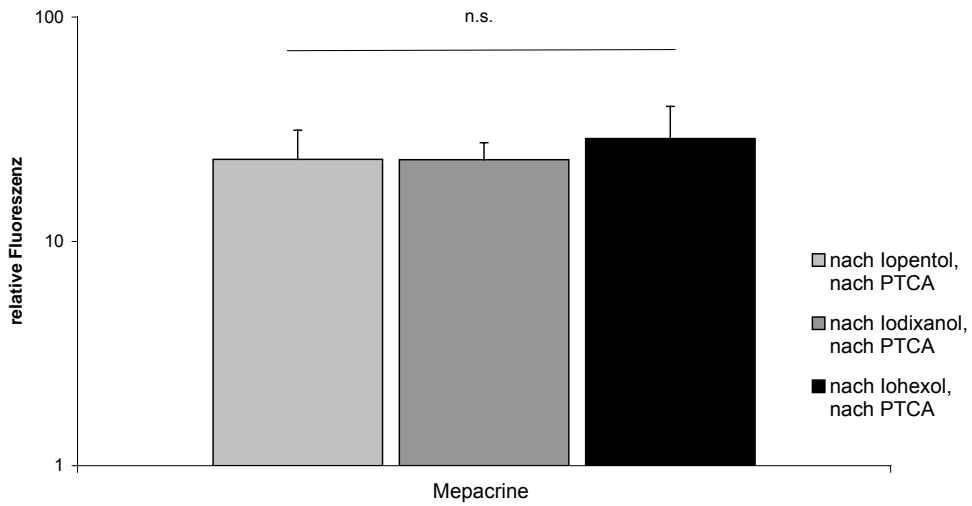


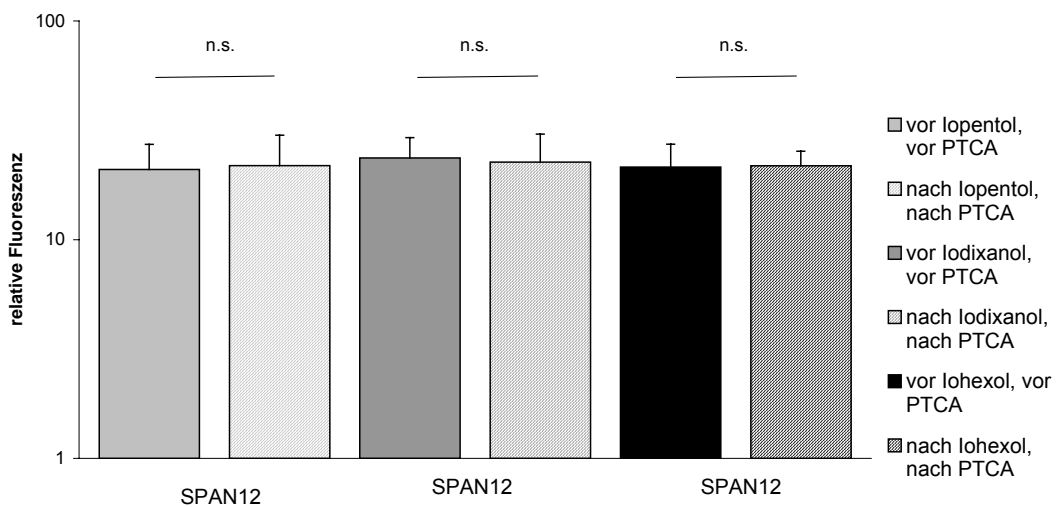
Abb. 3-15e Vergleich der ex-vivo Thrombozytenaktivierung unter PTCA



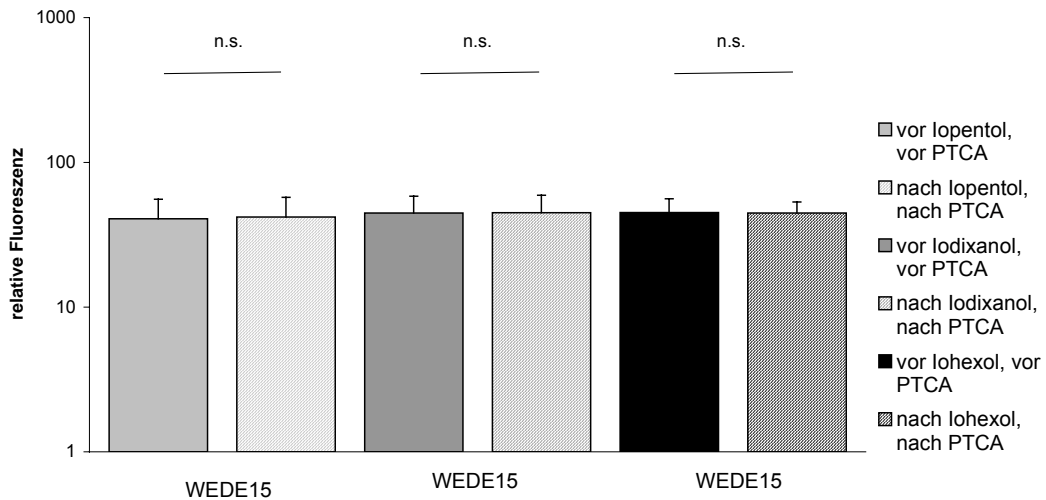
### 3.2.1.3 Spaltungs- und Internalisierungszustand des Thrombinrezeptors PAR-1

An Abb. 3-16 ist ersichtlich, daß es im Verlauf der PTCA mit Kontrastmittelgabe zu keiner Veränderung der Antikörperbindungsfähigkeit der PAR-1 Antikörper-Klone SPAN12 und WEDE15 an die Thrombozytenoberfläche gekommen ist.

Abb. 3-16a Spaltungs- und Internalisierungszustand des Thrombinrezeptors PAR-1 unter PTCA ex-vivo



**Abb. 3-16b** Spaltungs- und Internalisierungszustand des Thrombinrezeptors PAR-1 unter PTCA ex-vivo



### 3.2.1.4 vWF- und Fibrinogenbindung der Thrombozyten

Die ex-vivo vWF- und Fibrinogenbindung der Thrombozyten wurde in den Proben vor und nach PTCA mit den drei nichtionischen Kontrastmitteln durchflußzytometrisch untersucht. Abb. 3-17 ist zu entnehmen, daß es zu keiner Veränderung der vWF- bzw. Fibrinogenbindung in den Proben nach PTCA und Kontrastmittelgabe im Vergleich zu den Proben vor PTCA und Kontrastmittelgabe kommt.

**Abb. 3-17a** von Willebrand-Faktor-Bindung unter PTCA ex-vivo

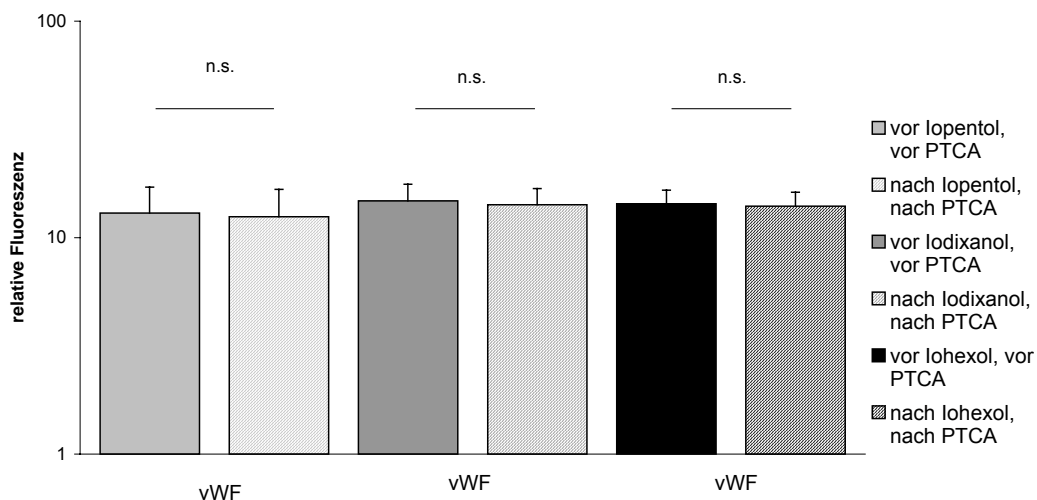
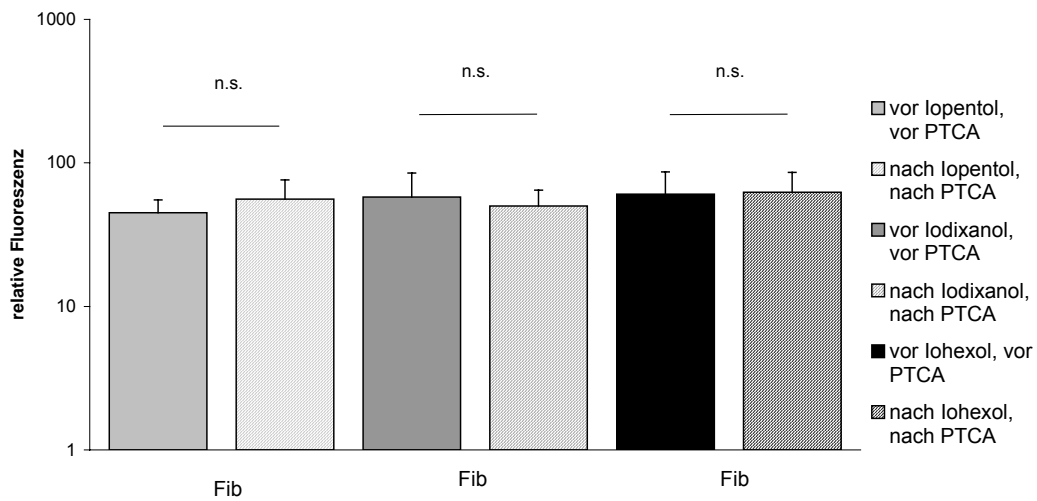


Abb. 3-17b Fibrinogen-Bindung unter PTCA ex-vivo



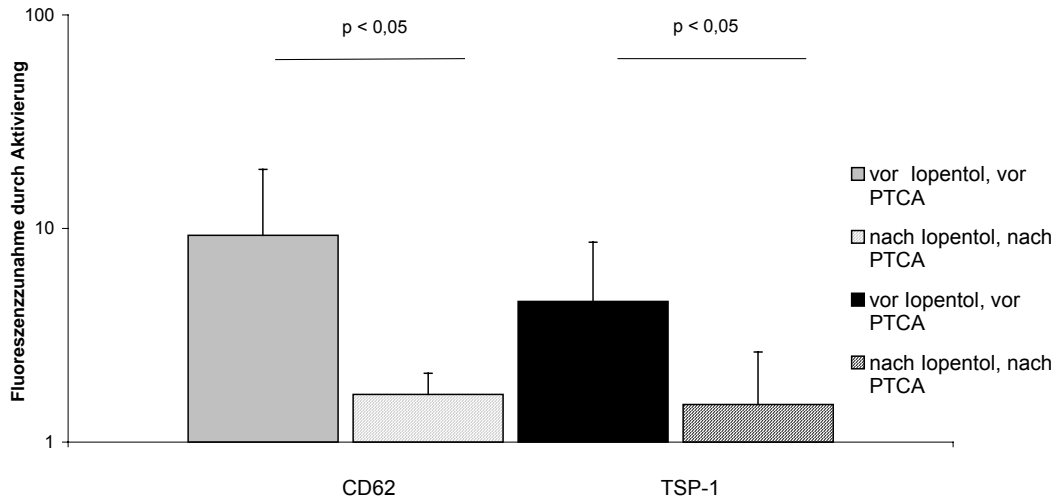
## 3.2.2 Durchflußzytometrische Untersuchungen zur thrombin-induzierten Thrombozytenaktivierung

### 3.2.2.1 $\alpha$ -Granula-Sekretion der Thrombozyten

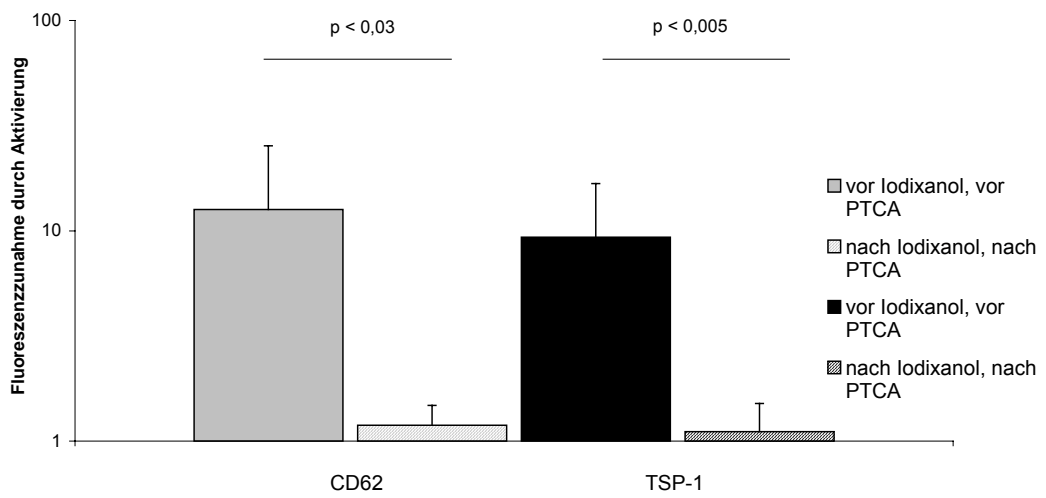
Die Reaktivität und Sekretionsfähigkeit der Thrombozyten vor und nach PTCA mit den jeweiligen Kontrastmitteln wurde durchflußzytometrisch untersucht. Hierzu wurden Blutproben, die vor und nach der Intervention entnommen wurden, in-vitro mit 0,3 U/ml Thrombin stimuliert. Die Fluoreszenzsignale wurden analog zu den Untersuchungen der Koronarangiographie-Proben als Differenz zu denen, die durch den ex-vivo-Aktivierungszustand verursacht wurden, dargestellt.

An Abb. 3-18 ist ersichtlich, daß es in den Proben, die nach PTCA unter Verwendung eines der drei Kontrastmittel abgenommen wurden, zu einer Inhibition sowohl der thrombin-induzierten CD62-Expression, als auch der TSP-1-Bindung kam, unabhängig von der Art des applizierten Kontrastmittels.

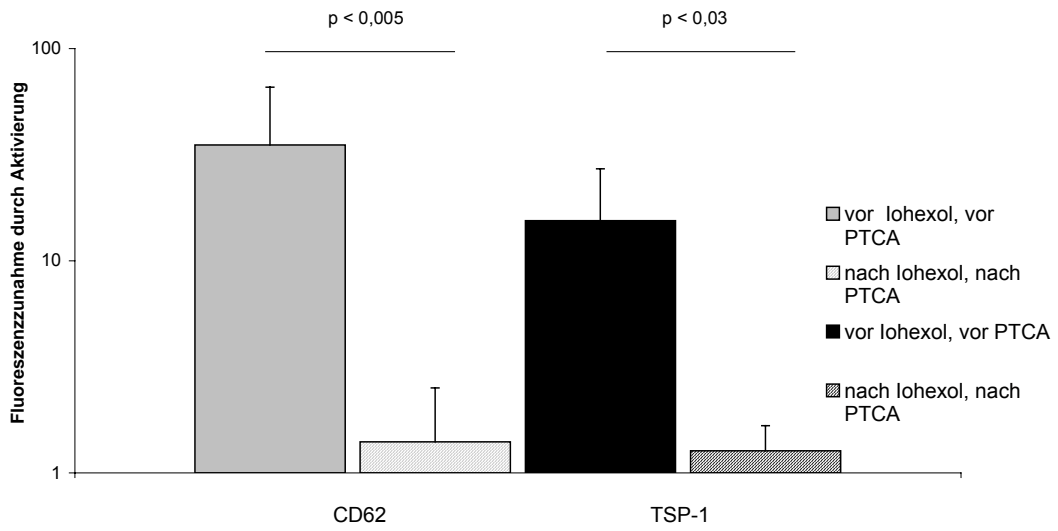
**Abb. 3-18a** Einfluß von Kontrastmittel Iopentol und PTCA auf die Thrombozyten-Aktivierung nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml) in-vitro



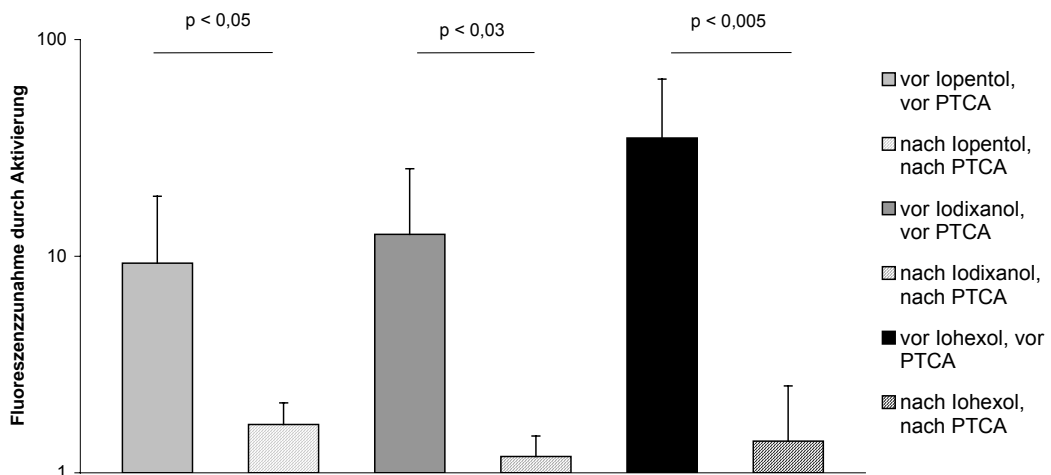
**Abb. 3-18b** Einfluß von Kontrastmittel Iodixanol und PTCA auf die Thrombozyten-Aktivierung nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml) in-vitro



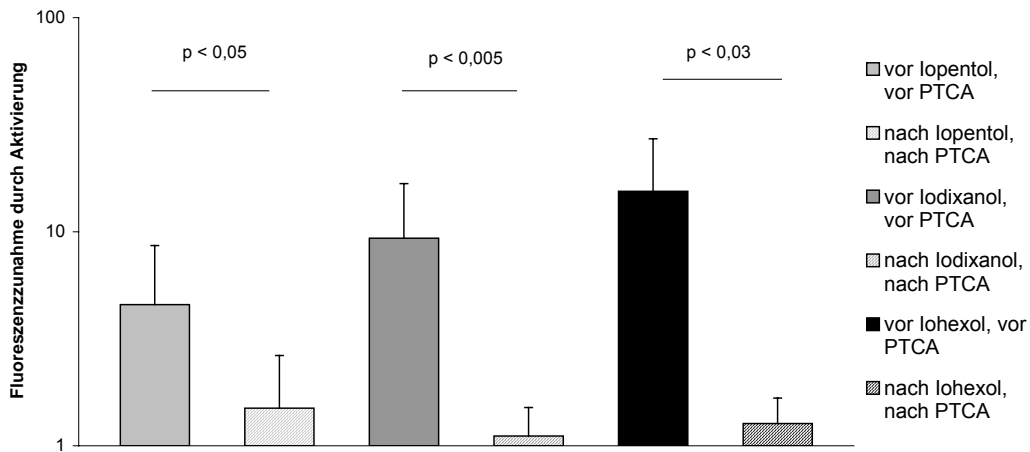
**Abb. 3-18c** Einfluß von Kontrastmittel Iohexol und PTCA auf die Thrombozyten-Aktivierung nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml) in-vitro



**Abb. 3-18d** Vergleich CD62-Expression der Thrombozyten unter PTCA nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml) in-vitro



**Abb. 3-18e** Vergleich TSP-1-Bindung der Thrombozyten unter PTCA nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml) in-vitro

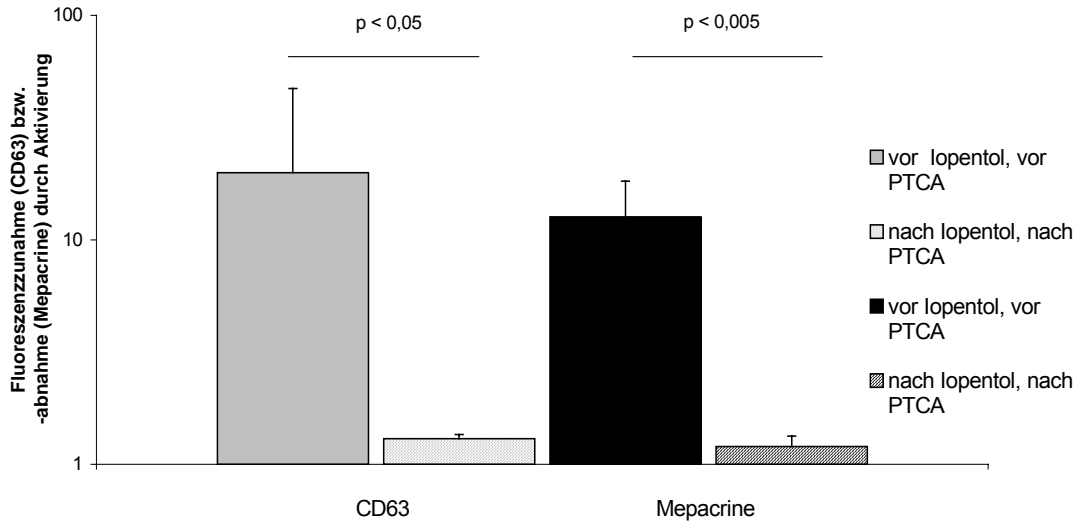


### 3.2.2.2 „Dense-bodies“ Sekretion der Thrombozyten

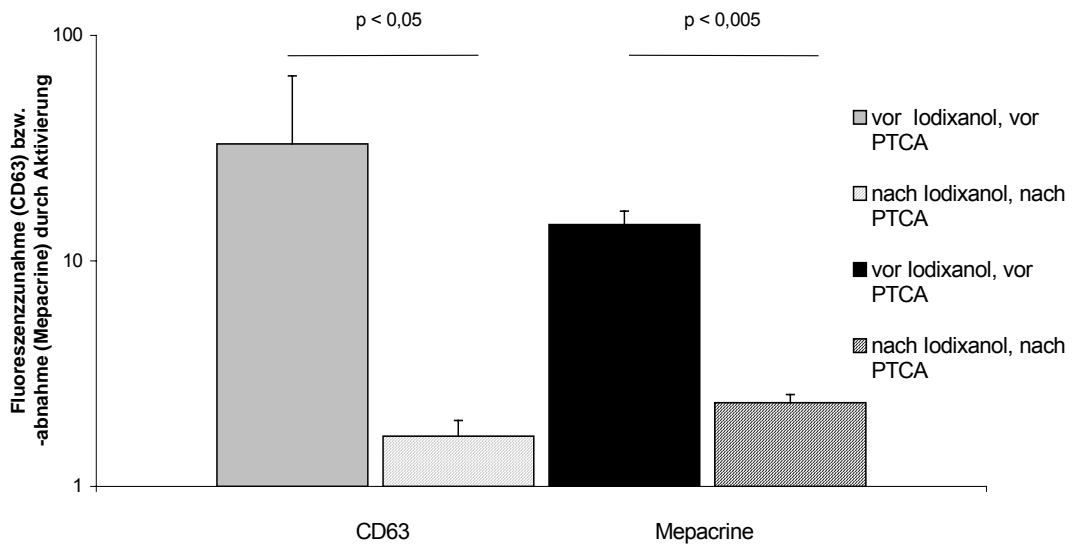
Die „dense-bodies“-Sekretion wurde anhand der CD63-Expression und der Mepacrine-Abgabe nach Thrombinstimulation in-vitro durchflußzytometrisch untersucht.

