

### **3 METHODIK**

Der Einfluss der verschiedenen Medikationen auf die Thrombozyten wurde anhand von Degranulation und Aggregation als Marker der thrombozytären Funktion beurteilt.

In Kapitel 2.1.2 wurde bereits erläutert, wie Thrombozyten nach Stimulation degranulieren. Um das Ausmaß dieser Degranulation zu bestimmen, wurden in dieser Studie die Veränderungen der Expression bestimmter Oberflächenproteine gemessen. Diese Proteine befinden sich vor der Aktivierung in den Granula (P-Selectin und Thrombospondin in  $\alpha$ -Granula; CD 63 in lysosomalen Granula; Kapitel 2.1.1) und sind auf der Oberfläche nur in geringen Mengen nachweisbar. Nach der Aktivierung werden sie an die Oberfläche verlagert. Diese aktivierungsabhängigen Marker geben so eine Auskunft über die Reaktivität der Thrombozyten unter Clopidogrel, Atorvastatin oder der Kombination aus beiden Substanzen.

Ferner wurde die Aggregationsfähigkeit der Blutplättchen unter den unterschiedlichen Medikationen mithilfe eines Vollblut-Agglutinationstestes für Thrombozyten evaluiert..

#### **3.1 Studiendesign**

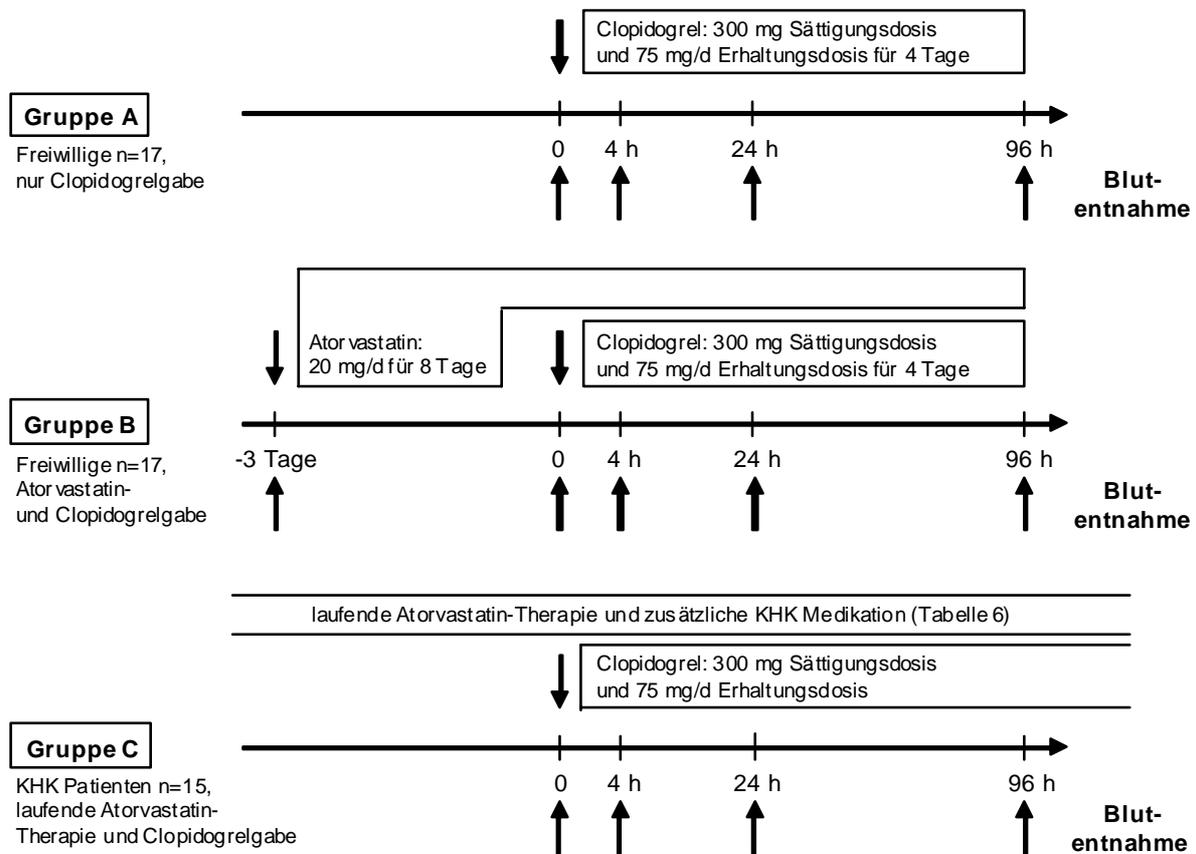
In der Studie wurden 34 gesunde Probanden sowie 15 Patienten mit stabiler KHK eingeschlossen. Ausgeschlossen wurden Patienten mit einem Herzinfarkt innerhalb der letzten drei Monate, einer kürzlichen Clopidogrel- und/oder Warfarin-Therapie sowie Patienten mit neoplastischen Erkrankungen oder schwerer Nieren- und Herzinsuffizienz.