Nach Thrombinaktivierung in-vitro zeigte sich in allen Proben, die nach PTCA mit einem der drei zu analysierenden Kontrastmitteln abgenommen wurden, eine signifikant reduzierte CD63-Expression (Abb. 3-19). Die thrombin-induzierte Mepacrine-Abgabe in den Proben, die nach PTCA unter Verwendung eines der drei Substanzen abgenommen wurden, stellte sich ebenfalls stark reduziert dar (Abb. 3-19).

**Abb. 3-19a** Einfluß von Kontrastmittel Iopentol und PTCA auf die Thrombozyten-Aktivierung nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml) in-vitro

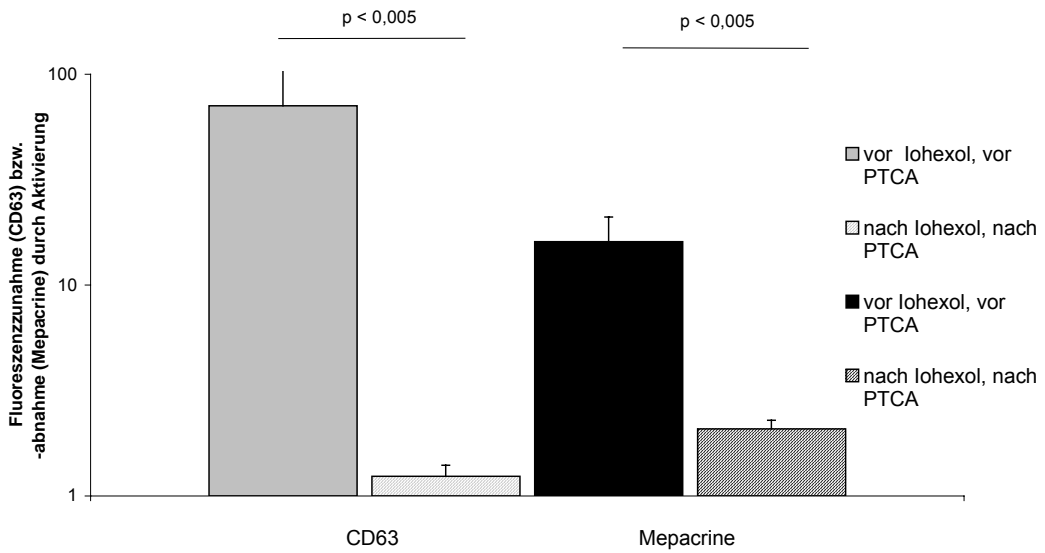


**Abb. 3-19b** Einfluß von Kontrastmittel Iodixanol und PTCA auf die Thrombozyten-Aktivierung nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml) in-vitro

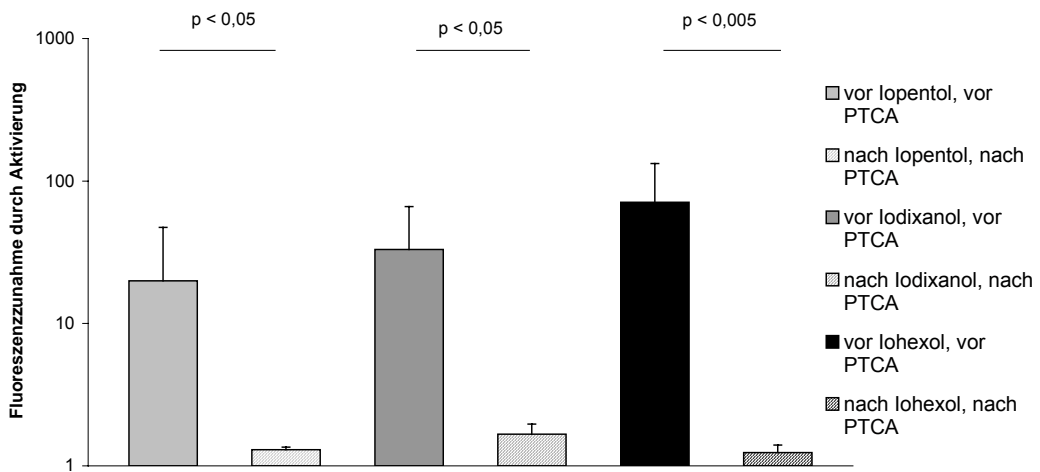


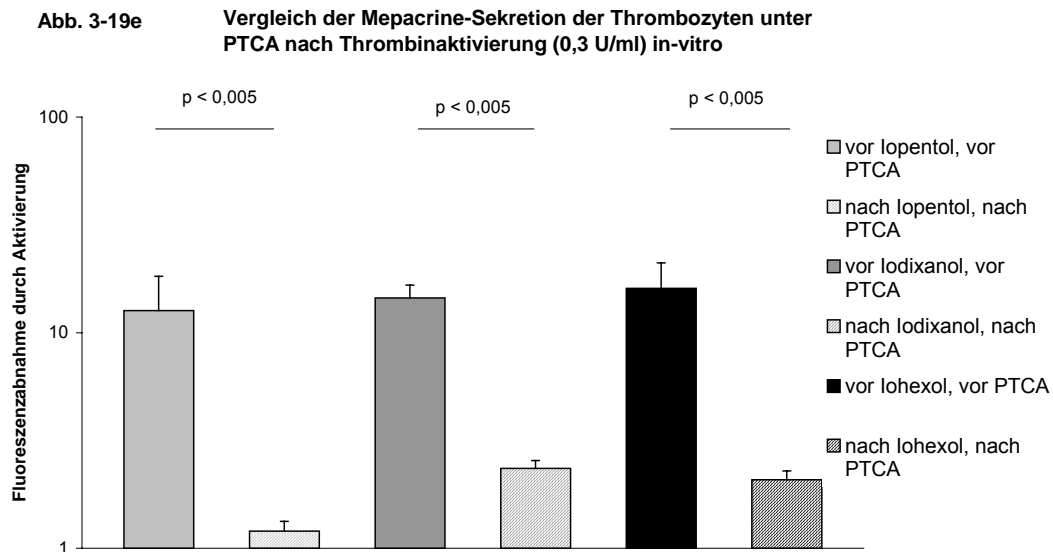


**Abb. 3-19c** Einfluß von Kontrastmittel Iohexol und PTCA auf die Thrombozyten-Aktivierung nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml) in-vitro



**Abb. 3-19d** Vergleich der CD63-Expression der Thrombozyten unter PTCA nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml) in-vitro



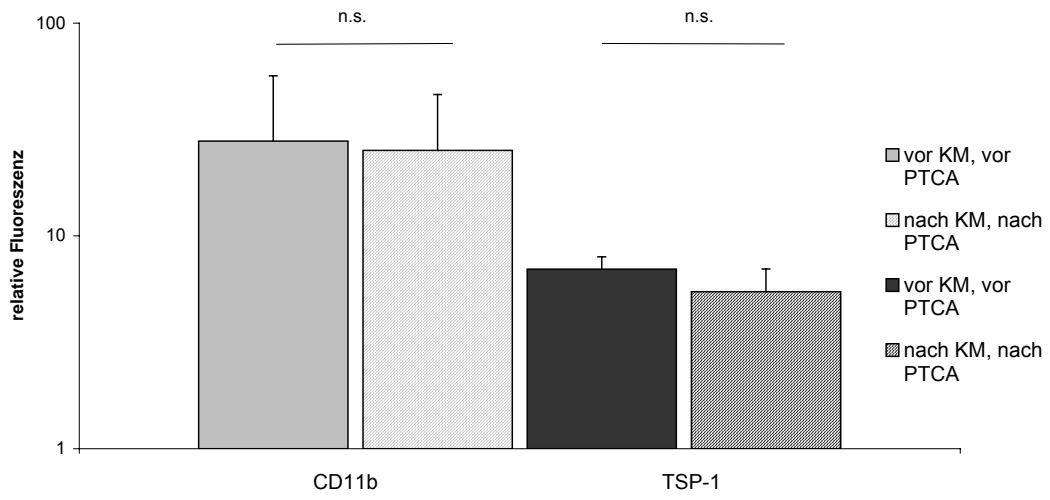


### 3.2.3 Durchflußzytometrische Untersuchungen zum ex-vivo Aktivierungszustand der Leukozyten

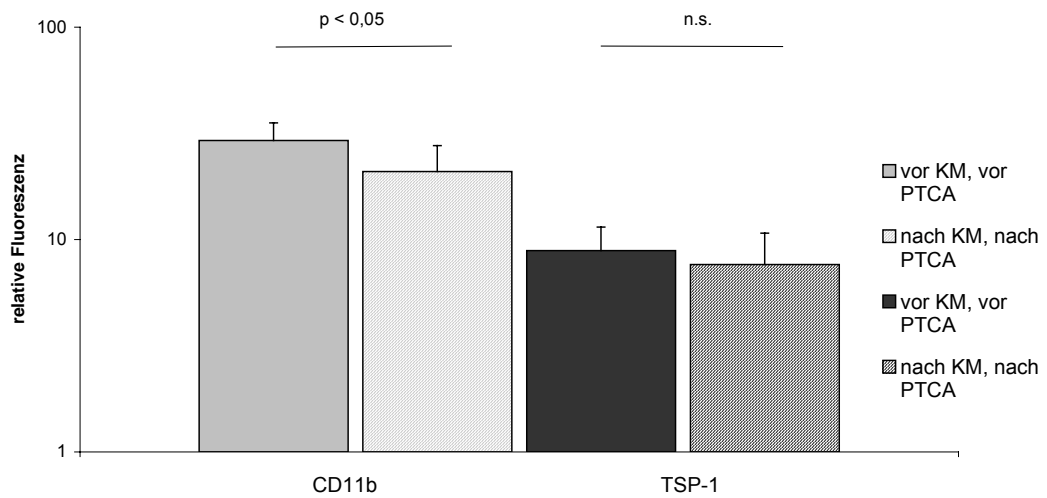
#### 3.2.3.1 Aktivierungszustand der Monozyten

Der Aktivierungsgrad der Monozyten wurde auch hier mit Hilfe der CD11b-Expression und der TSP-1-Bindung an die Monozyten ermittelt. Unter PTCA mit Injektion der Kontrastmittel Iodixanol und Iohexol kam es in den Blutproben, die nach Intervention und Kontrastmittelgabe abgenommen wurden, zu einer signifikanten Abnahme der CD11b-Expression ex-vivo (Abb. 3-20b,c), wobei in den Proben nach Applikation von Iopentol während PTCA keine Veränderung der CD11b-Expression der Monozyten zu beobachten war (Abb. 3-20a). Bezüglich der TSP-1-Bindung der Monozyten kam es in den Proben, die nach Applikation von Iohexol während PTCA abgenommen wurden, zu einer signifikanten Abnahme der TSP-1-Bindung der Monozyten ex-vivo, wohingegen in den Proben, bei denen die Intervention mit Iopentol bzw. Iodixanol durchgeführt wurde, keine Änderung der TSP-1-Bindung zu beobachten war (Abb. 3-20).

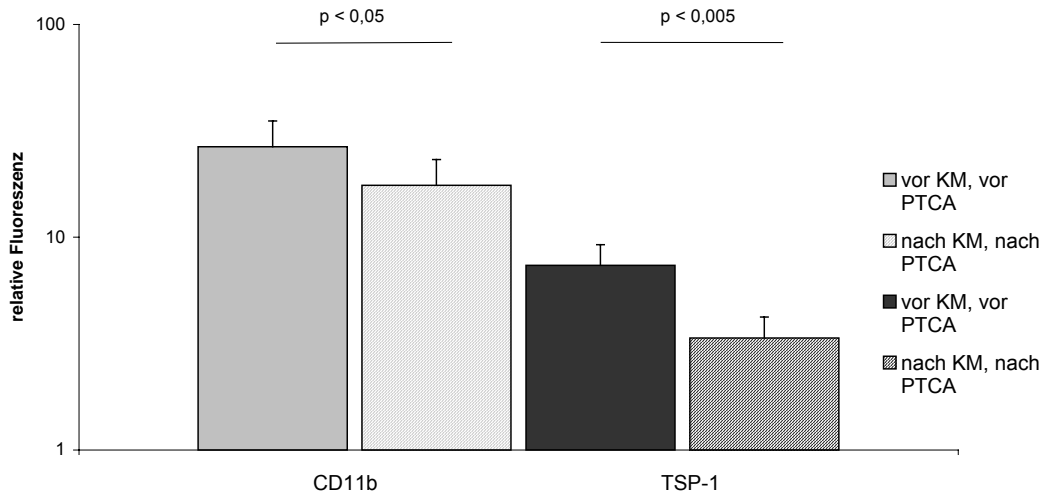
**Abb. 3-20a** Einfluß von Kontrastmittel Iopentol und PTCA auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Monozyten



**Abb. 3-20b** Einfluß von Kontrastmittel Iodixanol und PTCA auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Monozyten



**Abb. 3-20c** Einfluß von Kontrastmittel Iohexol und PTCA auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Monozyten



**Abb. 3-20d** Vergleich der ex-vivo Monozytenaktivierung unter PTCA

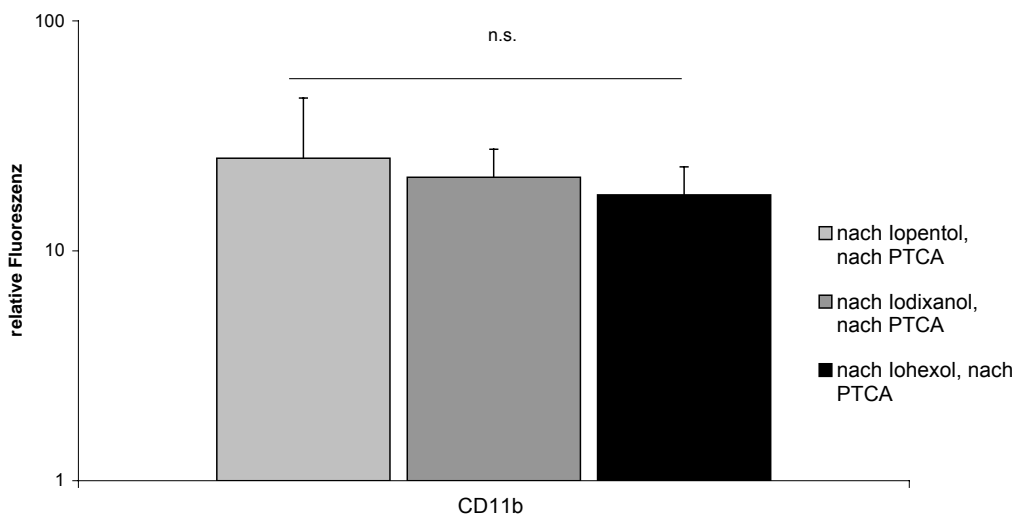
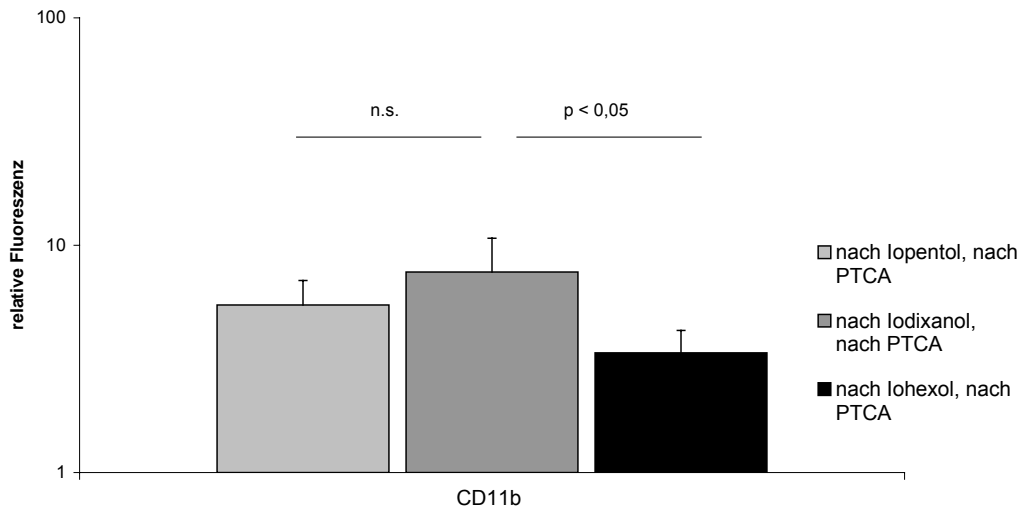


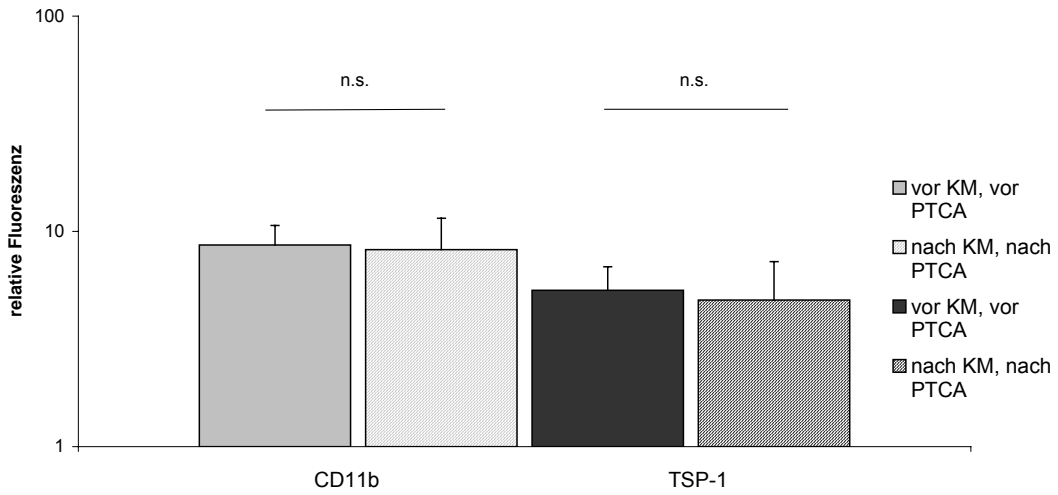
Abb. 3-20e Vergleich der ex-vivo Monozytenaktivierung unter PTCA



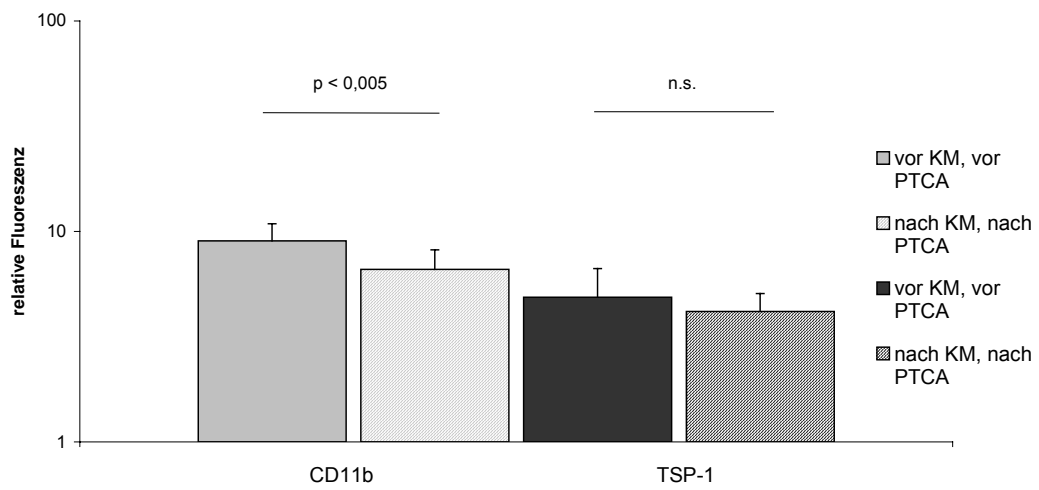
### 3.2.3.2 Aktivierungszustand der PMNL

Der Aktivierungsgrad der PMNL wurde, wie zuvor der der Monozyten, anhand der CD11b-Expression und der TSP-1-Bindung der neutrophilen Granulozyten bestimmt. Ex-vivo kam es in den Proben, die nach Intervention abgenommen wurden, zu einer signifikanten Abnahme der CD11b-Expression der PMNL unter Applikation der Kontrastmittel Iodixanol und Iohexol während PTCA (Abb. 3-21b,c). In den Proben, bei denen die PTCA unter Verwendung des nichtionischen Monomers Iopentol durchgeführt wurde, konnte keine Änderung der CD11b-Expression beobachtet werden (Abb. 3-21a). Die TSP-1-Bindung der PMNL veränderte sich in den Proben nach Applikation aller drei Kontrastmittel nach PTCA ex-vivo nicht im Vergleich zu den Werten in den Proben, die vor Kontrastmittelgabe und PTCA abgenommen wurden (Abb. 3-21).

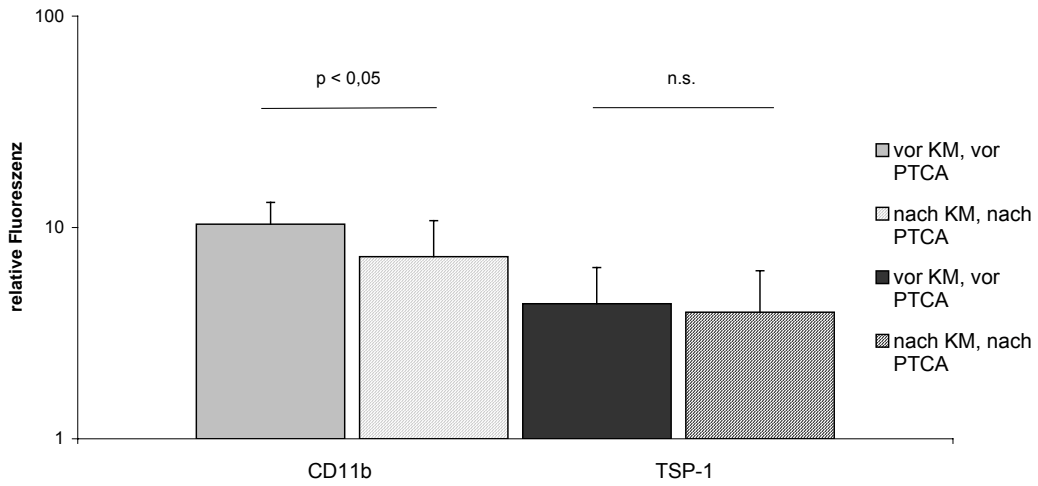
**Abb. 3-21a** Einfluß von Kontrastmittel Iopentol und PTCA auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der PMNL



**Abb. 3-21b** Einfluß von Kontrastmittel Iodixanol und PTCA auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der PMNL



**Abb. 3-21c** Einfluß von Kontrastmittel Iohexol und PTCA auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der PMNL



**Abb. 3-21d** Vergleich der ex-vivo PMNL-Aktivierung unter PTCA

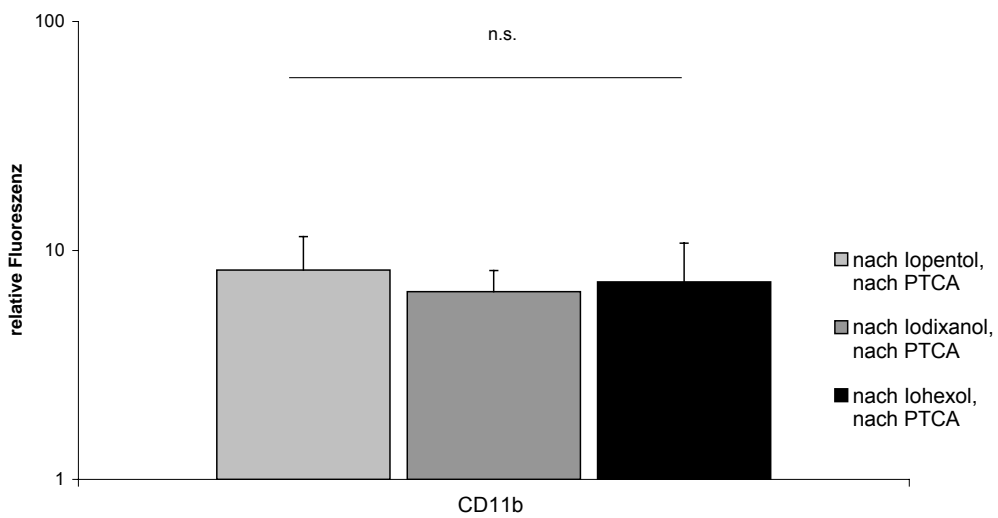
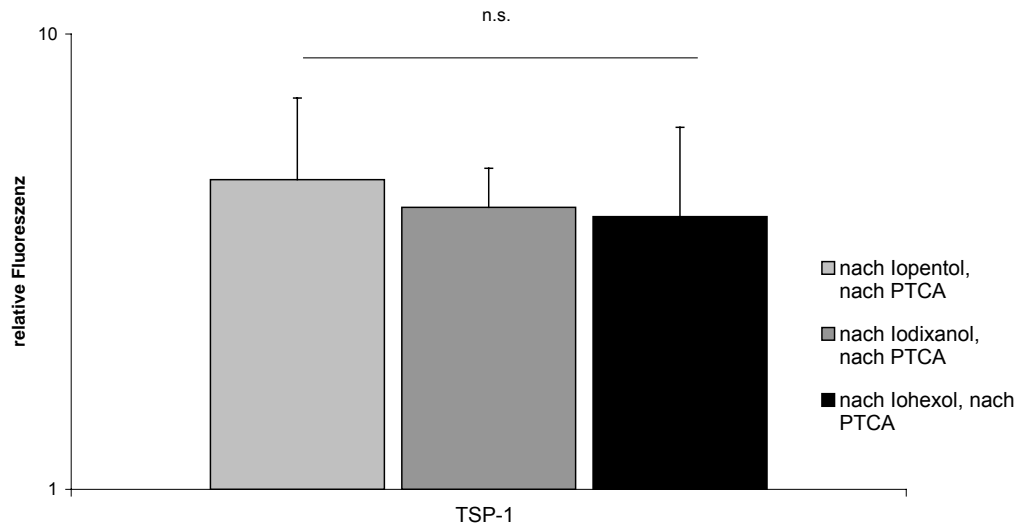


Abb. 3-21e Vergleich der ex-vivo PMNL-Aktivierung unter PTCA



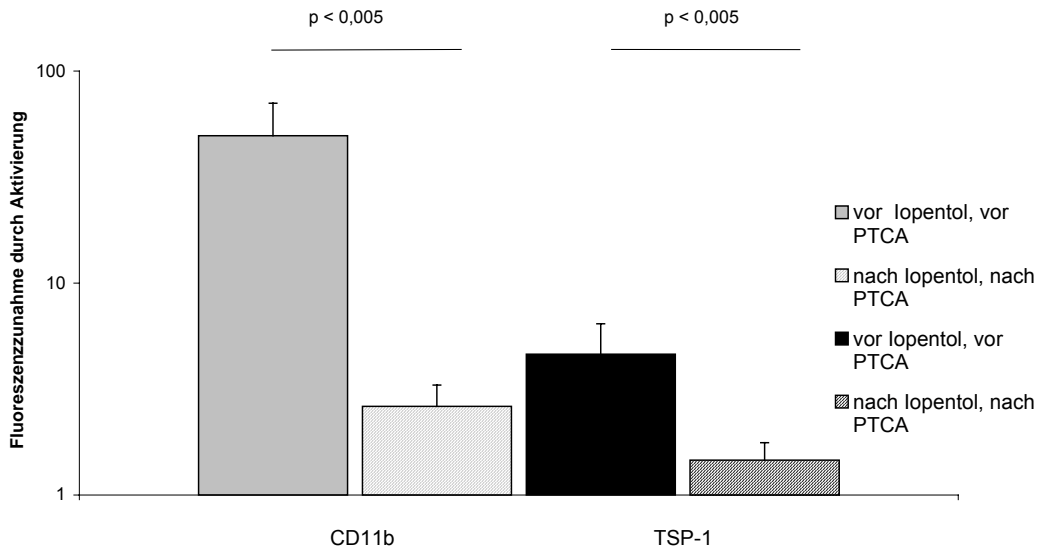
### 3.2.4 Durchflußzytometrische Untersuchungen zur thrombin-induzierten Leukozytenaktivierung

#### 3.2.4.1 In-vitro-induzierte Monozytenaktivierung

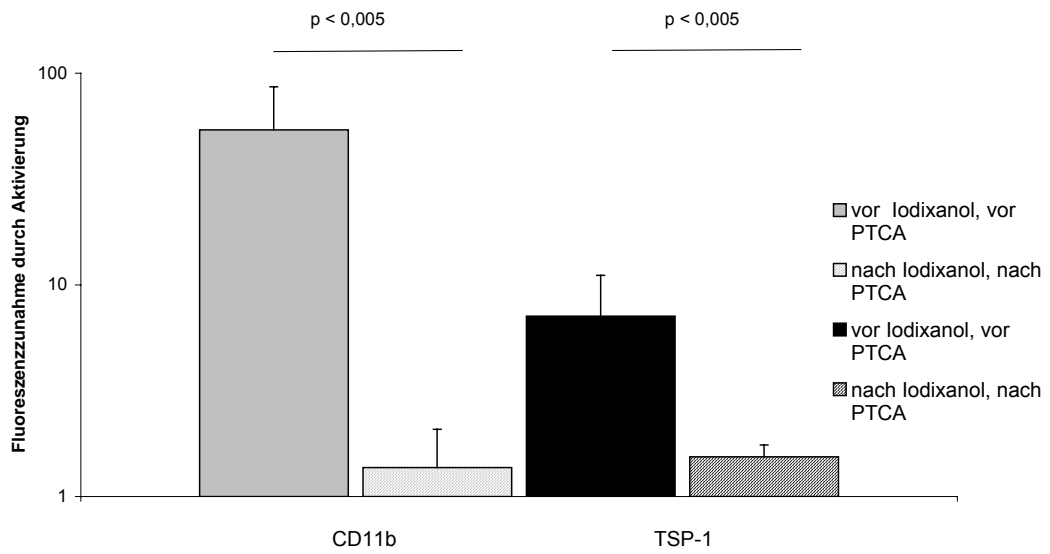
Die thrombin-induzierte CD11b-Expression auf Monozyten wurde ebenfalls im Vollblut durchflußzytometrisch erfasst. In den Proben, die nach PTCA abgenommen wurden, kam es nach Applikation sowohl von Iopentol, als auch nach Iodixanol und Iohexol zu einer signifikanten Abnahme der CD11b-Expression nach Stimulation mit 0,3 U/ml Thrombin in-vitro (Abb. 3-22). Die Detektion der TSP-1-Bindung der Monozyten erfolgte ebenfalls nach Thrombin-Stimulation im Vollblut. Abb. 3-22 ist zu entnehmen, daß die Anzahl TSP-1-bindender Monozyten nach Thrombin-Stimulation in den Proben, die nach PTCA mit einem der drei Kontrastmittel genommen wurden, nur minimal gesteigert werden konnte im Vergleich zu den Proben, die vor Intervention untersucht wurden.

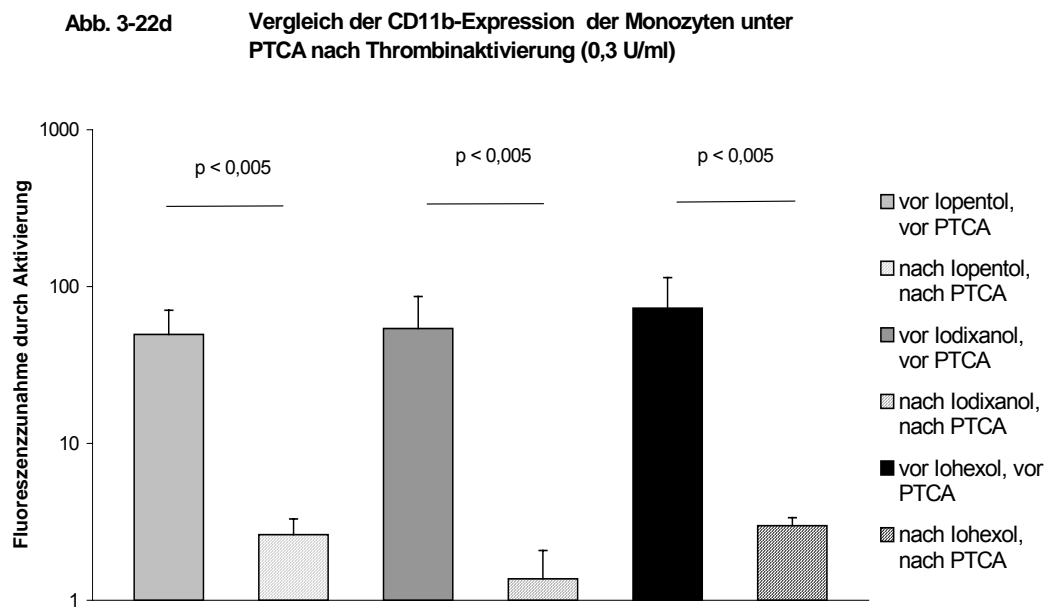
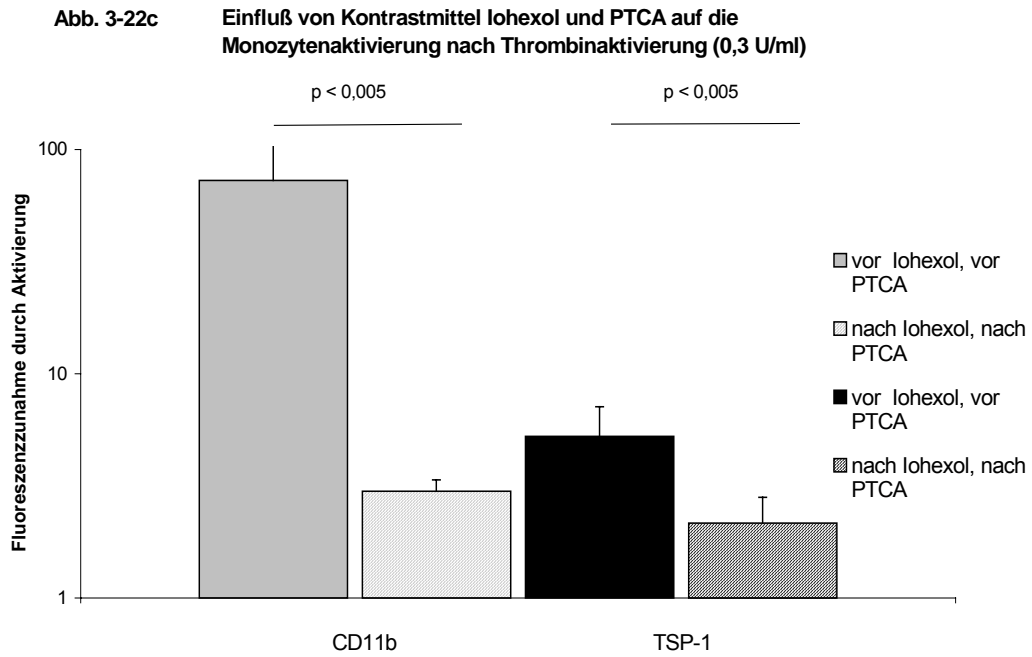


**Abb. 3-22a** Einfluß von Kontrastmittel Iopentol und PTCA auf die Monozytenaktivierung nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)

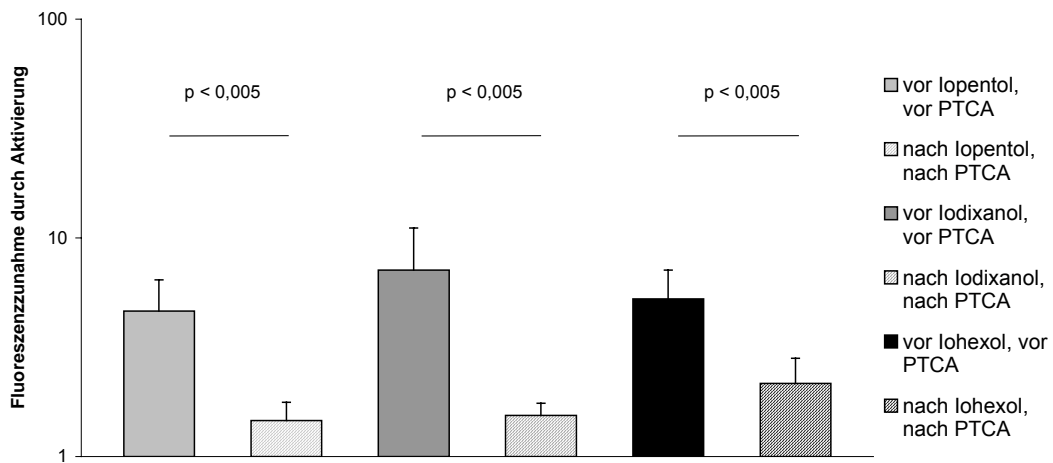


**Abb. 3-22b** Einfluß von Kontrastmittel Iodixanol und PTCA auf die Monozytenaktivierung nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)





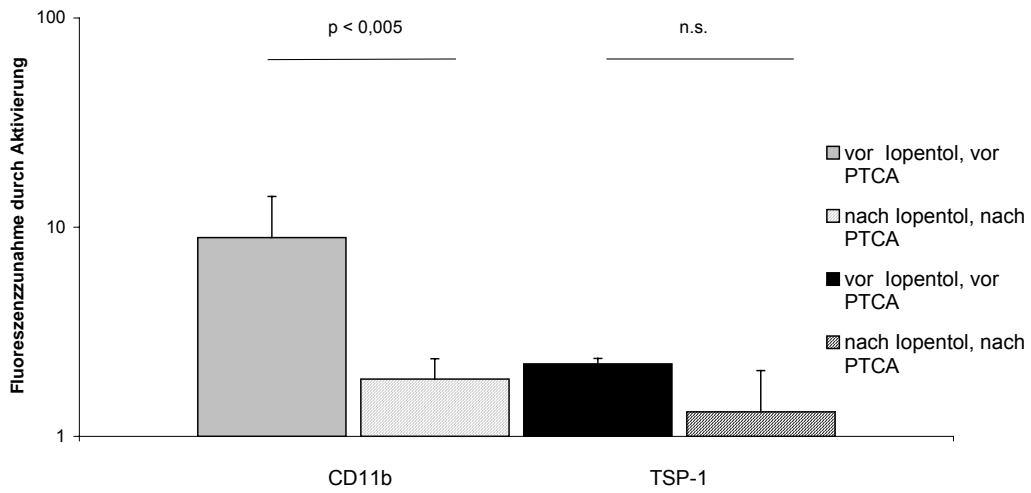
**Abb. 3-22e Vergleich der TSP-1-Bindung der Monozyten unter PTCA nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)**



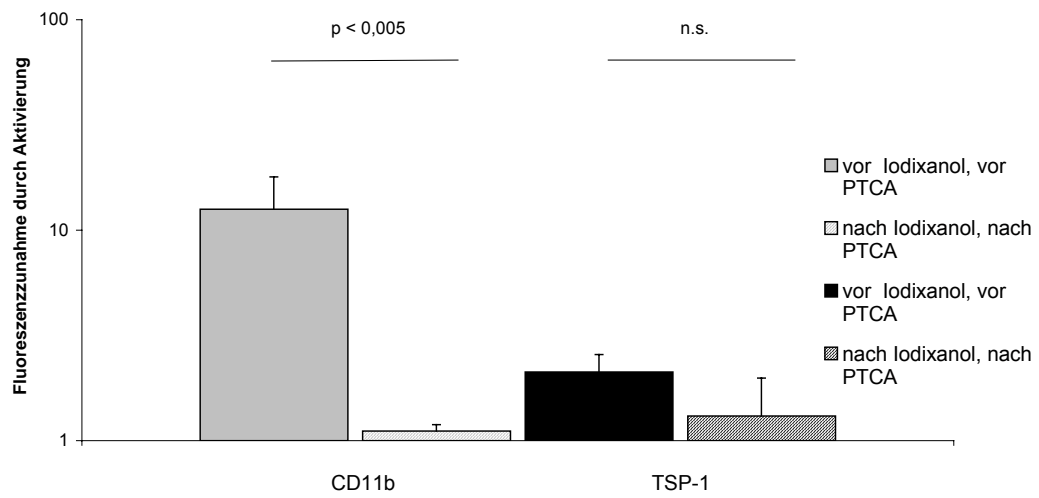
### 3.2.4.2 In-vitro-induzierte PMNL-Aktivierung

Die durchflußzytometrischen Untersuchungen der CD11b-Expression der PMNL zeigen, daß die Proben, die nach PTCA mit einem der drei Kontrastmittel entnommen wurden, eine signifikant reduzierte CD11b-Expression der PMNL aufweisen, unabhängig von der Art der applizierten Substanz (Abb. 3-23). Die Anzahl TSP-1-bindender PMNL nach Thrombin-Stimulation in-vitro war reduziert in den Proben, die nach PTCA mit den nichtionischen Substanzen abgenommen wurden im Vergleich zu den Ausgangswerten vor PTCA und Kontrastmittelgabe (Abb. 3-23), allerdings konnte keine Signifikanz gezeigt werden, bedingt durch schon geringe Werte und hohe Standardabweichungen.

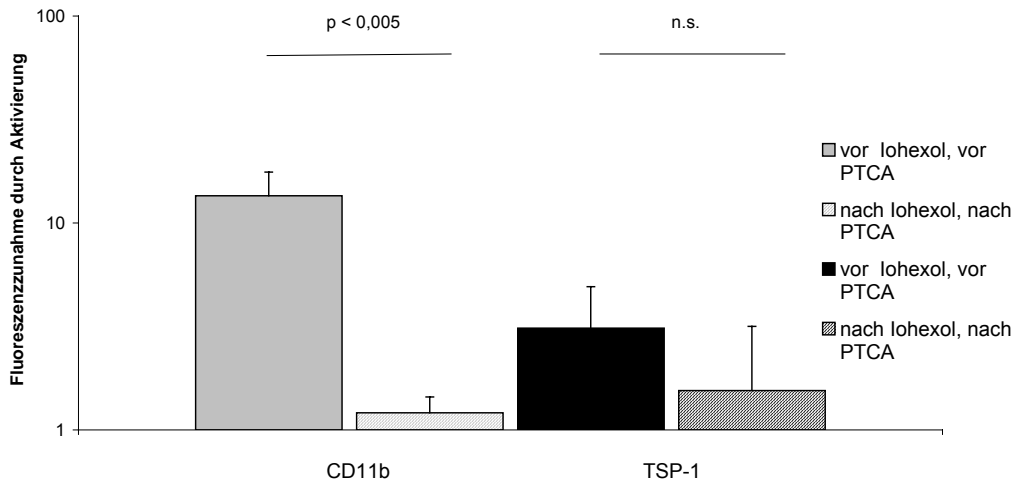
**Abb. 3-23a** Einfluß von Kontrastmittel Iopentol und PTCA auf die PMNL-Aktivierung nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)



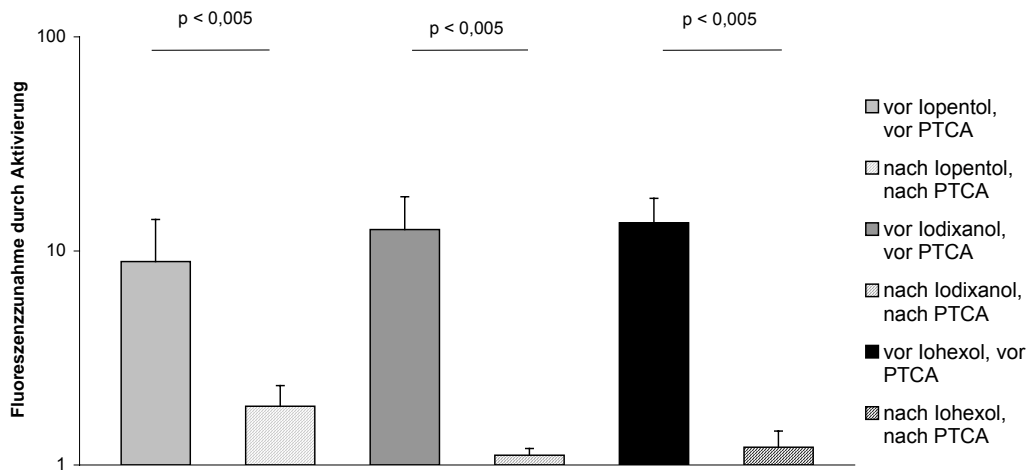
**Abb. 3-23b** Einfluß von Kontrastmittel Iodixanol und PTCA auf die PMNL-Aktivierung nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)

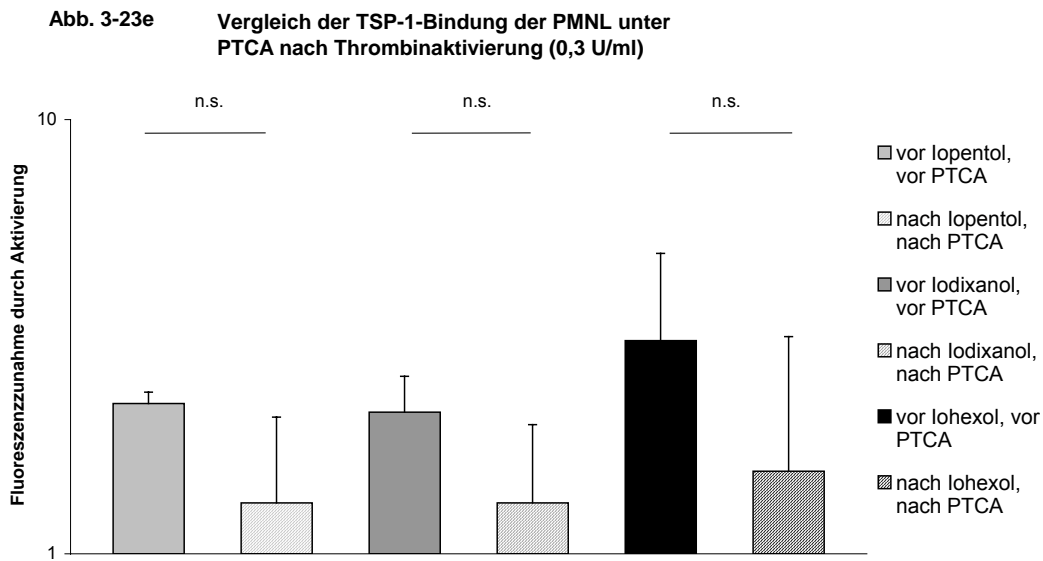


**Abb. 3-23c** Einfluß von Kontrastmittel Iohexol und PTCA auf die PMNL-Aktivierung nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)