Die gesunden Freiwilligen wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Die Probanden in Gruppe A erhielten nur eine Monotherapie mit Clopidogrel. Die Probanden in Gruppe B wurden mit Atorvastatin 20 mg/d für drei Tage vorbehandelt. Diese Behandlung wurde während der Clopidogrelgabe weitergeführt. Die KHK-Patienten wurden in der Gruppe C zusammengefasst. Sie wurden unter laufender Atorvastatintherapie in die Studie aufgenommen. Alle Studienteilnehmer erhielten 300 mg Clopidogrel als Sättigungsdosis und 75 mg/d für vier Tage als Erhaltungsdosis (Abb. 5).

Die Blutproben wurden vor der Atorvastatingabe (nur Gruppe B), vor der Clopidogrelgabe und 4, 24 bzw. 96 Stunden nach Beginn der Clopidogreltherapie entnommen.

Alle Probanden/Patienten wurden vor der Blutspende über Ziel und Ablauf der Studie aufgeklärt. Das Protokoll der Studie wurde der hiesigen Ethikkommission zur Genehmigung vorgelegt und eine Versicherung für die teilnehmenden Probanden und Patienten abgeschlossen.

Abb. 5: Studiendesign



### 3.2 In-vitro-Thrombozytenstimulation und Durchflusszytometrie

#### 3.2.1 Verwendete Lösungen

- (1) Die Thrombozyten wurden nach Isolation aus dem Citratblut in einer HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure) gepufferten Elektrolytlösung gewaschen. Diese war frei von Calcium und Magnesium, um eine artifizielle Stimulierung zu vermeiden (Tab. 1). Der pH wurde bei 7,0 eingestellt.
- (2) Zur Stimulation wurden dann wieder Calcium und Magnesium hinzugegeben, um den Aktivierungsvorgang der Thrombozyten möglichst physiologisch zu gestalten. Beide Ionen wurden in konzentrierten Lösungen ( $\text{CaCl}_2$  750 mM und  $\text{MgCl}_2$  200 mM) bereitgestellt.
- (3) Die Beendigung der Stimulation und Fixierung der Thrombozyten erfolgte in einer 0,5%igen Paraformaldehydlösung (PFA). Diese wurde durch Verdünnen einer 37% PFA-Stammlösung (SIGMA<sup>®</sup>) mit PBS (phosphate buffered saline) gewonnen.

- (4) Vor der Messung wurden die Thrombozyten in einer 3,8%igen Citrat-Waschlösung gewaschen. Diese wurde aus Natriumcitrat und PBS hergestellt.

*Tab. 1:* Zusammensetzung der HEPES gepufferten Elektrolytlösung

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	134 mM
NaHCO <sub>3</sub>	12 mM
KCl	2,9 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,36 mM
Glucose	5 mM
Rinderserum-Albumin	0,5 mg/ml
HEPES	5 mM

- (5) Zum Verdünnen der Antikörperlösungen, des PFA und zur Herstellung einer citrathaltigen Waschlösung wurde eine PBS-Lösung zehnfacher Konzentration angesetzt. Durch Verdünnen wurde daraus eine PBS-Lösung einfacher Konzentration hergestellt (Tab. 2).

*Tab. 2:* Zusammensetzung der zehnfachen und einfachen PBS-Lösung

<b>Komponente</b>	<b>Konzentration 10x</b>	<b>Konzentration 1x</b>
NaCl	670 mM	67 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	320 mM	32 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	80 mM	8 mM

### 3.2.2 Die stimulierenden Substanzen

#### 3.2.2.1 ADP

Adenosindiphosphat wurde bei der Firma SIGMA® in reiner Form erworben, auf 1 mM verdünnt und in Aliquots bei -20°C gelagert.