**Abb. 3-23d** Vergleich der CD11b-Expression der PMNL unter PTCA nach Thrombinaktivierung (0,3 U/ml)



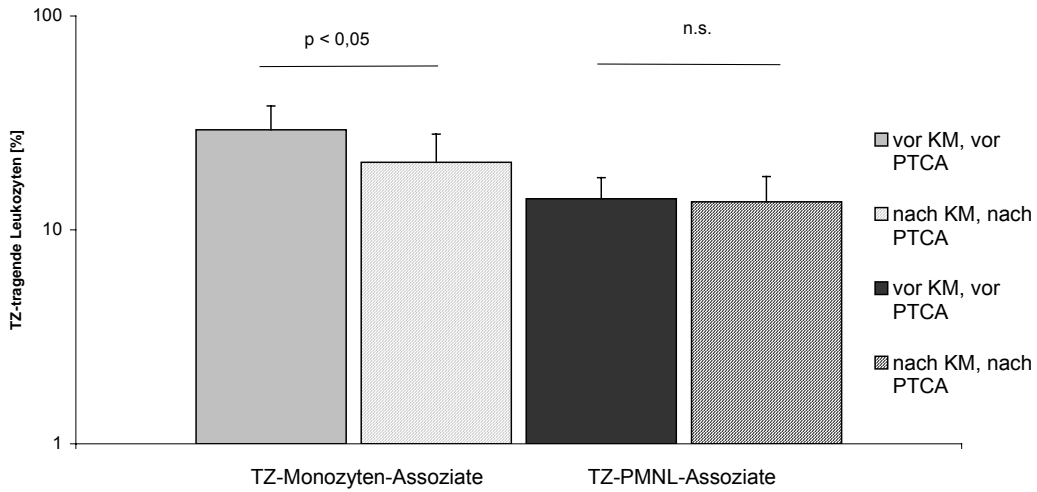


### 3.2.5 Durchflußzytometrische Untersuchungen der Thrombozyten-Leukozyten-Assoziation

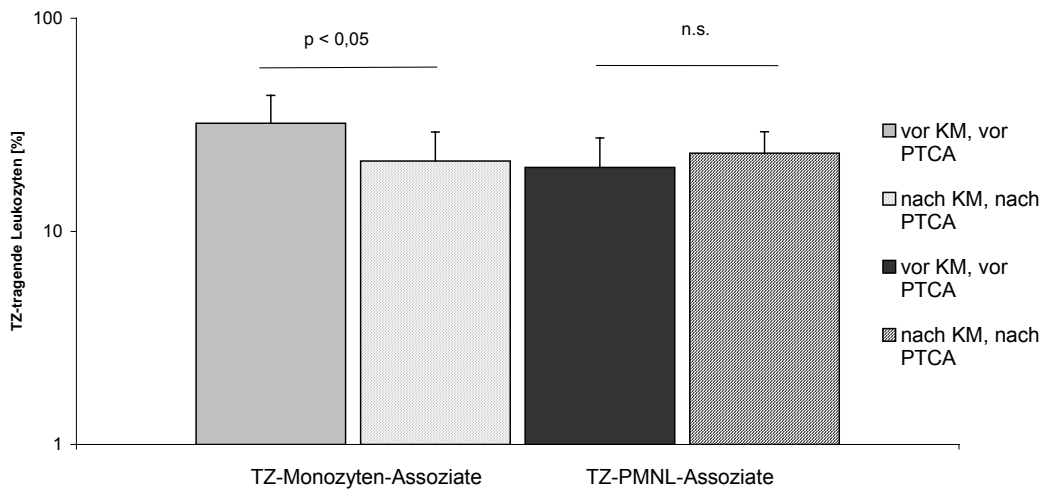
Ebenso wie bei den Patienten, die sich einer diagnostischen Koronarangiographie unterzogen, sollte auch hier untersucht werden, ob und in wie weit Koronarinterventionen unter Verwendung nichtionischer Kontrastmittel Einfluß auf die Assoziationsraten zwischen Thrombozyten und Monozyten bzw. PMNL haben. Es zeigte sich, daß bei allen Patienten vor Kontrastmittelgabe und PTCA per se, im Vergleich zu Vollblutproben gesunder Probanden (s. Kap.3.1.5), eine erhöhte Thrombozyten-Leukozyten-Assoziationsrate vorlag. Diese betragen für Thrombozyten-Monozyten-Assoziante 30-35%, für die Assoziation mit neutrophilen Granulozyten 15-20%. Ex-vivo war eine signifikante Abnahme der Thrombozyten-Monozyten-Assoziationsrate in den Proben nach Kontrastmittelinjektion und PTCA zu beobachten (Abb. 3-24).

Im Vergleich dazu blieb die Thrombozyten-PMNL-Assoziationsrate ex-vivo in den Proben nach Kontrastmittelgabe und PTCA unverändert zur Referenzgruppe vor Kontrastmittelgabe und Intervention (Abb. 3-24).

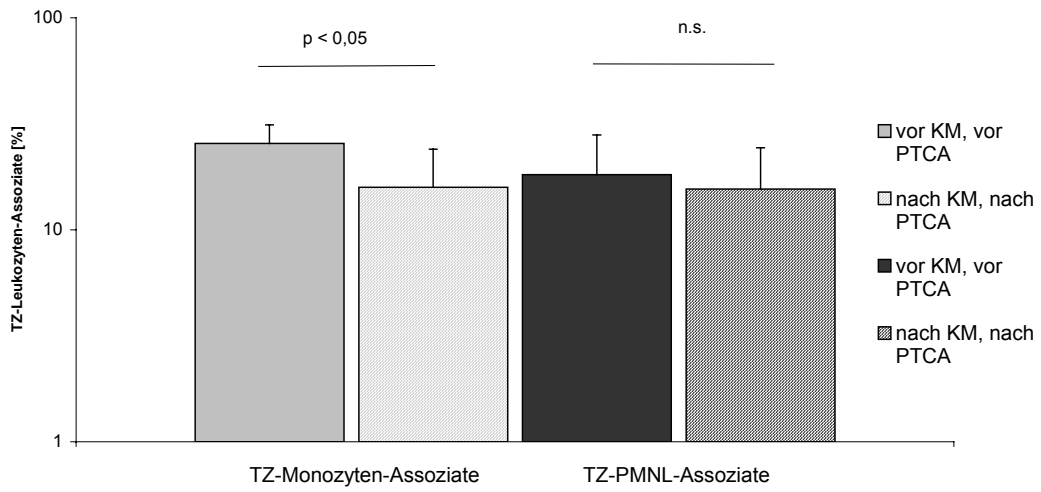
**Abb. 3-24a** Einfluß von Kontrastmittel Iopentol und PTCA auf die Zahl der Thrombozyten-Leukozyten-Assoziat ex-vivo



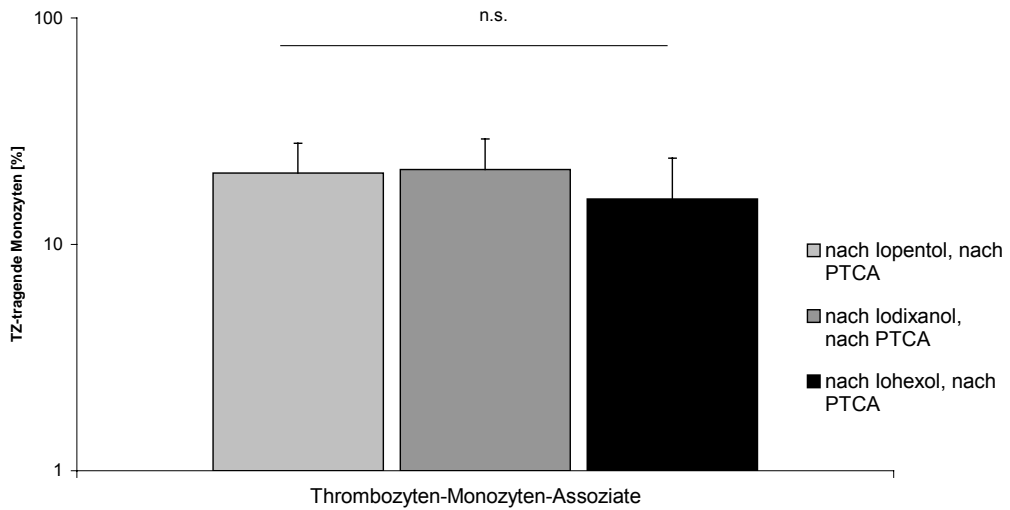
**Abb. 3-24b** Einfluß von Kontrastmittel Iodixanol und PTCA auf die Zahl der Thrombozyten-Leukozyten-Assoziat ex-vivo



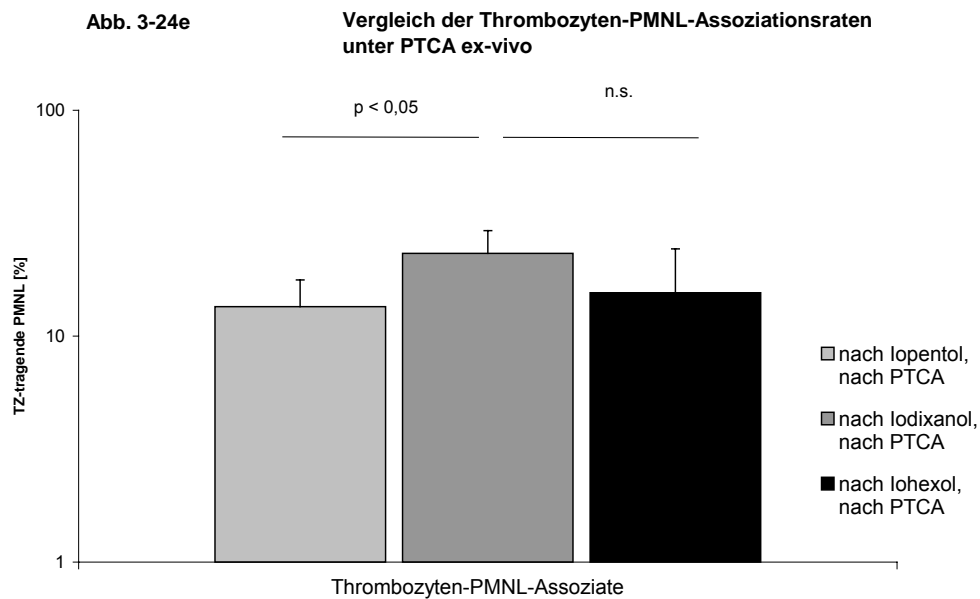
**Abb. 3-24c** Einfluß von Kontrastmittel Iohexol und PTCA auf die Zahl der Thrombozyten-Leukozyten-Assoziat ex-vivo



**Abb. 3-24d** Vergleich der Thrombozyten-Monozyten-Assoziationsraten unter PTCA ex-vivo







### 3.3 Ergebnisse der Scheraggregometrie

Mit Hilfe der Scheraggregometrie wurden Citratblutproben vor und nach Kontrastmittelgabe während diagnostischer Koronarangiographie bzw. PTCA auf Polystyrol-Platten konstantem Scherstress von  $1700 \text{ s}^{-1}$  für 2 min ausgesetzt. Hierdurch lagerten sich die Thrombozyten, vermittelt durch plasmatischen vWF, aktivierten GPIIb/IIIa und GPIb-IX, an die Oberfläche der Platten an. Nach Färben der Platten wurde, wie bereits beschrieben, die prozentuale thrombozytäre Oberflächenbedeckung bestimmt, die von der Thrombozytenzahl und dem Hämatokrit beeinflusst wird.

Nach Kontrastmittelgabe und PTCA fiel ein signifikanter Abfall der Thrombozytenzahlen der Patienten auf (Abb. 3-25b). Bei diagnostischer Koronarangiographie konnte unabhängig von der Art des applizierten Kontrastmittels kein Abfall der Thrombozytenzahlen der Patienten im Verlauf der Untersuchung beobachtet werden (Abb. 3-25a).

Abb. 3-25a Thrombozytenzahlen vor und nach Kontrastmittelgabe

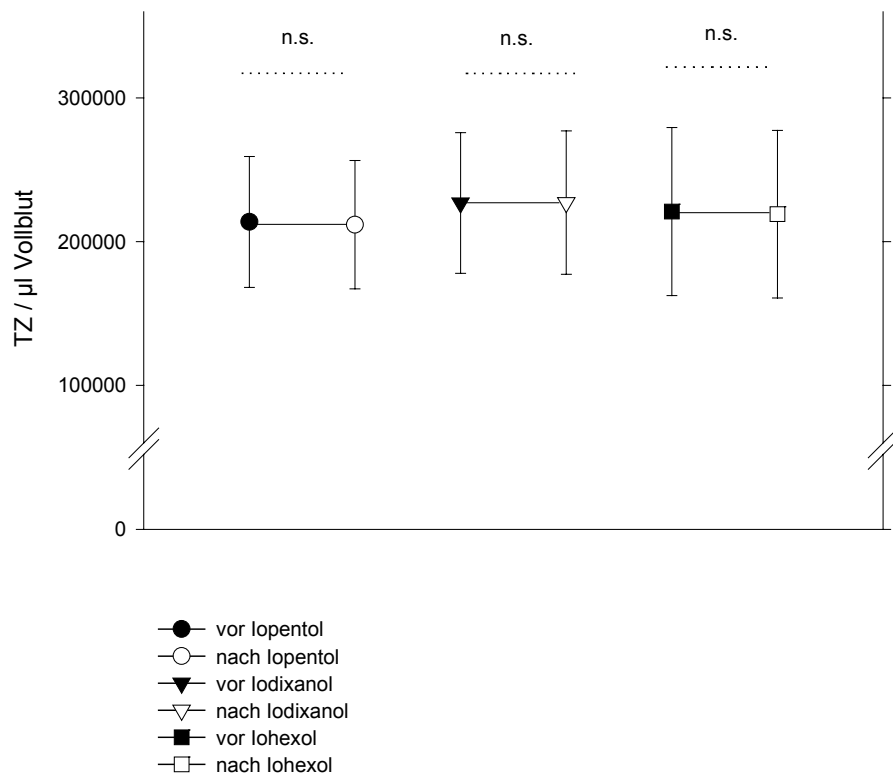
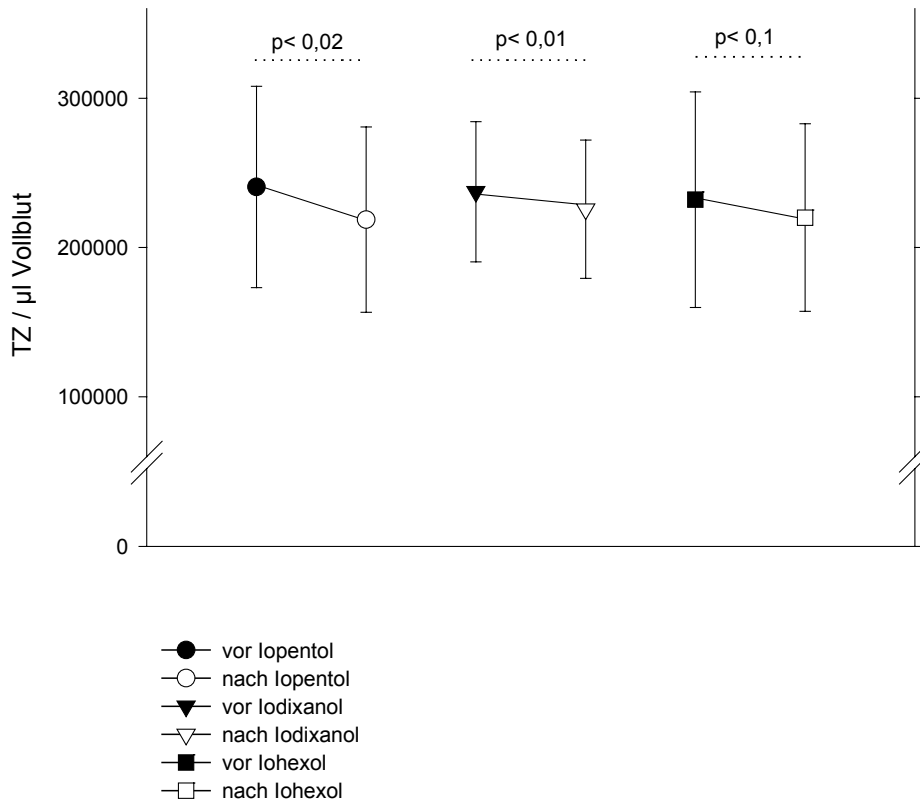


Abb. 3-25b Thrombozytenzahlen vor und nach Kontrastmittelgabe und PTCA



### 3.3.1 Einfluß der Kontrastmittel während Koronarangiographie auf die thrombozytäre Oberflächenbedeckung im Adhäsionsassay

Citratblut aller Patienten, die sich einer diagnostischen Koronarangiographie unterzogen, wurde einem Scherstreß von  $1700 \text{ s}^{-1}$  für 2 min ausgesetzt. Dies geschah wieder für die Proben vor Kontrastmittelgabe und ebenso für die Proben nach Koronarangiographie und Injektion des entsprechenden nichtionischen Kontrastmittels. Abb. 3-26 und Abb. 3-27 zeigen, daß nach Applikation des nichtionischen Monomers Iopentol tendenziell eine erhöhte thrombozytäre Oberflächenbedeckung der Platten zu beobachten war, nach Gabe von Iodixanol fiel diese hingegen signifikant ab. Im

Gegensatz dazu war nach Gabe des nichtionischen Monomers Iohexol keine signifikante Veränderung im Vergleich vor Kontrastmittelgabe zu beobachten.

Abb. 3-26 Einfluß der Kontrastmittel Iopentol, Iodixanol und Iohexol auf die thrombozytäre Oberflächenbedeckung

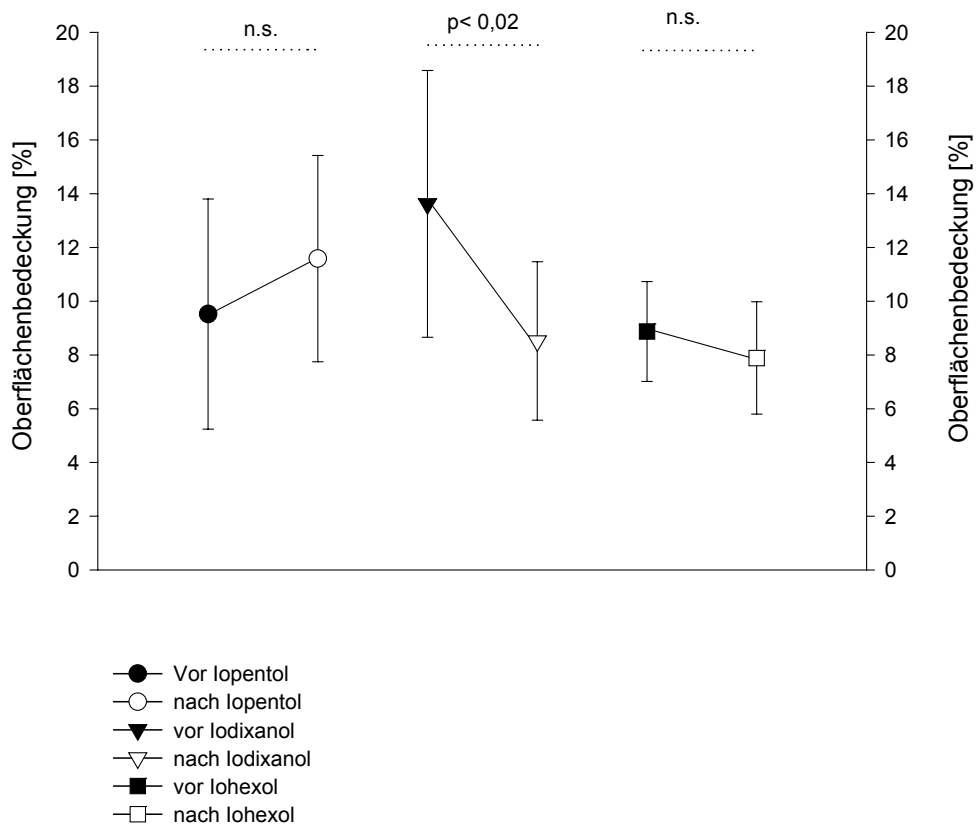
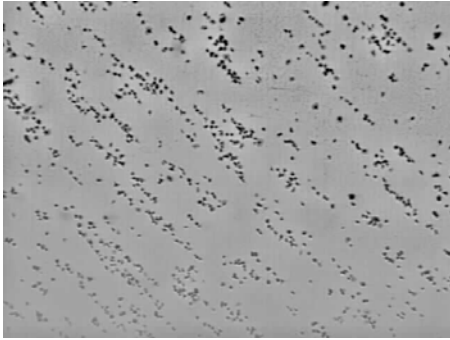
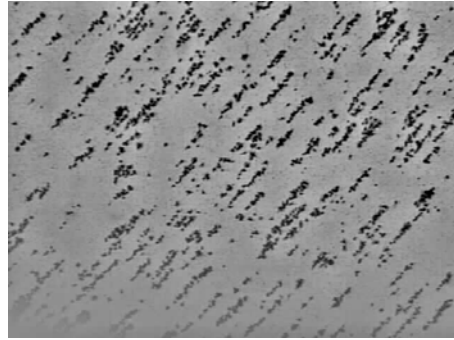


Abb. 3-27

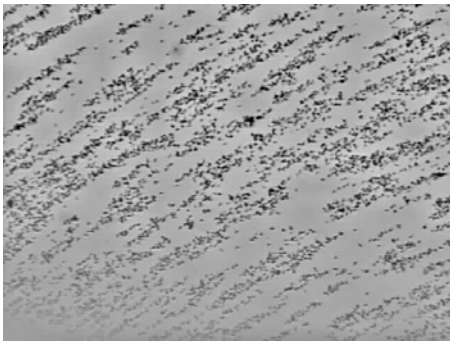
Lichtmikroskopische Aufnahmen der thrombozytären Oberflächenbedeckung im Adhäsionsassay vor und nach Kontrastmittelgabe



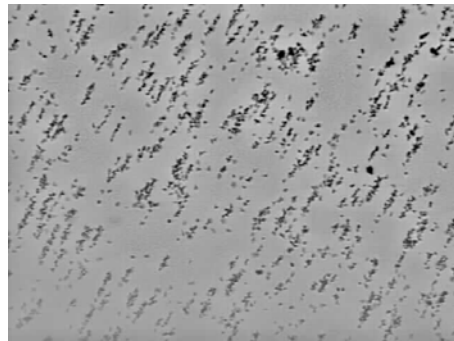
a) vor Iopentolgabe



b) nach Iopentolgabe



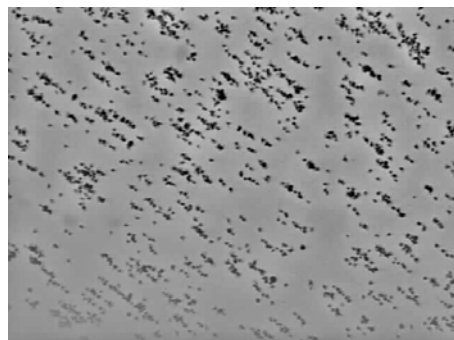
c) vor Iodixanolgabe



d) nach Iodixanolgabe



e) vor Iohexolgabe



f) nach Iohexolgabe

### 3.3.2 Einfluß der Kontrastmittel während PTCA auf die thrombozytäre Oberflächenbedeckung im Adhäsionsassay

Die Adhäsion der Thrombozyten auf den Polystyrol-Platten unter Scherstress von  $1700 \text{ s}^{-1}$  wurde ebenso für die Proben vor und nach Kontrastmittelgabe während PTCA bestimmt. Die Ergebnisse, die hierbei erhoben wurden, ähnelten denen der Scheraggregometrie-Analyse während Koronarangiographie (Abb. 3-26; Abb 3-28 ). Es kam zu einer signifikant höheren thrombozytären Oberflächenbedeckung nach Gabe von Iopentol während PTCA, wohingegen nach PTCA unter Iodixanol ein signifikanter Abfall der Thrombozytenadhäsion zu beobachten war. Im Gegensatz dazu blieb die thrombozytäre Oberflächenbedeckung von Iohexolgabe während PTCA unbeeinflusst.

Abb. 3-28 Einfluß der Kontrastmittel Iopentol, Iodixanol und Iohexol während PTCA auf die thrombozytäre Oberflächenbedeckung

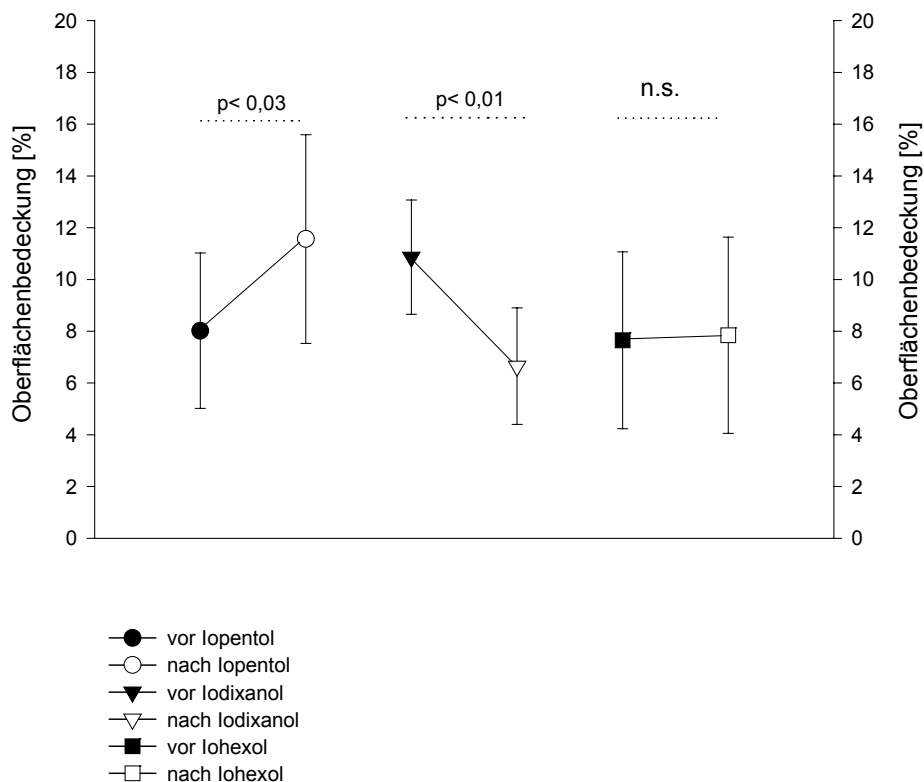
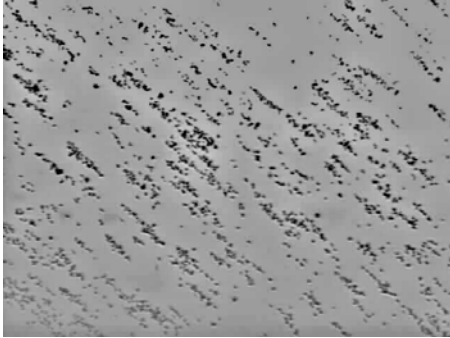
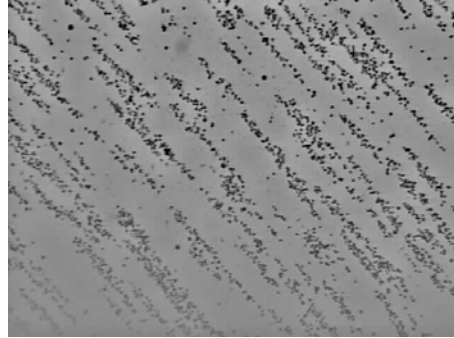


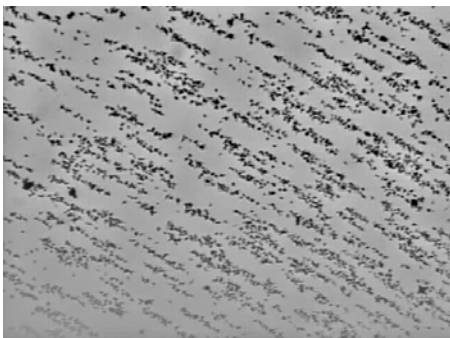
Abb. 3-29 Lichtmikroskopische Aufnahmen der thrombozytären Oberflächenbedeckung im Adhäsionsassay vor und nach Kontrastmittelgabe und PTCA



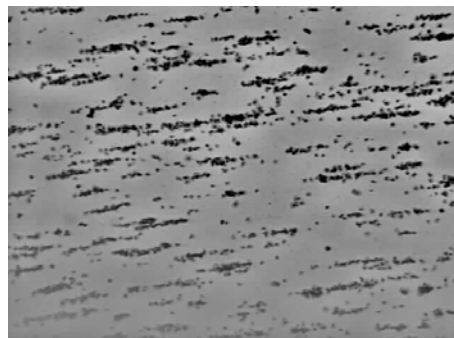
a) vor Iopentol und PTCA



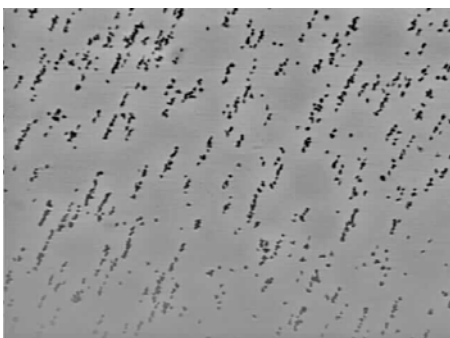
b) nach Iopentol und PTCA



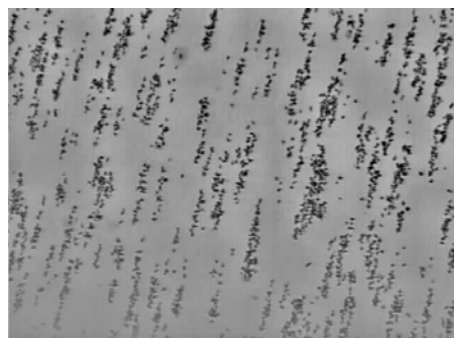
c) vor Iodixanol und PTCA



d) nach Iodixanol und PTCA



e) vor Iohexol und PTCA



f) nach Iohexol und PTCA

## 4 Diskussion

Koronarangiographie und besonders interventionelle Methoden, wie z.B. die PTCA sind mit lokaler Thrombozytenaktivierung und –degranulation verbunden [Dehmer et al., 1997]. So kommt es durch die Dilatation zu Intimaeinrissen und Verletzungen der Media [Grines et al., 1996], so daß zirkulierende Thrombozyten mit prothrombotischem Kollagen, Elastin und glatten Muskelzellen in Berührung kommen und sich an der Stelle der Gefäßverletzung ablagern. Dies kann im weiteren Verlauf zur Thrombusbildung und schließlich zu einem Gefäßverschluß mit den daraus resultierenden ischämischen Komplikationen führen. So sind, trotz Heparin- und antithrombozytärer Therapie, Gefäßokklusion und Restenose immer noch gefürchtete Komplikationen koronarer Interventionen. In den letzten Jahren wurden immer wieder Vermutungen laut [Chronos et al., 1993; Grabowski et al., 1993; Brinker, 1991], daß Kontrastmittel neben ihren allgemeinen Nebenwirkungen (siehe Kap.1) auch thromboembolische Zwischenfälle begünstigen. In diesem Zusammenhang sollte der Auswahl des geeigneten Kontrastmittels und der möglichen thrombogenen Eigenschaften besonderer Augenmerk geschenkt werden, insbesondere im Hinblick auf die applizierte intrakoronare Dosis von bis zu 150 ml [Grabowski et al., 1993] während diagnostischer Koronarangiographie. Hardermann et al. (1994) beschreiben in-vitro Trombozytenaktivierung in Zusammenhang mit den neueren nichtionischen Kontrastmitteln, außerdem legen Studien nahe, daß thrombotische Komplikationen während Koronarangiographie [Grollmann et al., 1988] und PTCA [Gasperetti et al., 1991] mit dem Gebrauch nichtionischer Kontrastmittel assoziiert sind. Mit Hilfe dieser Arbeit sollten weitere Erkenntnisse über den Einfluß dreier nichtionischer Kontrastmittel auf den ex-vivo Aktivierungszustand und die Aktivierbarkeit von Thrombozyten und Leukozyten gesammelt werden.



#### **4.1 Einfluß der Kontrastmittel während Koronarangiographie auf die scherstress-vermittelte thrombozytäre Oberflächenbedeckung im Adhäsionsassay**

Mit Hilfe des „cone and plate“-Scheraggregometers von N. Savion (Israel) lassen sich mit geringen Mengen Vollblut (150-250µl) die Adhäsions- und Aggregationseigenschaften der primären Hämostase der Thrombozyten unter annähernd physiologischen Bedingungen simulieren [Varon et al., 1997,1998; Schenkman et al., 1999; Knobler et al., 1998]. Der initiale Kontakt der Thrombozyten erfolgt hierbei mit dem vWF über das GPIIb<sub>α</sub> des GPIIb/V/IX-Komplexes. Durch diese Interaktion erfährt der GPIIbIIIa-Komplex eine Konformationsänderung und ist ebenfalls in der Lage, vWF zu binden. Nach dieser festen Adhäsion breiten sich die aktivierten Thrombozyten aus und binden über Fibrinogenbrücken weitere Thrombozyten, so daß Thrombozytenaggregate entstehen. Erstmals konnte gezeigt werden, daß Thrombozyten ohne Beteiligung des vWF unter erhöhtem Scherstress an TSP-1 adhäreren [Jurk, 1999].

Die Ergebnisse zeigen, daß unabhängig von Gabe eines der drei Kontrastmittel die Thrombozyten auf den Polystyrol-Platten adhäreren (Abb. 3-26). Diese Aggregation ist dabei auch beeinflusst von Thrombozytenzahl und Hämatokrit, und unterstreicht somit auch die Bedeutung der Erythrozyten an der thrombozytären Adhäsion [Schenkman et al., 1999]. Nach Gabe des nichtionischen Dimers Iodixanol kommt es zu einer signifikant verringerten Adhäsionsrate; unter Verwendung der monomeren Substanzen sind nur tendenziell veränderte Oberflächenbedeckungen zu beobachten (Abb. 3-26). Somit scheint es nach Iodixanolgabe, z.B. durch dessen Moleküleigenschaften (s.u.) zu einer Veränderung der Thrombozytenoberfläche, also des vWF, des GPIIbIIIa oder des GPIIb/V/IX, zu kommen, so daß im Anschluß an die Kontrastmittelgabe weniger Thrombozyten in der Lage sind, unter hohem Scherstress an die Platten anzulagern [Knobler et al., 1998]. Da dieses Phänomen unter Gabe der nichtionischen Monomere Iopentol und Iohexol nicht zu beobachten ist, liegt der Schluß nahe, daß diese Substanzen -zumindest gemessen an dieser Methodik - keinen Einfluß auf die thrombozytäre Oberflächenbedeckung im Adhäsionsassay zu haben scheinen.

## **4.2 Einfluß der Kontrastmittel auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Thrombozyten während Koronarangiographie**

Einige durchflußzytometrische Studien konnten bereits zeigen, daß es durch monomere nichtionische Kontrastmittel - gemessen am ex-vivo Aktivierungszustand - zu keiner erhöhten  $\alpha$ -Granula-Sekretion kommt. Grabowski und Mitarbeiter (1993) untersuchten ex-vivo die CD62-Expression in Citratblutproben vor und nach Injektion des nichtionischen Monomers Iohexol. Hierbei zeigte sich kein Unterschied der Fluoreszenzsignale in den Proben vor und nach Injektion. Albanese et al. (1995) und Dehmer (1997) untersuchten ebenfalls ex-vivo den Effekt von Iohexol auf die CD62-Expression der  $\alpha$ -Granula. Sie beobachteten übereinstimmend sowohl in den Proben, die aus dem Koronarsinus abgenommen wurden, als auch in denen, die aus der venösen Gefäßschleuse gewonnen wurden, keine Thrombozytenaktivierung, gemessen an der CD62-Expression.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Aspekte und außerdem der Einfluß zweier weiterer nichtionischer Kontrastmittel auf den thrombozytären Aktivierungszustand untersucht. Eingehendere Analysen, die bei Grabowski (1993) und Albanese (1995) nicht durchgeführt wurden, zeigten ex-vivo bei den Thrombozyten unveränderte CD62- und CD63-Oberflächenexpressionen, sowie TSP-1-Bindung nach Applikation eines der drei zu untersuchenden Kontrastmittel Iopentol, Iohexol und Iodixanol (Abb. 3-1; Abb. 3-2). Mit Hilfe eines Markierungsverfahrens konnte gezeigt werden, daß die „dense-bodies“ der Patiententhrombozyten in gleichem Maße den Fluorochromfarbstoff Mepacrine aufnehmen wie die „dense-bodies“ der Thrombozyten der Proben nach Injektion eines der drei Kontrastmittel (Abb. 3-2). Somit scheint Koronarangiographie unter Verwendung dieser drei nichtionischen Kontrastmittel diesen Aufnahmemechanismus in die „dense-bodies“ nicht zu stören. Gemessen an der  $\alpha$ -Granula- und der „dense-bodies“-Sekretion der Thrombozyten zeigt sich für jedes einzelne Kontrastmittel, als auch der Vergleich der einzelnen Kontrastmittel miteinander ein unveränderter ex-vivo-Aktivierungszustand in den Proben nach Kontrastmittelinjektion. Dies könnte zum einen bedeuten, daß die Applikation von nichtionischen Kontrastmitteln keinen Einfluß auf die untersuchten Parameter der

Thrombozyten hat. Andererseits zeigte Michelson (1996) an Affen, daß aktivierte, degranulierte Thrombozyten oberflächengebundenes P-Selektin in der Zirkulation innerhalb von 30 min. in das Plasma abgeben, somit könnte die Detektion von Adhäsionsmolekülen auf aktivierten Thrombozyten zu falschen Schlußfolgerungen führen, wenn zwischen Stimulus und Blutabnahme eine zu lange Zeitspanne liegt. Die Zeitspanne zwischen Kontrastmittelinjektion und Probenabnahme lag bei den im Rahmen dieser Arbeit abgenommenen Proben bei ca. 5-10 min., so daß die Zeitspanne hier geringer war, als bei Michelsons Untersuchungen (1996) und somit von untergeordneter Bedeutung ist.

Mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper gegen den Thrombinrezeptor PAR-1 konnten zusätzlich irreversible Parameter, wie der Spaltungs- und Internalisierungszustand dieses Rezeptors untersucht werden. Die Markierung der Proben mit dem Klon SPAN12, der nur ungespaltene, intakte PAR-1-Moleküle erkennt, zeigte ein gleichbleibendes Signal in den Proben, die nach Applikation eines der drei Kontrastmittel entnommen wurden (Abb. 3-3a), eine aktivierungsbedingte Spaltung des Rezeptors durch Thrombinproduktion in-vivo im Rahmen der Kontrastmittelinjektion, welche sich in einem reduzierten Fluoreszenzsignal äußern würde, konnte somit nicht nachgewiesen werden. Der Klon WEDE15 bindet an intakte, gespaltene, nicht jedoch an internalisierte Rezeptoren. Eine starke, länger andauernde Aktivierung, die mit Rezeptorinternalisierung einhergeht, würde sich folglich in einer Abnahme des Fluoreszenzsignals äußern. Bei den Proben, die nach Kontrastmittelgabe abgenommen wurden, kam es zu keiner Änderung des Fluoreszenzsignals (Abb. 3-3b), so daß nicht von einer aktivierungsbedingten Rezeptorinternalisierung durch gesteigerte Thrombinproduktion in-vivo im Rahmen der Kontrastmittelgabe auszugehen war.

Sowohl vWF als auch Fibrinogen können, z.B. nach aktivierungsabhängiger Sekretion aus den  $\alpha$ -Granula an den Thrombozyten zurückbinden, so daß eine gesteigerte Antikörperbindung nach Kontrastmittelapplikation auf eine stattgefundene Aktivierung der Thrombozyten hindeuten würde. So führt Thrombozytenaktivierung in der Zirkulation zur Expression der Fibrinogenbindungsstellen auf dem GPIIb/IIIa und ermöglicht so durch Fibrinogenbindung die Vernetzung von Thrombozyten untereinander [Warkentin et al., 1990; Wencel-Drake et al., 1996; Phillips et al., 1991;

Jasinski, Kehrel, 1997], damit ist die Erfassung der thrombozytären Fibrinogenbindung ein guter Indikator für stattgefundene in-vivo Aktivierung. Da sich die Fibrinogenbindung in den Proben unter Gabe eines der nichtionischen Kontrastmittel nicht ändert (Abb. 3-4b), ist eine Aktivierung durch diese Substanzen unwahrscheinlich. Löslicher vWF bindet unter Scherstress oder unter Einwirkung bestimmter Modulatoren, wie Ristocetin oder Botrocetin an das GP Ib $\alpha$  des GP Ib/V/IX-Komplex, als auch aktivierungsabhängig an das GPIIb/IIIa [Goto et al., 1995; Herrmann et al., 1997; Kehrel et al., 1998]. Unter Gabe eines der Kontrastmittel Iopentol, Iodixanol oder Iohexol ist keine veränderte vWF-Bindung zu erkennen, so daß auch hier eine aktivierungsabhängige Bindung ausgeschlossen werden kann (Abb. 3-4a).

### **4.3 Einfluß der Kontrastmittel auf die thrombin-induzierte Thrombozytenaktivierung während Koronarangiographie**

Um die Thrombozytenreaktivität zu testen, wurden die gewonnenen Blutproben in-vitro mit 0,3 U/ml Thrombin stimuliert und die Präsentation von Adhäsionsmolekülen an deren Oberfläche im FACS ermittelt. Eine Aktivierung der Blutzellen mit diesem Agonisten würde bei stattgefundener Zellaktivierung in Abhängigkeit der Vorschädigung graduell zu einem Verlust der Aktivierungsbereitschaft führen.

Die Ergebnisse der in-vitro-induzierten Thrombinaktivierung zeigten einen graduellen Verlust der Aktivierungsbereitschaft der Thrombozyten, gemessen an der CD62-Expression (Abb. 3-5a; Abb. 3-5c) in den Proben nach Injektion der nichtionischen Monomere Iopentol und Iohexol.

Interessanterweise war eine Inhibition der thrombin-induzierten  $\alpha$ -Granula-Sekretion gemessen an der TSP-1-Bindung und der CD62-Expression in den Blutproben nach Applikation des nichtionischen Kontrastmittels Iodixanol nicht zu beobachten (Abb. 3-5b). Hierbei weist Iodixanol Unterschiede auf molekularer, chemischer und physikalischer Ebene im Vergleich zu den beiden monomeren Substanzen Iopentol und Iohexol auf: Wegen seiner relativen Molekülgröße, seiner höheren Viskosität und seinem höheren Iodgehalt (Tab. 2.2, Kap.2) zeigt Iodixanol ein langsames Diffusionsverhalten aus dem Gefäßbett in den Extrazellularraum, als die beiden nichtionischen Monomere [Almén, 1995]. Weiterhin verhalten sich Iopentol und Iohexol

plasmahyperton, Iodixanol hingegen zeigt Isotonizität zum Plasma, außerdem enthält es geringe Mengen an Natrium und Kalzium [Almén, 1995]. Diese Unterschiede könnten Einfluß auf die Aktivierbarkeit der Thrombozyten mit Thrombin haben und die gleichbleibende Aktivierungsbereitschaft der  $\alpha$ -Granula in den Proben nach Iodixanolgabe erklären.

Die thrombin-induzierte CD63-Oberflächenexpression der Thrombozyten wurde in Proben nach Applikation aller drei Kontrastmittel, also auch in den Blutproben, die nach Iodixanolgabe abgenommen wurden, signifikant inhibiert, wobei dieser Effekt in den Proben, die nach Iopentolgabe untersucht wurden, am stärksten ausgeprägt war (Abb. 3-6). Warum die thrombin-induzierte CD63-Expression nach Iodixanolgabe signifikant inhibiert wird, die CD62-Expression hingegen nicht, bleibt noch zu beantworten. Die durchflußzytometrische Erfassung der thrombin-induzierten Mepacrineabgabe zeigte in den Proben nach Gabe eines der drei Kontrastmittel keine Unterschiede im Vergleich zu den Proben vor Kontrastmittelapplikation (Abb. 3-6). Somit waren die „dense-bodies“ in den Proben, die nach Kontrastmittelgabe untersucht wurden, in der Lage, in gleichem Maße thrombin-induziert Mepacrine auszuschütten, wie „dense-bodies“ in den Proben vor Kontrastmittelapplikation, so daß dieser Sekretionsmechanismus ungestört nach Kontrastmittelgabe zu verlaufen scheint.

Diese o.g. Ergebnisse der in-vitro Thrombinstimulation könnten zum einen auf eine in-vivo Voraktivierung der Proben, zum anderen auf eine Inhibition des Sekretionsmechanismus der  $\alpha$ -Granula und „dense-bodies“ der Thrombozyten zurückzuführen sein. Abb. 3-1 und Abb. 3-2 zeigen jedoch, daß es in den Proben nach Kontrastmittelgabe zu keiner Änderung des ex-vivo Aktivierungszustandes der  $\alpha$ -Granula und der „dense-bodies“ kommt, somit erscheint eine in-vivo Voraktivierung unwahrscheinlich. Die Ergebnisse des Spaltungs- und Internalisierungszustands des Thrombinrezeptors PAR-1, quantifiziert durch SPAN12- und WEDE15-Expression (Abb. 3-3), sowie der Fibrinogen- und vWF-Bindung (Abb. 3-4) können diese Annahme untermauern. Da vor und nach Gabe eines der drei Kontrastmittel dieselbe Menge Mepacrine von den „dense-bodies“ aufgenommen wurde, läßt sich diese Inhibition der Thrombozytenaktivierung in-vitro eher als eine direkte Hemmung des Sekretionsmechanismus interpretieren.

#### **4.4 Einfluß der Kontrastmittel auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Leukozyten während Koronarangiographie**

Neben der Thrombozytenaktivierung wurde die Aktivierung von zirkulierenden Monozyten und neutrophilen Granulozyten während Koronarangiographie mit einem der drei nichtionischen Kontrastmittel untersucht.

Bereits Feldman und Mitarbeiter (1994) untersuchten die Expression von CD11b auf neutrophilen Granulozyten nach Koronarangiographie mit einem ionischen Kontrastmittel und beobachteten hierbei eine Abnahme der Oberflächenexpression. In Untersuchungen von Ikeda und Mitarbeitern (1994) zeigte sich eine unveränderte CD11b-Expression der PMNL nach Koronarangiographie mit einem in der Arbeit nicht näher bezeichneten Kontrastmittel.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen kam es in den Proben nach Applikation einer der drei nichtionischen Substanzen ex-vivo zu unveränderter CD11b-Expression und TSP-1-Bindung, sowohl der Monozyten als auch der PMNL. Monozyten konnten dabei dreimal mehr TSP-1 binden als PMNL (Abb. 3-7; Abb. 3-8). Es kann allerdings eine frühere, lokal begrenzte oder spätere, durch die Probenabnahme nicht detektierte Leukozytenaktivierung nicht ausgeschlossen werden.

Weiterhin zeigten sich unabhängig von der Kontrastmittelgabe ex-vivo erhöhte Assoziationsraten von Thrombozyten und Monozyten bzw. PMNL. Diese betragen bei Thrombozyten-Monozyten-Assoziaten 30-40%; bei den Thrombozyten-PMNL-Konjugaten 15-30% (Abb. 3-11) und sind vergleichbar mit den Assoziationsraten nach maximaler Thrombinstimulation [Jurk, 1999]. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten, die sich einer Koronarangiographie mit nichtionischen Kontrastmitteln unterzogen, konnten also, wie bei Untersuchungen von Furman et al. (1998) an einer Patientengruppe mit stabiler Angina pectoris, eine bevorzugte Thrombozytenassoziation mit Monozyten im Vergleich zu PMNL beobachtet werden.

Vorausgehende Studien [Rinder et al., 1991 b; Celi et al., 1994; Furie, Furie, 1997; McEver, 1991] zeigten, daß Thrombozytenaktivierung eine Voraussetzung für die

Thrombozyten-Leukozyten-Adhäsion ist. Eine Thrombozytenaktivierung konnte nach Kontrastmittelgabe ex-vivo im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht festgestellt werden. Trotzdem werden ex-vivo sowohl vor als auch nach Kontrastmittelgabe erhöhte Thrombozyten-Leukozyten-Assoziationsraten beobachtet, was zum einen an der größeren Stabilität der Assoziate gegenüber den einzelnen aktivierten Thrombozyten liegen könnte [Ott et al., 1996], wobei einzelne aktivierte Thrombozyten schon abgebaut sein könnten, die stabileren Assoziate aber nicht. Gegen diese Theorie spricht allerdings die Tatsache, daß keine der untersuchten Substanzen während einer Koronarangiographie zu einer Änderung der Thrombozytenzahlen führt (Abb. 3-25a). Die unveränderte ex-vivo CD62/CD63-Expression sowie TSP-1-Bindung der Thrombozyten in den Proben nach Kontrastmittelinjektion könnte angesichts der erhöhten Assoziationsraten den Schluß nahelegen, daß die auf der Zelloberfläche gebundenen Adhäsionsmoleküle bereits abgespalten und in das Plasma abgegeben oder in das OSC aufgenommen worden sind und somit nicht mehr den in-vivo Aktivierungszustand der Thrombozyten widerspiegeln [Michelson et al., 1996]. Die gesteigerte Assoziatbildung könnte auch über noch nicht verstandene Mechanismen vonstattengehen, so sind z.B. hierbei individuelle Faktoren wie koronare Herzerkrankung, arterielle Hypertension, Hyperlipidämie oder die Einnahme von Beta-Blockern, Angiotensin-Converting-Enzymen oder Kalzium-Kanal-Blockern [Furman et al., 1998] zu berücksichtigen.

Abb. 3-12 zeigt, daß es nach Applikation eines der drei Kontrastmittel zu keiner veränderten „Tissue-factor“-Bindung der Thrombozyten-Monozyten-Assoziaten kommt.

Eine erhöhte Expression von TF durch Monozyten auf den Assoziaten kann beispielweise durch das aktivierungsbedingt von den Thrombozyten exprimierte P-Selektin induziert sein [Celi et al., 1994, Neumann, 1997]. Da ex-vivo keine thrombozytäre Degranulation in den Ansätzen zu beobachten war und korrespondierend keine erhöhte TF-Expression z.B. durch de novo-Synthese der Monozyten auf den Assoziaten zu beobachten war, unterstreicht dieses Ergebnis den Zusammenhang der TF-Expression der Monozyten induziert durch vorausgegangene thrombozytäre P-

Selektin-Sekretion mit Anbindung desselben an den PSGL-1-Rezeptor der Monozyten [Osterud, 1997; Celi et al., 1994].

#### **4.5 Einfluß der Kontrastmittel auf die thrombin-induzierte Leukozytenaktivierung während Koronarangiographie**

Wie bei den Untersuchungen der Thrombozytenreaktivität durch den Agonisten Thrombin wurde auch die Leukozytenaktivierbarkeit in-vitro nach Stimulation mit 0,3 U/ml Thrombin analysiert, um Änderungen ihrer Aktivierungsbereitschaft festzustellen.

Es zeigte sich, daß sowohl die CD11b-Expression, als auch die TSP-1-Bindung an Monozyten nach Thrombinbehandlung im Vollblut ansteigt (Abb. 3-9).

In den Blutproben, die nach Applikation der monomeren Substanzen Iopentol und Iohexol untersucht wurden, fand sich eine signifikant reduzierte thrombin-induzierte CD11b-Expression und TSP-1-Bindung der Monozyten (Abb. 3-9). Somit scheinen diese Substanzen einen inhibitorischen Effekt auf die Monozytenaktivierbarkeit zu haben und die Monozyten unter Verwendung der monomeren Substanzen graduell ihre Aktivierungsbereitschaft zu verlieren. Unter Verwendung der dimeren Substanz Iodixanol war dies jedoch interessanterweise nicht der Fall (Abb. 3-9b). Dies mag, wie bereits bei den Thrombozytenuntersuchungen festgestellt, an den Moleküleigenschaften dieser dimeren Substanz liegen.

Auch bei den PMNL war es möglich, die CD11b-Expression und die TSP-1-Bindung im Vollblut thrombinabhängig zu steigern (Abb. 3-10). Neutrophile Granulozyten konnten jedoch aktivierungsbedingt weniger TSP-1 binden als Monozyten (Abb. 3-9; 3-10).

Die periinterventionelle Gabe der nichtionischen monomeren Kontrastmittel Iopentol und Iohexol hatte ebenfalls Einfluß auf die thrombin-induzierte Aktivierung der PMNL: Die thrombin-induzierte CD11b-Oberflächenexpression wurde, wie bei den Untersuchungen der Monozyten, in den Proben, die nach Kontrastmittelgabe abgenommen wurden, signifikant inhibiert (Abb. 3-10). Die thrombin-induzierte TSP-1-Bindung der PMNL wurde nur in den Proben nach Iohexolgabe signifikant inhibiert



(Abb. 3-10c); unter Verwendung von Iopentol war nur tendenziell eine Abnahme der aktivierungsbedingten TSP-1-Bindung der PMNL aufgrund hoher Standardabweichung bei geringen Grundwerten zu beobachten. Die Verwendung von Iodixanol inhibierte die thrombin-induzierte CD11b-Expression der PMNL, inhibierte die TSP-1-Bindung (Abb. 3-10b) jedoch nicht signifikant, was ebenfalls an der hohen Standardabweichung bei niedrigen Grundwerten liegen mag.

#### **4.6 Unterschiede der dargelegten Ergebnisse zu vorhergehenden Untersuchungen**

Die hier dargelegten Ergebnisse unterscheiden sich von denen von Chronos et al. (1993), hier wurde in-vitro Thrombozytendegranulation nach Inkubation von Vollblut in gleichem Verhältnis mit nichtionischem Kontrastmittel beobachtet. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen dieser Arbeit könnte folgende Ursachen haben: Zum einen könnte die mögliche Thrombozytenaktivierung durch nichtionische Kontrastmittel, wenn sie in-vivo überhaupt stattgefunden hat, ein örtlich sehr begrenztes Phänomen darstellen, das u.a. durch den Entnahmeort in der V. femoralis schwierig aufzudecken ist. Eine Probenentnahme direkt aus der Koronararterie oder dem Koronarsinus könnte Aufschluß darüber geben, ob eine lokalisierte Thrombozytenaktivierung am Ort der Kontrastmittelinjektion vorliegt, die an dem hier verwendeten Entnahmeort weiter distal nicht in Erscheinung tritt. Allerdings wäre die Einführung eines weiteren Katheters vonnöten, der seinerseits zu einer artifiziellen Aktivierung beitragen könnte, außerdem wäre ein zusätzlich eingebrachter Katheter ethisch und in der Durchführung problematisch. In einer Untersuchung von Albanese et al. (1995) wurden thrombozytäre CD62-Expression von Proben, die aus der peripheren Gefäßschleuse und aus einem im Koronarsinus platzierten Katheter entnommen wurden, miteinander verglichen. Die Ergebnisse zeigten keine Unterschiede, so daß der Einfluß des Entnahmeortes auf die Detektierbarkeit einer stattgefundenen Zellaktivierung als gering eingeschätzt werden dürfte. Dehmer et al. (1997) führte ebenfalls eine Studie an Koronarangiographie-Patienten durch, die das nichtionische Kontrastmittel Iohexol erhielten. Durch die Abnahme der Proben mittels eines langen Katheter aus dem Koronarsinus kam es allenfalls zu einer geringfügigen Thrombozytenaktivierung, allerdings wurde keine

gesteigerte Degranulation nach Iohexolgabe im Vergleich zu einem ionischen Vertreter (Diatrizoate) beobachtet.

Andererseits wäre es möglich, daß durch das Kontrastmittel aktivierte Thrombozyten und Leukozyten bereits an der Gefäßwand der Koronararterien adhäreren und deswegen nicht in den abgenommenen Vollblutproben anzutreffen sind [Albanese et al., 1995]. Gegen diese These spräche allerdings die Tatsache, daß reduzierte Thrombozytenzahlen, die nach PTCA beobachtet wurden und den Anteil adhärenter Thrombozyten widerspiegeln könnten [Albanese et al., 1995], bei Koronarangiographie nicht beobachtet wurden (Abb. 3-25a,b).

Verschiedene Studien, die Thrombozytenaktivierung bei Zugabe von nichtionischen Kontrastmitteln in-vitro beobachteten [Chronos et al., 1993; Albanese et al., 1995; Hay, Bull, 1996; Heptinstall et al., 1998], setzten das zu untersuchende Vollblut unphysiologisch hohen Kontrastmittelkonzentrationen (Mischungsverhältnis Kontrastmittel : Blut bis 1:1) aus. In der Koronarzirkulation allerdings liegt das Mischungsverhältnis nach koronarer Injektion des Kontrastmittels mit einem Verhältnis Kontrastmittel : Blut  $< 1:3$  deutlich darunter [Albanese et al., 1995]. Verringerte man den Kontrastmittelanteil [Chronos et al., 1993], so wurde auch in-vitro eine verringerte Thrombozytenaktivierung, gemessen an der CD62/CD63-Expression festgestellt, was diese These der Thrombozytenaktivierung durch zu hohe Kontrastmittelkonzentrationen untermauern mag.

#### **4.7 Einfluß der Kontrastmittel während PTCA auf die scherstress-vermittelte thrombozytäre Oberflächenbedeckung im Adhäsionsassay**

Auch nach PTCA waren die Thrombozyten im Adhäsionsassay in der Lage, unter hohem Scherstress an den Polystyrol-Platten zu adhäreren. Nach PTCA unter Verwendung von Iopentol war eine signifikant höhere Oberflächenbedeckung der Thrombozyten zu beobachten; wohingegen die Thrombozyten nach Koronarangiographie mit Iopentol dies nur ansatzweise, nicht-signifikant, zeigten (Abb. 3-26, 3-28). Ein Abfall der Anzahl adhärenter Thrombozyten nach Iodixanolgabe war hier ebenso wie bei Koronarangiographie mit dieser Substanz zu beobachten,

wohingegen PTCA unter Iohexolgabe die Thrombozytenadhäsion, wie zuvor, unbeeinflusst ließ (Abb. 3-26, Abb. 3-28). Somit scheint die PTCA, mit dem verbundenen Scherstress durch die Balloninflation, oder aber der periprozeduralen Heparin- und Aspiringabe, keine weiteren wesentlichen Veränderungen auf der Thrombozytenoberfläche, im Sinne eines geänderten Adhäsionsverhaltens, hervorzurufen. Die Ergebnisse ähneln denen des Adhäsionsassays während Koronarangiographie, so daß das unterschiedliche Adhäsionsverhalten der Thrombozyten eher auf die Gabe der unterschiedlichen Kontrastmittel zurückzuführen ist. Außerdem hat anscheinend auch der signifikante Thrombozytenabfall im peripheren Blutbild während PTCA keinen nennenswerten Effekt auf das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten (Abb.3-25). Warum allerdings unter Iopentol prozentual mehr Thrombozyten adhären, unter Iodixanol weniger und Iohexol die Oberflächenbedeckung unbeeinflusst läßt, bleibt eingehenderen Untersuchungen vorbehalten, wobei hier die an der Adhäsion beteiligten Komponenten – der vWF, die GPIIb/IIIa und GPIb-IX - näher untersucht werden sollten.

#### **4.8 Einfluß der PTCA auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Thrombozyten**

Wie bereits oben geschildert, gehen Koronarinterventionen wie z.B. PTCA mit lokaler Thrombozytenaktivierung einher [Dehmer et al., 1997]. Dieses wird auch durch die Tatsache belegt, daß periinterventionelle Aspiringabe, sowie andere antithrombozytäre Therapien die Inzidenz von Koronarthrombosen nach PTCA reduzieren [Barnathan et al., 1987; The EPIC investigators, 1994]. Heutzutage ist die Heparin- und ASS-Gabe bei PTCA-Patienten standardisiert [Windecker, 2000], durch neuere Thrombozyteninhibitoren (Abciximab, Integrilin, Lamifiban, Tirofiban etc.) wird durch Verstärkung und Ergänzung der Heparin- und Aspirinwirkung der antikoagulatorische Effekt potenziert und die thrombotischen Komplikationsraten reduziert [Grines et al., 1996].

Im Rahmen dieser Dissertation sollte untersucht werden, ob es während PTCA mit der einhergehenden Dilatation der Gefäßwand und der Begleitmedikation (Tab. 2.4) zu Änderungen des ex-vivo-Aktivierungszustands der Thrombozyten kommt. Hierzu

wurden je zehn Patienten den nichtionischen Kontrastmitteln Iopentol, Iodixanol und Iohexol zur PTCA zugeteilt.

Es zeigten sich ex-vivo bei den Thrombozyten unveränderte CD62- und CD63-Oberflächenexpressionen, sowie TSP-1-Bindung nach Applikation eines der drei nichtionischen Kontrastmittel während PTCA (Abb. 3-14, 3-15). Die „dense-bodies“ der Thrombozyten nahmen nach PTCA mit Injektion eines der drei Kontrastmittel in gleichem Maße den Fluorochromfarbstoff Mepacrine auf, wie die Thrombozyten in den Proben vor der Intervention (Abb. 3-15). Somit zeigt die Balloninflation mit der daraus resultierenden Gefäßdehnung im Rahmen der PTCA unter Verwendung nichtionischer Kontrastmittel keinen Einfluß auf den ex-vivo-Aktivierungszustand der Thrombozyten der durchflußzytometrisch zu detektieren wäre.

Eine mögliche Erklärung dafür könnte ein nur kurzes „Überleben“ lokal aktivierter Thrombozyten sein [Abrams, Shattil, 1991], andererseits könnten periinterventionell aktivierte Thrombozyten an der durch die Balloninflation geschädigten Gefäßwand adhären und so nicht im Effluat zu detektieren sein [Albanese et al., 1995]. Hierfür spräche auch der beobachtete signifikante Abfall der Thrombozytenzahlen nach PTCA (Abb. 3-25b), der einen „Verbrauch“ aktivierter Thrombozyten darstellen könnte. Kolarov und Mitarbeiter (1996) kamen zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich der CD62- und CD63-Expression der Thrombozyten, stellten aber bereits zwei Stunden nach Intervention einen Anstieg der Oberflächenexpression dieser Parameter fest. Nurden et al. (1994) beobachteten ebenfalls einen verzögerten Anstieg aktivierter Thrombozyten nach PTCA gemessen an der CD62-Expression. Hier kam es erst nach 24 Stunden zu einem Anstieg der CD62-Expression der Thrombozyten. Inoue und Mitarbeiter (1996) stellten thrombozytäre CD62- und CD63-Expression von Proben aus dem Koronarsinus vor und nach PTCA Vollblutproben aus der Aorta gegenüber. Sie beobachteten nach PTCA einen signifikanten Anstieg der CD62- und CD63-Expression in den Proben, die aus dem Koronarsinus abgenommen wurden, in den Proben aus der Aorta kam es zu keiner Änderung dieser Parameter. Dies könnte daran liegen, daß die Ballondilatation eine Thrombozytenaktivierung hervorruft, die mit einem peripheren Abnahmeort nicht detektiert werden kann, andererseits kann es durch den eingebrachten Koronarsinuskatheter zu einer artifiziellen Thrombozytenaktivierung kommen und die

Ergebnisse könnten gar nicht den tatsächlichen Zustand im dilatierten Koronargefäß widerspiegeln.

#### **4.9 Einfluß der PTCA auf die thrombin-induzierte Thrombozytenaktivierung**

Die vor und nach der PTCA gewonnenen Vollblutproben wurden mit 0,3 U/ml Thrombin inkubiert, um die Präsentation von Adhäsionsmolekülen an der thrombozytären Oberfläche zu detektieren und damit Aussagen über die Reaktivität der Thrombozyten nach Koronarinterventionen machen zu können.

An Abb. 3-18 ist ersichtlich, daß es in den Proben, die nach PTCA unter Verwendung eines der drei Kontrastmittel abgenommen wurden, zu einer signifikanten Inhibition sowohl der thrombin-induzierten CD62-Expression als auch der TSP-1-Bindung der Thrombozyten kam. Die Thrombozyten verhielten sich nach der Intervention nahezu refraktär zum Agonisten Thrombin, die alleinige Kontrastmittelgabe während der Koronarangiographie (Abb. 3-5) zeigt geringere Effekte - im Fall von Iodixanol gar keinen Effekt - auf die Reaktivität der Thrombozyten. Dies ließe sich dadurch erklären, daß der Sekretionsmechanismus der thrombozytären  $\alpha$ -Granula z.B. durch das Dilatationstrauma oder die lokale Ischämie während der PTCA geschädigt wurde und deshalb die Aktivierungsbereitschaft der Thrombozyten stark reduziert ist. Hier könnte allerdings auch der Einfluß von periinterventionell appliziertem Heparin (s. Tab. 2.4) zum Tragen kommen: Heparin ist ein Gemisch aus Glykosaminoglykanen und entfaltet seine antikoagulatorische Wirksamkeit in Zusammenarbeit mit Antithrombin III und inaktiviert damit Faktor Xa [Rupprecht, 2000] und Thrombin [Blaisdell, 1996], so daß das nahezu refraktäre Verhalten der Thrombozyten auf Thrombinstimulation in-vitro auch durch den direkten Thrombinantagonismus des Heparins erklärt werden könnte.

Die thrombin-induzierte CD63-Expression, sowie die Mepacrine-Abgabe der Thrombozyten in den Proben, die nach PTCA unter Verwendung eines der drei Kontrastmittel untersucht wurden, war ebenfalls stark reduziert (Abb. 3-19). Nach alleiniger Koronarangiographie konnten die „dense-bodies“ in gleichem Maße Mepacrine abgeben (Abb. 3-6), so daß anzunehmen ist, daß durch die PTCA mit der verbundenen Begleitmedikation (Tab. 2.4), dem Scherstress und der

Gefäßwandverletzung die Inhaltsstoffe der „dense-bodies“ bereits in-vivo ausgeschüttet worden sind, oder aber der Sekretionsmechanismus der „dense-bodies“ durch die Intervention geschädigt wurde.

#### **4.10 Einfluß der PTCA auf den ex-vivo Aktivierungszustand der Leukozyten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der Thrombozytenaktivierung auch der ex-vivo Aktivierungszustand der Monozyten und der neutrophilen Granulozyten nach PTCA mit einem der drei nichtionischen Kontrastmittel untersucht.

Interessanterweise zeigten die Proben, die nach PTCA mit Iodixanol- bzw. Iohexolgabe abgenommen wurden, ex-vivo signifikant geringere CD11b-Expression sowohl der Monozyten, als auch der PMNL (Abb. 3-20b,c Abb. 3-21b,c). Die Proben, die nach PTCA unter Verwendung des nichtionischen Monomers Iopentol gewonnen wurden, zeigten gleichbleibende CD11b-Oberflächenexpressionen für Monozyten und PMNL (Abb. 3-20a, Abb. 3-21a). Diese Ergebnisse unterscheiden sich von denen, die Mickelson und Mitarbeiter (1996) bei Untersuchungen von unfixierten Vollblutproben, die während PTCA mit Applikation des nichtionischen Kontrastmittels Iopamidol gewonnen wurden, machten. Hier kam es zu erhöhter CD11b-Expression sowohl der Monozyten, als auch der PMNL. Dies mag einerseits an der Molekülstruktur des verwendeten Kontrastmittels Iopamidol, andererseits auch an der Untersuchung unfixierter Zellen liegen. Feldman und Mitarbeiter (1994) beobachteten eine Abnahme der CD11b-Expression der neutrophilen Granulozyten nach PTCA unter Verwendung von Ioxaglate, einem ionischen Agens. Sie führten diese Beobachtung auf die hohe applizierte Kontrastmittelmenge zurück, die in-vitro PMNL-Funktionen wie Chemotaxis, Phagozytose und Degranulation beeinträchtigt und möglicherweise auch auf intrazelluläre Stoffwechselwege der PMNL wirkt [Feldman et al., 1994].

Letztendlich kann eine vorübergehende, lokalisiert auftretende oder später stattfindende Leukozytenaktivierung mit Hilfe der in dieser Arbeit angewendeten durchflußzytometrischen Methode nicht sicher ausgeschlossen werden, hierzu müßten weitere Blutproben z.B. nach 12 und 24 Stunden entnommen und untersucht werden. So zeigten beispielsweise Untersuchungen von Inoue (1996) und Serrano (1997) eine

erhöhte CD11b-Expression der neutophilen Granulozyten während PTCA erst mit einer gewissen Latenz von bis zu 24 Stunden; unmittelbar nach PTCA zeigten sich jedoch keine Veränderungen dieser Parameter. Sie führten dieses Phänomen auf die mit der PTCA verbundene kurzzeitige Ischämie, den provozierten Endothelschaden und die Freisetzung von proinflammatorischen Substanzen zurück [Inoue, 1996; Serrano, 1997].

Weiterhin zeigten sich ex-vivo erhöhte Assoziationsraten von Thrombozyten mit Monozyten bzw. PMNL in den Proben, die vor und nach PTCA unter Verwendung eines der drei Kontrastmittel gewonnen wurden, im Vergleich zu Proben gesunder Probanden (s. Kap. 3.1.5). Die initial erhöhten Assoziationsraten von Thrombozyten mit Monozyten fielen nach PTCA und Kontrastmittelgabe signifikant ab, wohingegen sich die Assoziationsrate von Thrombozyten mit PMNL nicht änderte (Abb. 3-24). Die initial erhöhte Anzahl von Leukozyten, die mit Thrombozyten assoziiert sind, zeigt, daß mindestens ein Bindungspartner stark aktiviert vorliegen muß und legt den Schluß nahe, daß die auf den Thrombozyten detektierten Adhäsionsmoleküle nicht mehr den eigentlichen Aktivierungszustand repräsentieren.

#### **4.11 Einfluß der PTCA auf die thrombin-induzierte Leukozytenaktivierung**

Bei den Untersuchungen zur Leukozytenaktivierbarkeit durch den Agonisten Thrombin zeigte sich in den Proben, die nach PTCA unter Verwendung eines der drei Kontrastmittel abgenommen wurden, eine signifikant reduzierte thrombin-induzierte CD11b-Expression und TSP-1-Bindung der Monozyten (Abb. 3-22). Dieser Effekt war ausgeprägter als bei den Proben nach Koronarangiographie und Gabe von Iopentol und Iohexol (Abb. 3.9a,c), wohingegen Iodixanol während Koronarangiographie keinen Einfluß auf die Monozytenaktivierbarkeit zeigte (Abb. 3-9b). Somit ist die stark reduzierte thrombin-induzierte CD11b-Expression und TSP-1-Bindung der Monozyten nach PTCA und Iodixanolgabe direkt auf periinterventionelle Faktoren wie z.B. die Begleitmedikation, das Dilatationstrauma und die kurzzeitige Ischämie zurückzuführen. PTCA unter Applikation von Iopentol und Iohexol scheint einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf die Monozytenaktivierbarkeit zu haben als die Koronarangiographie allein.

Die Untersuchungen zur Aktivierbarkeit der neutrophilen Granulozyten zeigte nach PTCA ebenfalls eine signifikant reduzierte thrombin-induzierte CD11b-Expression, die thrombin-induzierte TSP-1-Bindung der PMNL fiel nach PTCA um die Hälfte ab, wegen der hohen Standardabweichungen bei schon geringen Ausgangswerten konnte jedoch hier keine Signifikanz gezeigt werden. (Abb. 3-23). Nach Koronarangiographie unter Verwendung eines der drei Kontrastmittel zeigten die PMNL eine höhere thrombin-induzierte CD11b-Expression und TSP-1-Bindung als nach zusätzlicher PTCA, so daß auch hier die Ballondilatation mit entsprechender Begleitmedikation zu einem weitgehenden Verlust der Aktivierungsbereitschaft der Zellen führt.



## 5 Zusammenfassung

Die Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten ist von zentraler Bedeutung für die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen und wird bei Patienten mit koronarer und peripherer Arteriosklerose als Hauptursache gefäßokklusiver Komplikationen in Betracht gezogen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, in wie weit es bei Koronarangiographie und PTCA unter Verwendung dreier nichtionischer Kontrastmittel, Iopentol, Iodixanol und Iohexol, zu einer solchen Zellaktivierung kommt. Hierzu wurden 60 Patienten, je 30 für Koronarangiographie und PTCA einbezogen. Jeweils 10 Patienten wurden den Kontrastmitteln Iopentol, Iodixanol und Iohexol randomisiert und für den Untersucher blind zugeteilt.

Blutentnahmen aus den Einführbestecken erlaubten es, Aussagen über den ex-vivo-Aktivierungszustand und die Aktivierungsbereitschaft der Thrombozyten und Leukozyten zu machen. Hierzu wurde eine schonende Blutprobenvorbereitung der Zellen verwandt, die präparativ bedingte Zellartefakte minimiert und somit Verhältnisse in-vivo simuliert.

In dieser Arbeit konnte durch durchflußzytometrische Untersuchungen gezeigt werden, daß sich der ex-vivo-Aktivierungszustand der Thrombozyten und der Leukozyten durch Applikation von Iopentol, Iodixanol oder Iohexol während Koronarangiographie nicht ändert. Im Hinblick auf die Thrombozyten könnten die zellgebundenen Adhäsionsmoleküle allerdings schon in das Plasma abgegeben worden sein, und somit nicht mehr den in-vivo-Aktivierungszustand widerspiegeln. Die Untersuchungen zur thrombin-induzierten Thrombozytenaktivierung zeigen, daß Iopentol stärker als Iohexol die  $\alpha$ -Granula-Sekretion der Thrombozyten während Koronarangiographie inhibiert, wohingegen die dimere Substanz Iodixanol die thrombin-induzierte  $\alpha$ -Granula-Sekretion nicht verändert. Dies könnte auf molekulare, chemische und physikalische Unterschiede von Iodixanol gegenüber den monomeren Substanzen Iopentol und Iohexol zurückzuführen sein. Die thrombin-induzierte CD63-Expression wird am stärksten von Iopentol, gefolgt von Iohexol und Iodixanol inhibiert; die Mepacrine-

Sekretion der „dense-bodies“ bleibt von der Kontrastmittelgabe unter Koronarangiographie unbeeinflusst.

Es zeigten sich für das gesamte Patientenkollektiv ex-vivo erhöhte Thrombozyten-Leukozyten-Assoziationsraten, wobei die Thrombozyten bevorzugt mit Monozyten assoziiert sind. Dies mag die Beteiligung entzündlicher Prozesse und die Bedeutung der Zellinteraktion an der Entstehung und dem Progress arteriosklerotischer Erkrankungen unterstreichen. Die thrombin-induzierte Leukozytenaktivierung wurde durch Verwendung eines der drei Kontrastmittel während Koronarangiographie ebenfalls inhibiert.

Die durchflußzytometrischen Untersuchungen zeigten einen unveränderten ex-vivo Thrombozyten-Aktivierungszustand nach PTCA mit nichtionischen Kontrastmitteln. Die Thrombozyten zeigten sich allerdings nahezu refraktär auf die Thrombin-Stimulation in-vitro. Hier scheint die Dilatation mit der damit verbundenen kurzzeitigen Ischämie und der Endothelverletzung den Sekretionsmechanismus der Zellen zu inhibieren und zwar in einem stärkeren Maß als die alleinige Kontrastmittelapplikation während Koronarangiographie. Dieses refraktäre Verhalten auf die Thrombin-Stimulation in-vitro konnte auch bei den Untersuchungen zum Aktivierungsverhalten der Leukozyten nach PTCA beobachtet werden.

## 6 Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen und Ergebnisse zum Einfluß nichtionischer Kontrastmittel auf die Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung während Koronarangiographie und perkutaner transluminaler Koronarangiographie (PTCA) eröffnen weitere Aufgaben und neue Fragestellungen.

So könnte beispielsweise in weitergehenden Untersuchungen der Einfluß der im Rahmen dieser Arbeit nicht untersuchten ionischen Kontrastmittel analysiert werden und so direkt die Kontrastmittelwirkungen ionischer und nichtionischer Substanzen auf den ex-vivo Aktivierungszustand und die Aktivierungsbereitschaft der Zellen gegenübergestellt werden. Es könnte darüberhinaus untersucht werden, ob die applizierte Menge an Kontrastmittel Einfluß auf die gemessenen Parameter hat.

Weiterhin könnte der Fragestellung nachgegangen werden, ob Zellaktivierung ein lokal begrenztes Phänomen im Bereich der Koronararterien oder des Koronarsinus ist. Hierzu könnten Proben aus dem Koronarsinus mit denen aus dem peripheren Abnahmeort der venösen Gefäßschleuse verglichen werden. Hinsichtlich der Fragestellung, ob Zellaktivierung vor oder nach dem in diese Arbeit gewählten Abnahmezeitpunkt auftritt, könnten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Koronarangiographie und PTCA Blutproben abgenommen, untersucht und miteinander verglichen werden.

Die festgestellten erhöhten Assoziationsraten zwischen Thrombozyten und Leukozyten sowohl während Koronarangiographie als auch PTCA legen die Frage nahe, ob die gesteigerten Assoziationsraten als prognostischer Marker beispielsweise für eine Restenose im dilatierten Gefäß dienen könnten. Hierzu empfiehlt sich eine prospektive Studienplanung, die die Assoziationsrate zwischen Thrombozyten und Leukozyten mit später eintretenden Infarkt ereignissen oder Restenosen korreliert.

# 7 Anhang

## 7.1 Material

Alle hier verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders aufgeführt, von [Sigma diagnostics], St. Luis, USA oder [Merck], Darmstadt, BRD bezogen.

### 7.1.1 Selbst hergestellte Reagenzien

- Tyrode-Puffer pH 7.4

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,42 mM
NaHCO <sub>3</sub>	12 mM
D(+)-Glucose	5,5 mM
HEPES	5 mM

- PBS-Puffer, pH 7.4, pH 7.8

NaCL	137 mM
KCl	2,6 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	8 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM

- Mepacrine-Stammlösung:

Mepacrine 0,01M; in PBS, pH 7,4

- Hirudin

Rekombinantes Hirudin 250U/ml in NaCl-Lösung [Loxo / ai], Dossenheim, BRD

- GPRP (Glycin – Prolin – Arginin – Prolin)

GPRP 125mM in NaCl 154mM [Bachem], Bubendorf, Schweiz

## 7.1.2 Gekaufte Reagenzien

- Kontrastmittel

Die bei den Koronarangiographien und PTCA zum Einsatz gekommenen Kontrastmittel waren nicht-ionische, jodhaltige, und niederosmolare Kontrastmittel der Firma Nycomed Amersham, Ismaning b. München, BRD. (siehe Kapitel 2, Abb. 2.1, Tab. 2.2):

- Iohexol (Accupaque<sup>®</sup>)
- Iopentol (Imagopaque<sup>®</sup>)
- Iodixanol (Visipaque<sup>®</sup>)

Alle Kontrastmittel wiesen eine Iodkonzentration von 350 mg/ml auf.

- Chemikalien

- Formaldehyd 37% pa. [Roth], Karlsruhe, BRD
- Natronlauge 1 mol/l = 1N Lösung [Bernd Kraft GmbH], Duisburg, BRD
- Salzsäure 1 mol/l = 1N Lösung [Bernd Kraft GmbH], Duisburg, BRD
- May Grünwald 0,25% in Methanol [Sigma], St. Luis, USA
- FACSFlow, Sheath-Fluid [Beckton Dickinson], Heidelberg, BRD

- Thrombozytenverdünnungslösung [BioChem ImmunoSystems],  
Freiburg, BRD
- Lyse and Fix IOTest [Immunotech], Marseille, Frankreich
- Antikörper

Tab. 6.1 verwendete Antikörper

Antigen	Spezifität	Monoklonal	Klon	Konjugation	Bezugsquelle
		Polyklonal			
GP IX (CD42a)	Human	M	Beb1	FITC	Becton Dickinson
Fibrinogen	Human	P		FITC	DAKO
P-Selektin (CD62)	Human	M	CLB- thromb/6	FITC	Immunotech
Granulophysin (CD63)	Human	M	CLB- gran/12	FITC	Immunotech
MAC-1 (CD11b)	Human	M	D12	PE	Becton Dickinson
LPS-Rezeptor (CD14)	Human	M	RMO52	FITC	Immunotech
LPS-Rezeptor (CD14)	Human	M	M $\phi$ P9	PE	Becton Dickinson
Thrombinre- zeptor PAR-1	Human	M	SPAN12		Immunotech
Thrombinre- zeptor PAR-1	Human	M	WEDE15		Immunotech

Antigen	Spezifität	Monoklonal	Klon	Konjugation	Bezugsquelle
		Polyklonal			
Thrombo- spondin	Human	M	P10	PE	Immunotech
vWF	Human	M	4F9		Immunotech
Tissue Factor	Maus	M		FITC	Loxo/ai
Glycophorin A	Human	M	11E4B7.6	FITC	Immunotech

### 7.1.3 Einwegartikel

- Falcon FACS-Röhrchen, 5 ml [Becton Dickinson], Heidelberg, BRD
- Scheraggregometerplatten Nunclon Surface Multidish [Nunc], Roskilde, Dänemark
- Natrium-Citrat-Monovetten 10 ml [Sarstedt], Nürnberg, BRD
- Einführschleusen-System 5F/6F [Cordis], Haan, BRD
- Multiadapter [Sarstedt], Nürnberg, BRD
- Reagiergefäße mit Rundboden à 1.5ml, 5ml, 10ml [Sarstedt], Nürnberg, BRD
- Pipettenspritzen weiß, gelb, blau [Eppendorf], Köln, BRD

## 7.2 Geräte

### Zentrifugen

- Jouan B4i [Jouan], Marlberg, BRD
- Sigma 3k1 [Sigma], Osterode, BRD

### Zellzählgerät

- Hämostaseologiesystem 9000 [BioChemImmunoSystems],  
Freiburg, BRD

### Aggregometrie

- Scherstressaggregometer N. Savion, Goldschleger Institut, Israel
- Inverses Mikroskop: Anxiovert 135 TV [Zeiss], Jena, BRD
- Auswerteeinheit und Computerprogramm/Aggrolink: [Nobis], Endingen,  
BRD
- Steuereinheit: Multicontrol 2000 [Märzhäuser], Wetzlar, BRD
- Bildbearbeitungsprogramm Optimas 5.2: [R.B. Dickinson], [Optimas],  
USA
- Kameraadapter Sony CMA-D2: [Sony], USA

### Durchflußzytometer und Auswerteeinheit

- Durchflußzytometer FACScan: [Becton Dickinson], Heidelberg, BRD
- Computersystem: Power Macintosh 7600/132, [Machintosh],  
Cupertino, USA



- Software: Cell Quest, 3.1f [Beckton Dickinson], Heidelberg, BRD
- Drucker: 1600CM [Hewlet Packard], San Diego, USA

### Sonstige Geräte

- Waage Sartorius 2355: [Sartorius], Göttingen, BRD
- pH-Meter STH600: [WTB], Weilheim, BRD
- Eismaschine Scotsman AF10: [Fisher Scientific], Nidderau, BRD
- Wasseraufbereitungsanlagen Elix10, Milli-Q-biocal: [Millipore], Eschborn, BRD
- Pipetten à 10µl, 20µl 50µl, 1-100µl, 1-200µl, 1-1000µl: [Eppendorf], Köln, BRD

## 8 Literaturverzeichnis

1. Visipaque, Accupaque, Imagopaque: Fachinformation der Firma Nycomed Amersham Arzneimittel GmbH, Frauenhoferstr. 7, 85737 Ismaning b. München. 2000.
2. Abrams C, Shattil SJ: Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thrombosis and Haemostasis* 1991;65:467-473
3. Akkerman JWN, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ: *Thrombose und Arteriosklerose - Pathophysiologie*. Biberach, Thomae GmbH, 1987.
4. Albanese JR, Venditto JA, Patel GC, Ambrose JA: Effects of ionic and nonionic contrast media on in vitro and in vivo platelet activation. *Am J Cardiol* 1995;76:1059-1063
5. Almén T: Visipaque - a step forward. *Acta Radiologica* 1995;36:2-18
6. Authi KS: Ca<sup>2+</sup> homeostasis in human platelets., in Bruchhausen F von, Walter U (eds): *Platelets and their factors - handbook of experimental pharmacology*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1997, pp 325-370
7. Barnathan E, Schwartz JS, Taylor L, Laskey WK, Kleaveland JP, Kussmaul WG, Hirshfeld JW: Aspirin and dipyridamole in the prevention of acute coronary thrombosis complicating coronary angioplasty. *Circulation* 1987;76:125-134
8. Bennett JS: Integrin structure and function in hemostasis and thrombosis. *Ann NY Acad Sci* 1991;614:214-228
9. Berger G, Masse JM, Cramer EM: Alpha-granule membrane mirrors the platelet plasma membrane and contains the glycoproteins Ib, IX and V. *Blood* 1996;87:1385-1395
10. Blaisdell FW: Heparin - controversies and misconceptions. *Cardiovasc Surg* 1996;4:691-700
11. Bonfanti R, Furie B, Furie BC, Wagner DD: PADGEM (GMP 140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 1989;73:1109-1112
12. Brass LF, Pizarro S, Ahuja M, Belmonte E, Blanchard N, Stadels JM, Hoxie JA: Changes in the structure and function of the human thrombin receptor during receptor activation, internalization and recycling. *J Biol Chem* 1994;269:2943-2952

13. Brass LF, Ahuja M, Belmonte E, Pizarro S, Tarver A, Hoxie JA: The human thrombin receptor: turning it on and turning it off. *Ann NY Acad Sci* 1994;714:1-12
14. Brinker JA: Contrast controversy: more to it than meets the eye. *J Am Coll Cardiol* 1991;18:451-453
15. Carrell NA, Fitzgerald LA, Steiner B, Erikson HP, Phillips DR: Structure of human platelet membrane glycoprotein IIb and IIIa as determined by electron microscopy. *J Biol Chem* 1985;260:1743-1749
16. Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, De Blasi A, Ready N, Furie BC, Furie B: P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8767-8771
17. Chronos NAF, Goodall AH, Wilson DJ, Sigwart U, Buller NP: Profound platelet degranulation is an important side effect of some types of contrast media used in interventional cardiology. *Circulation* 1993;88:2035-2044
18. Chronos NAF, Sigwart U, Goodall AH, Buller NP: Contrast media induced platelet degranulation is dose dependent (abstr). *J Am Coll Cardiol* 1993;21:99A
19. Clemetson KJ: Platelet activation: Signal transduction via membrane receptors. *Thromb Haemost* 1995;74:111-116
20. Clemetson KJ, Polgár J: Platelet adhesion and aggregation receptors, in Bruchhausen F von, Walter U (eds): *Platelets and their factors - handbook of experimental pharmacology*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1997, pp 155-179
21. Clemetson KJ, Scharf RE: Bernard-Soulier-Syndrom, in Mueller-Berghaus G, Poetsch B (eds): *Hämostaseologie: molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1999, pp 53-56
22. Coughlin SR: Thrombin receptor structure and function. *Thromb Haemost* 1993;66:184-187
23. De Groot PG, Sixma JJ: Glykoproteinrezeptoren der Thrombozytenmembran: Biochemie, Molekularbiologie und Physiologie, in Mueller-Berghaus G, Poetsch B (eds): *Hämostaseologie: molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik*. Berlin, Heidelberg, New York, 1999, pp 15-26
24. DeFeyer PJ, van den Brand M, Laarmann GJ: Acute coronary artery occlusion during and after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Frequency, prediction, clinical course, management and follow-up. *Circulation* 1991;83:927-936

25. Dehmer GJ, Nichols TC, Bode AP, Liles D, Sigman J, Li S, Koch G, Tate DA, Griggs TR: Assessment of platelet activation by coronary sinus blood sampling during balloon angioplasty and directional coronary atherectomy. *Am J Cardiol* 1997;80:871-877
26. Dehmer GJ, Nichols TC, Li S, Koch GG, Tate DA, Griggs TR: Effect of an ionic and nonionic contrast agent on von Willebrand factor assessed during coronary angiography. *Am J Cardiol* 1999;84:223-225
27. DeServi S, Mazzone A, Ricevuti G, Fioravanti A, Bramucci E, Angoli L, Stefano G, Specchia G: Granulocyte activation after coronary angioplasty in human. *Circulation* 1990;82:140-146
28. Detre K, Holubkov R, Kelsey S, Cowley M, Kent L, Williams D, Myler R, Faxon D, Holmes D jr, Bourassa M, et al. and the coinvestigators of the National Heart, Lung and Blood Institutes percutaneous transluminal coronary angioplasty registry: Percutaneous transluminal coronary angioplasty in 1985-1986 and 1977-1981: The National Heart, Lung and Blood Institute Registry. *N Engl J Med* 1988;318:265-270
29. Diamond MS, Springer TA: A subpopulation of Mac-1 molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. *J Cell Biol* 1993;120:545-556
30. Dörmann D, Clemetson JM, Navdaev A, Kehrel BE Clemetson K: Alboaggregin A activates platelets by a mechanism involving glycoprotein VI as well as glycoprotein Ib. *Blood* 2001;97:929-936
31. Faili A, Emadi S, Vargaftig BB, Hatmi M: Dissociation between the phospholipases C and A<sub>2</sub> activities in stimulated platelets and their involvement in arachidonic acid liberation. *Br J Haematol* 1994;88:149-155
32. Feldman LJ, Chollet-Martin S, Himbert D, Juliard J-M, Pasquier C, Elbim C, Steg PG: Modulation of the expression of the granulocyte adhesion molecule, CR3, by percutaneous transluminal coronary angioplasty and contrast media. *Invest Radiol* 1994;29:313-318
33. Fox JE: Regulation of platelet function by the cytoskeleton. *Adv Exp Med Biol* 1993;344:175-185
34. Frazier WA, Dixit VM, Galvin NJ, Rotwein PR: Structure of human thrombospondin: complete amino acid sequence derived from DNA. *Sem Thromb Hemost* 1987;13:255-260
35. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD: P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interaction in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 2000;191:1413-1422

36. Frojmovic MM, Milton MG: Human platelet size, shape and related functions in health and disease. *Physiol Rev* 1982;62:185-261
37. Furie B, Furie BC: Leukocyte crosstalk at the vascular wall. *Thrombosis and Haemostasis* 1997;78:306-309
38. Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, Hechtman HB, Michealson AD: Increased platelet reactivity nad circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:352-358
39. Gasperetti CM, Feldman MD, Burwell LR, Angello DA, Haugh KH, Owen RM, Powers ER: Influence of contrast media on thrombus formation during coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1991;18:443-450
40. Gawaz M, Bogner C, Gurland HJ: Flow-cytometric analysis of mepacrine-labelled platelets in patients with end-stage renal failure. *Haemostasis* 1993;23:284-292
41. Gawaz M: Thrombozyten und primäre Hämostase, in Gawaz M (ed): *Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung*. Stuttgart, New York, Thieme-Verlag, 1999, pp 4-29
42. Gawaz M: Funktionsdiagnostik, in Gawaz M (ed): *Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung*. Stuuatgart, New York, Thieme-Verlag, 1999, pp 42-53
43. Gawaz M: Thrombozytäre Membranglykoproteine., in Gawaz M (ed): *Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombotische Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung*. Stuttgart, New York, Thieme-Verlag, 1999, pp 30-41
44. Gawaz MP, Mujais SK, Schmidt B, Gurland HJ: Platelet-leukocyte aggregation during hemodialysis. *Kidney Int* 1994;46:489-495
45. George JN, Pickett EB, Saucerman S, McEver RP, Kunicki TJ, Kieffer N, Newman PJ: Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest* 1986;78:340-348
46. Goto S, Salomon DR, Ikeda Y, Ruggeri ZM: Characterization of the unique mechanism mediating the shear-depending binding of soluble von Willebrand factor to platelets. *J Biol Chem* 1995;270:23352-23361
47. Grabowski EF, Head C, Michealson AD: Nonionic contrast media - procoagulants or clotting innocents? *Invest Radiol* 1993;S21-S24

48. Grines CL, Schreiber TL, Savas V, Jones DE, Zidar FJ, Gangadharan V, Brodsky M, Levin R, Safian R, Puchrowicz-Ochocki S, Castellani MD, O'Neill WW: A randomized trial of low osmolar ionic versus nonionic contrast media in patients with myocardial infarction or unstable angina undergoing percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:1381-1386
49. Grollman JH, Liu CK, Astone RA, Lurie MD: Thromboembolic complications in coronary angiography associated with the use of non-ionic contrast medium. *Cath Cardiovasc Diagn* 1988;14:159-164
50. Gruentzig AR, Senning A, Siegenthaler WE: Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1979;301:61-68
51. Halushka PV, Pawate S, Martin ML: Thromboxana A<sub>2</sub> and other eicosanoids., in Bruchhausen F von, Walter U (eds): *Platelets and their factors - handbook of experimental pharmacology*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1997, pp 459-482
52. Hamburger SA, McEver RP: GMP-140 mediates the adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* 1990;75:550-554
53. Hannan EL, Arani DT, Johnson LW, Kemp HG, Lukacik G: Percutaneous transluminal coronary angioplasty in New York State. *J Am Med Ass* 1992;268:-3097
54. Harbrecht U: Die Thrombozytenaggregation: Physiologie und Pathophysiologie, in Mueller-Berghaus G, Poetsch B (eds): *Hämostaseologie: molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1999, pp 27-35
55. Harderman MR, Konijnenberg A, Sturk A, Reekers JA: Activation of platelets by low-osmolar contrast media: differential effects of ionic and nonionic agents. *Radiology* 1994;192:563-566
56. Harmjanz D, Bonzel T, Neuhaus KL, Vogt A: PTCA mit und ohne chirurgischen standby im selben Krankenhaus bei 12965 Patienten. *Z Kardiol* 1994;83:Suppl I: 136(Abstract)
57. Harrison P, Cramer EM: Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 1993;7:52-62
58. Hay KL, Bull BS: Factors influencing the activation of platelets by nonionic contrast media. *Journal of Vascular and Interventional Surgery* 1996;7:401-407
59. Heptinstall S, White A, Edwards N, Pascoe J, Sanderson HM, Fox SC, Henderson RA: Differential effects of three radiographic contrast media on platelet aggregation and degranulation: implications for clinical practice? *British Journal of Haematology* 1998;103:1023-1030

60. Herrmann M, Hartleib J, Kehrel B, Montgomery RR, Sixma JJ, Peters G: Interaction of von Willebrand factor with staphylococcus aureus. *J Infect Dis* 1997;176:984-991
61. Holmsen H, Day HJ: The selectivity of the thrombin-induced platelet release reaction: Subcellular localization of released and retained constituents. *J Lab Clin Med* 1970;75:840-855
62. Hughes BJ, Hollers JC, Crockett-Torabi E, Smith CW: Recruitment of CD11b/CD18 to the neutrophil surface and adherence-dependent cell locomotion. *J Clin Invest* 1992;90:1687-1696
63. Hurst JW: The first coronary angioplasty as described by Andreas Gruentzig. *Am J Cardiol* 1986;57:185-186
64. Ikeda H, Nakayama H, Oda T, Kuwano K, Yamaga A, Ueno T, Yoh M, Hiyamuta K, Koga Y, Toshima H: Neutrophil activation after percutaneous transluminal angioplasty. *Am Heart J* 1994;128:1091-1098
65. Ikeda Y, Handa M, Kawano K: The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest* 1991;87:1234-1240
66. Inoue T, Hoshi K, Fujito T, Sakai Y, Morooka S, Shoma R: Early detection of platelet activation after coronary angioplasty. *Coronary Artery Disease* 1996;7:529-534
67. Inoue T, Sakai Y, Morooka S, Hayashi T, Takayanagi K, Takabatake Y: Expression of polymorphonuclear leukocyte adhesion molecules and its clinical significance in patients with percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:1127-1133
68. Iyengar G, Borberg H, Kasperek K, Kiem j, Siegers M, Feinendegen LE, Gross R: Elemental composition of platelets. I. Sampling and sample preparation of platelets for trace element analysis. *Clin Chem* 1979;25:699-704
69. Jasinski I, Kehrel B: Rationale of platelet pharmacology in haemodynamics, in Klingelhoefer J, Bartels E, Ringelstein EB (eds): *New trends in cerebral hemodynamics and neurosonology*. Amsterdam, Elsevier Science BV, 1997, pp 97-102
70. Jennings LK, Phillips DR: Purification of glycoproteins IIb and III from human platelet membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb-III complex. *J Biol Chem* 1982;257:10458-10466
71. Jollis JG, Peterson ED, DeLong ER, Mark DB, Collins SR, Muhlbaier LH, Pryor DB: The relation between the volume of coronary angioplasty procedures at hospitals treating Medicare beneficiaries and short-term mortality. *N Engl J Med* 1994;331:1625-1629

72. Jurk K: *Untersuchungen zur Aktivierung von Thrombozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten und deren Wechselwirkungen untereinander.* 1999.
73. Kadel C, Kober G: PTCA, in Unger F, Moerl H, Dieterich HA (eds): *Interventionen am Herzen.* Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1995, pp 75-104
74. Kahn ML, Nakanshi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR: Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest* 1999;103:879-887
75. Kehrel B, Kronenberg A, Schwippert B, Niesing-Bresch D, Niehues U, Tschöepe D, van de Loo J, Clemetson KJ: Thrombospondin binds normally to glycoprotein IIIb deficient platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;179:985-991
76. Kehrel B, Flicker B, Wigbels B, Osterfeld M, van de Loo J, Luescher EF: Thrombospondin measured in whole blood - an indicator of platelet activation. *Blood Coagul Fib* 1996;7:202-205
77. Kehrel B, Wierwille S, Clemetson KJ, Anders O, Steiner M, Knight CG, Farndale RW, Okuma M, Barnes MJ: Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa and von Willebrand Factor do not. *Blood* 1998;91:491-499
78. Kehrel B, Maas M, Kardoeus J: Platelet glycoproteins: function and flow cytometric analysis., in Gutensohn K, Sonneborn HH, Schuenter F, Kühnl P (eds): *Flow cytometry in transfusion medicine.* Heidelberg, Clin Lab Publications, 1998, pp 1-14
79. Kieffer N, Phillips DR: Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:329-357
80. Kieffer N, Guichard J, Breton-Gorius J: Dynamic redistribution of major platelet surface receptors after contact-induced platelet activation and spreading. *Am J Pathol* 1992;140:57-73
81. King SB: Angioplasty from bench to bedside to bench. *Circulation* 1996;93:1621-1629
82. Kloczewiak M, Timmons S, Hawiger J: Localization of a site interacting with human platelet receptor on carboxy-terminal segment of human fibrinogen gamma chain. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;16:181-187
83. Knobler H, Savion N, Shenkman B, Kotev-Emeth S, Varon D: Shear-induced platelet adhesion and aggregation on subendothelium are increased in diabetic patients. *Throm Res* 1998;90:181-190



84. Kober G: Indications for coronary angioplasty., in Meier B (ed): *Interventional cardiology*. Toronto, Lewiston, New York, Bern, Göttingen, Stuttgart, Hofgreffe & Huber, 1990, pp 31-43
85. Kolarov P, Tschoepe D, Niewenhuies HK, Gries FA, Strauer B, Schultheiss HP: PTCA: Periprocedural platelet activation, part II of the Duesseldorf PTCA platelet study (DPPS). *Eur Heart J* 1996;17:1222
86. Krakau I: Kontrastmittel, in Krakau I (ed): *Das Herzkatheterbuch: Diagnostische und interventionelle Kathetertechniken*. Stuttgart; New York, Thieme Verlag, 1999, pp 19-23
87. Krakau I: Die Koronarangiographie, in Krakau I (ed): *Das Herzkatheterbuch: Diagnostische und interventionelle Kathetertechniken*. Stuttgart, New York, Thieme-Verlag, 1999, pp 39-66
88. Lahav J: The function of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta* 1993;1182:1-14
89. Larson E, Palabrica T, Sajer S, Gilbert GE, Wagner DD, Furie BC, Furie B: PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15). *Cell* 1990;63:467-487
90. Lasser EC: Pretreatments with corticosteroids to prevent reactions to contrast media: overview and implications. *Am J Roentgenol* 1988;150:257-259
91. Lautin EM, Freeman NJ, Schoenfeld, CW, Bakal CW, Haramati N, Friedman AC, Lautin JL Braha, Kadish EG, Sprayregen S: Radiocontrast-associated renal dysfunction: incidence and risk factors. *Am J Roentgenol* 1991;157:49-58
92. Legrand C, Dubernard V, Kieffer N, Nurden AT: Use of a monoclonal antibody to measure the surface expression of thrombospondin following platelet activation. *Eur J Biochem* 1988;171:393-399
93. Leung LLK: Role of thrombospondin in platelet aggregation. *J Clin Invest* 1984;74:1764-1772
94. Mannebach H, Hamm C, and Horstkotte D. 17. Bericht über die Leistungszahlen der Herzkatheterlabore in der Bundesrepublik Deutschland. 2000.
95. McEver RP: Selectins: novel receptor that mediate leukocyte adhesion during inflammation. *Thrombosis and Haemostasis* 1991;65:223-228
96. Michelson AD: Platelet activation by thrombin can be directly measured in whole blood through the use of the peptide GPRP and flow cytometry: methods and clinical applications. *Blood Coagul Fib* 1993;5:121-131

97. Michelson AD: Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996;87:4925-4936
98. Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, Valeri CR: In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11877-11882
99. Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, Hughes BJ, Smith CW: Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol* 1996;28:345-353
100. Modderman PW, Admiraal LG, Sonnenberg A, Von Dem Borne AGE Kr: Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. *J Biol Chem* 1992;267:364-369
101. Morgenstern E, Kho A: Morphometrische Untersuchungen an Blutplättchen. Veränderungen der Plättchenstruktur bei Pseudopodienbildung und Aggregation. *Cytobiologie* 1977;15:233-249
102. Morgenstern E: Human platelet Morphology/Ultrastructure., in Bruchhausen F von, Walter U (eds): *Platelets and their factors - handbook of experimental pharmacology*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1997, pp 27-60
103. Morgenstern E: Morphologie der Thrombozyten, in Mueller-Berghaus G, Poetsch B (eds): *Hämostaseologie: molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1999, pp 3-14
104. Nakashima S, Banno Y, Nozawa Y: Platelet phospholipase C and D, in Bruchhausen F von, Walter U (eds): *Platelets and their factors - handbook of experimental pharmacology*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1997, pp 231-246
105. Neumann F-J, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, Sticherling C, Meinel C, May A, Schoemig A: Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation* 1997;95:2387-2394
106. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC II, Lyman S, Paddock C, Müller WA: PECAM-1 (CD 31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 1990;247:1219-1222
107. Nieuwenhuis HK: Storage-pool-Erkrankungen, in Mueller-Berghaus G, Poetsch B (eds): *Hämostaseologie: molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1999, pp 61-66

108. Nishibori M, Cham B, McNicol A, Shalev A, Jain N, Gerrard JM: The Protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlak syndrome, and appears identical to granulophysin. *J Clin Invest* 1993;91:1775-1782
109. Nowak G: Hirudin: Pharmakologie und Therapie, in Mueller-Berghaus G, Poetsch B (eds): *Hämostaseologie: molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1999, pp 698-704
110. Nurden AT, Macchi L, Bihour C., Durrieu C, Besse P, Nurden P: Markers of platelet activation in coronary heart disease patients. *European Journal of Clinical Investigation* 1994;24:42-45
111. Osterud B: Tissue factor: a complex biological role. *Thrombosis and Haemostasis* 1997;78:755-758
112. Ott I, Neumann F-J, Gawaz M, Schmitt M, Schoemig A: Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* 1996;94:1239-1246
113. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu Y-M, Sajer SA, Furie B: Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992;359:848-851
114. Peters MJ, Heyderman RS, Hatch DJ, Klein NJ: Investigation of platelet-neutrophil interactions in whole blood by flow cytometry. *J Immunol Meth* 1997;209:125-135
115. Philips DR, Charo IF, Scarborough RM: GPIIB-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 1991;65:359-362
116. Preissner KT, De Groot PG: Platelet adhesion molecules in natural immunity, in Sim E (ed): *Natural immune system: humoral factors*. Oxford University Press, 1993, pp 281-318
117. Puma JA, Sketch MH, Tchong JE, Harrington JA, Philipps HR, Stack RS, Califf RM: Percutaneous revascularization of chronic coronary occlusions: an overview. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1-11
118. Quinn MJ, Fitzgerald DJ: Ticlopidine and clopidogrel. *Circulation* 1999;100:1667-1672
119. Raffael A: Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie. *Labor-Medizin* 1988;11:89-97

120. Redlich H, Vickers J, Loesche W, Heptinstall S, Kehrel B, Spangenberg P: Formation of platelet-leukocyte conjugates in whole blood. *Platelets* 1997;8:419-425
121. Reifart N: Experience of coronary angioplasty in 10.000 patients without on site surgical backup. *Eur Heart J* 1993;J14:Suppl 290(Abstract)
122. Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR: Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils. *Blood* 1991;78:1760-1769
123. Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR: Dynamics of leukocyte-platelet-adhesion in whole blood. *Blood* 1991;78:1730-1737
124. Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Matthew J, Hines R, Smith BR: Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion. *Blood* 1992;79:1201-1205
125. Roberts DD, Sherwood JA, Spitalnik SL, Howard RJ, Dixit VM, Frazier WA, Miller LH, et al.: Thrombospondin binds falciparum malaria parasitized erythrocytes and may mediate cytoadherence. *Nature* 1985;318:64-66
126. Rohrer MJ, Kestin AS, Ellis PA, Barnard MR, Rodino L, Breckwood WL, Li J-M, Michealson AD: High dose heparin suppresses platelet alpha granule secretion. *J Vasc Surg* 1992;15:1000-1009
127. Ruf A, Patscheke H: Platelet-expressed fibrinogen induces the oxidative burst in neutrophils by an interaction with CD11c/CD18. *Br J Haematol* 1995;90:791-796
128. Ruf A, Frojmovic M, Patscheke H: Platelet aggregation., in Bruchhausen F von, Walter U (eds): *Platelets and their factors - handbook of experimental pharmacology*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1997, pp 83-98
129. Ruggeri ZM: The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Progr Hemost Thromb* 1991;10:35-68
130. Rupperecht HJ: Stellenwert von Heparin, niedermolekularem Heparin und Hirudin bei akutem Koronarsyndrom., in Hach-Wunderle V, Neuhaus K-L (eds): *Gerinnungsaktive Therapie beim akuten Koronarsyndrom*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 2000, pp 37-47
131. Sako D, Chang X-J, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, Veldman GM, Bean KM, Ahern TJ, Furie B, Cumming DA, Larsen GR: Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 1993;75:1179-1186
132. Santoro SA: Thrombospondin and the adhesive behavior of platelets. *Sem Thromb Hemost* 1987;13:290-297

133. Schmitz G, Rothe G: *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Stuttgart, Schattauer-Verlag, 1994,
134. Schroer K: *Thrombozyten Physis: Spezial; 67*. München, Urban & Vogel, 1993, pp 1-19
135. Schwartz L, Bourassa, Lesperence J, Aldridge HE, Kazim F, Salvatori VA, Henderson M, Bonan R, David PR: Aspirin and dipyridamol in the prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1988;318:1714-1719
136. Serrano CV, Ramires JAF, Venturinelli M, Arie S, D'Amico E, Zweier JL, Pileggi F, Da Luz P: Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:1276-1283
137. Shebuski RJ, Ramjit DR, Bencen GH, Polokoff MA: Characterization and platelet inhibitory activity of bitistatin, a potent arginine-glycine-aspartic acid-containing peptide from the venom of the viper *Bitis arietans*. *J Biol Chem* 1989;264:21550-21556
138. Shenkman B, Linder N, Savion N, Tamarin I, Dardik R, Kennet G, German B, Varon D: Increased neonatal platelet deposition on subendothelium under flow conditions: the role of plasma von Willebrand factor. *Pediatric Research* 1999;45:270-275
139. Siess W: Platelet receptors: the thrombin receptor., in Bruchhausen F von, Walter U (eds): *Platelets and their factors - handbook of experimental pharmacology*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1997, pp 101-116
140. Silverstein RL, Nachman RL: Thrombospondin binds to monocytes-macrophages and mediates platelet-monocyte adhesion. *J Clin Invest* 1987;79:867-874
141. Silverstein RL, Asch AS, Nachman RL: Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion. *J Clin Invest* 1989;84:546-552
142. Simon R, Koch M, Berger H, Amende I, Herrmann G, Reil S: Die Wirkung von ionischen und nichtionischen Kontrastmitteln auf die Hämodynamik des menschlichen Koronarkreislaufs, in Kober S, Schraeder R (eds): *Kontrastmittel in der Kardiologischen Funktionsdiagnostik*. Konstanz, Schnetztor, 1989,
143. Simon R, Lins M: Angiokardiographie, in Hess OM, Simon RWR (eds): *Herzkatheter: Einsatz in Diagnostik und Therapie*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1999, pp 34-78
144. Sixma JJ, Wester J: The hemostatic plug. *Semin Hemat* 1977;14:265-299

145. Sixma JJ, De Groot PG: von Willebrand Factor and the blood vessel wall. *Mayo Clin Proc* 1991;66:628-633
146. Smith JW, Ruggeri ZM, Kunicki TJ, Cheresh DA: Interaction of alpha V beta 3 and glycoprotein IIb-IIIa with fibrinogen. Differential peptide recognition accounts for distinct binding sites. *J Biol Chem* 1990;265:12267-12271
147. Spangenberg P, Redlich H, Bergmann I, Loesche W, Goetzrath M, Kehrel B: The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes. *Thrombosis and Haemostasis* 1993;70:514-521
148. Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF: A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *The Journal of Cell Biology* 1985;101:880-886
149. Stormorken H, Skalpe IO, Testart MC: Effect of various contrast media on coagulation, fibrinolysis and platelet function - an in vitro and in vivo study. *Invest Radiol* 1986;21:348-354
150. Suzuki H, Yamazaki H, Tanoue K: Structure of resting platelets, in Suzuki H, Yamazaki H, Tanoue K (eds): *Immunocytochemical aspects of platelet membrane glycoproteins and adhesive proteins during activation*. Stuttgart, New York, Gustav Fischer Verlag, 1996, pp 4-17
151. Tedder TF, et al.: The selectins: Vascular adhesion molecules. *FASEB J* 1995;9:866-873
152. The EPIC investigators: Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1994;330:956-961
153. Tschoepe D, Schwippert B: Platelet flow cytometry - adhesive proteins., in Bruchhausen F von, Walter U (eds): *Platelets and their factors - handbook of experimental pharmacology*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1997, pp 619-643
154. Vainer J, Fleisch M, Gunners P: Low dose heparin for routine coronary angioplasty and stenting. *Am J Cardiol* 1996;78:964-966
155. van Zanten GH, De Groot PG, Sixma JJ: Platelet adhesion, in Bruchhausen F von, Walter U (eds): *Platelets and their factors - handbook of experimental pharmacology*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1997, pp 61-81
156. Varon D, Dardik R, Shenkman B, Kotev-Emeth S, Farzame N, Tamarin I, Savion N: A new method for quantitative analysis of whole blood platelet interaction with extracellular matrix under flow conditions. *Throm Res* 1997;85:283-294
157. Varon D, Lashevski I, Brenner B, Beyar R, Lanir N, Tamarin I, Savion N: Cone and plate(let) analyzer: monitoring glycoprotein IIb/IIIa antagonists and von

- Willebrand disease replacement therapy by testing platelet deposition under flow conditions. *Am Heart J* 1998;135:S187-S193
158. Wall JE, Buijs-Wilts M, Arnold JT, Wang W, White MM, Jennings LK, Jackson CW: A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents. *Br J Haematol* 1995;89:380-385
159. Ware JA, Johnson PC, Smith M, Salzman EW: Effect of common calcium agonists on cytoplasmic ionized calcium concentration in platelets. Measurement with 2-methyl-6-methoxy 8-nitroquinoline (quin-2) and aequorin. *J Clin Invest* 1986;77:878-886
160. Warkentin TE, Powling MJ, Hardisty RM: Measurement of fibrinogen binding to platelets in whole blood by flow cytometry: a micromethod for the detection of platelet activation. *British Journal of Haematology* 1990;76:387-394
161. Weiss HJ: von Willebrand Factor and platelet function. *Ann NY Acad Sci* 1991;614:125-137
162. Wencel-Drake JD, Boudignon-Proudhon C, Dieter MG, Criss AB, Parise LV: Internalization of bound fibrinogen modulates platelet aggregation. *Blood* 1996;87:602-612
163. Wheelless LL Jr: Flow instrumentation and data analysis., in Coon JS, Weinstein RS (eds): *Diagnostic flow cytometry*. Baltimore, Hong Kong, London, Williams & Wilkins, 1991, pp 17-34
164. White CW, Chaitman B, Lasser TA, and the ticlopidine study group: Antiplatelet agents are effective in reducing the immediate complications of PTCA: results from the ticlopidine multicenter trial. *Circulation* 1987;76 (Suppl IV):IV-400
165. White GJ, Clawson CC: The surface-connected canalicular system of blood platelets - a fenestrated membrane system. *Amer J Pathol* 1980;101:353-364
166. White JG: Electron microscopic studies of platelet secretion. *Progr Hemost Thromb* 1974;2:49-98
167. White JG, Leistikow EL, Escolar G: Platelet membrane responses to surface and suspension activation. *Blood Cells* 1990;16:43-72
168. White JG: The dense bodies of human platelets., in Meyers KM, Barnes CD (eds): *The platelet amine storage granule*. London, Tokyo, CRC Press, 1992, pp 1-29
169. White JG: Platelet ultrastructure, in Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EDG (eds): *Haemostasis and Thrombosis*. Edingburgh, London, New York, Churchill Livingstone, 1994, pp 66-78

170. Windecker S, Maier W, Hess OM: Koronarangiographie, in Hess OM, Simon RWR (eds): *Herzkatheter: Einsatz in Diagnostik und Therapie*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 2000, pp 79-127
171. Woods VL, Wolff LE, Keller DM: Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins. *J Biol Chem* 1986;261:15242-15251
172. Xiao Z, Theroux P, Frojmovic M: Modulation of platelet-neutrophil interaction with pharmacological inhibition of fibrinogen binding to platelet GP IIb/IIIa receptor. *Thromb Haemost* 1999;81:281-28



Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. B. Kehrel, Experimentelle und Klinische Hämostaseologie, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, WWU Münster für die Stellung des interessanten Themas und für ihre intensive Betreuung während der Promotion.

Herrn Prof. Dr. med G. Breithard, Herrn PD. Dr. med. S. Kerber, sowie Herrn Dr. med. H. Reineke, Medizinische Klinik und Poliklinik C, WWU Münster danke ich herzlich für die Bereitstellung von Vollblutproben von Patienten während Koronarinterventionen und Koronarangiographien.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. N. Savion, Goldschleger Institut, Israel für die Bereitstellung des „Cone and Plate“-Scheraggregometers.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. M. Herrmann, Institut für Medizinische Mikrobiologie, WWU Münster, für die Möglichkeit zur Nutzung der digitalen Bildanalyse.

Ich bedanke mich herzlichst bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik C, WWU Münster für ihre Bereitschaft zur Blutspende.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Experimentelle und Klinische Hämostaseologie, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, WWU Münster, danke ich für das freundliche Arbeitsklima und die bereitwillige Hilfe bei fachbezogenen Problemen.

Mein Dank gilt insbesondere meiner Familie, meiner Frau Sandra, Frank, Philip und Hinrich; vielen Dank für Eure allumfassende Unterstützung während der Promotionszeit.