#### 3.2.2.2 TRAP

Das Thrombinrezeptor aktivierende Peptid (TRAP) ist ein 14 Aminosäuren langes Polypeptid. Es

entsteht nach Abspaltung des N-terminalen Endes des PAR-1 oder PAR-4 Rezeptors (siehe Kapitel 2.1.2) und kann über die gleichen Rezeptoren Thrombozytenaktivierung induzieren. Die Peptidsequenz lautet: H-Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-Asn-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Phe-OH. Rekombinant hergestelltes TRAP wurde von der Firma CALBIOCHEM® erworben und in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

### 3.2.3 Die Antikörper

Der Nachweis der aktivierungsabhängigen Oberflächenproteine (siehe Kapitel 2.1.1) erfolgte mit monoklonalen Antikörpern in austitrierten Sättigungskonzentrationen. Als unspezifische Isotypenkontrolle wurde polyklonales Maus IgG verwendet. Die Antikörper wurden bei Coulter Immunotech® erworben (Tab. 3).

Diese primär gebundenen Antikörper wurden mithilfe eines zweiten Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gekoppelten Schaf-anti-Maus-Antikörpers (F(ab)<sub>2</sub>-Fragment) im Durchflusszytometer detektiert. Dieser Antikörper wurde bei SIGMA-Aldrich® erworben.[89;90]

Tab. 3: Eigenschaften der verwendeten Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Konzentration</b>
Anti-CD 62P	CLBThromb/6	P-Selectin	n.a.
Anti-Thrombospondin	P10	Thrombospondin	2 µg/ml
Anti-CD 63	CLBGran/12	lysosomales GP 53	n.a.
Polyklonales Maus IgG	Coulter Clone	Unspezifisch	0,2 µg/ml
FITC-Schaf-anti-Maus	-	Maus IgG	20 µg/ml

### 3.2.4 Messgeräte

#### 3.2.4.1 Das MICROS® 60-OT System

Das MICROS® 60-OT System von ABX® ist ein hämatologisches Zellzählinstrument. Zwischen zwei röhrenförmigen Elektroden wird eine Spannung angelegt. Ein Hüllstrom aus isotoner Elektrolytlösung separiert die Zellen und lässt sie einzeln durch die Röhrenöffnung treten. Der Durchtritt durch die Öffnung führt zu einem messbaren Spannungssignal. Die Höhe dieses Signals ist proportional zur Größe der durchgetretenen Zellen. Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten können so aufgrund der Größe unterschieden und gezählt werden.

### 3.2.4.2 *Der FACScan<sup>®</sup>-Durchflusszytometer von Becton Dickinson*

Mithilfe der Durchflusszytometrie können in Suspension befindliche Einzelzellen auf der Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften analysiert werden. Die Zellen werden durch Antikörper und die daran gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. Fluoresceinisothiocyanat – FITC) markiert. Die Zellsuspension wird über eine Kapillare in die Messküvette des Durchflusszytometers eingeführt. Dort erreichen die Zellen einzeln den Analysepunkt, wo die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mit einem Laser erfolgt. Anhand des gestreuten und emittierten Lichtes können die Zellen erfasst, analysiert und klassifiziert werden. Die Fluoreszenzintensität jeder Zelle hängt von der Anzahl der gebundenen FITC-markierten Antikörper ab. Dabei besteht eine direkte Proportionalität der gemessenen Leuchtkraft zur Anzahl der gebundenen Antikörper und somit zur Dichte des markierten Oberflächenmoleküls. Zur Messung der präparierten Thrombozyten wurde ein FACScan<sup>®</sup> Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson (Krefeld, Deutschland) verwendet. Die FITC-markierten Zellen wurden bei einer Wellenlänge von 488 nm mit einem Argon-Laser angeregt. Die Wellenlänge des vom Fluoresceinisothiocyanat emittierten Lichtes lag bei 525 nm.

### 3.2.5 Der Versuchablauf

#### 3.2.5.1 *Die Blutentnahme und Thrombozytenisolation*

Das venöse Blut der Probanden wurde mit 9 ml Spritzen entnommen, in denen ACD (acidic citrate dextrose, SIGMA-Aldrich<sup>®</sup>) vorgelegt worden war (6 Teile Blut, 1 Teil ACD).

Anschließend wurde das Blut auf dünne Röhrchen verteilt und bei Raumtemperatur mit 1300 g für 75 Sekunden zentrifugiert. Das überstehende plättchenreiche Plasma (PRP) wurde entnommen und erneut mit ACD versetzt (1 Teil ACD und 6 Teile PRP).

Das PRP wurde anschließend bei Raumtemperatur mit 2100 g für zwei Minuten zentrifugiert. Überstehendes Plasma wurde dekantiert und das entstandene Thrombozytenpellet mit der HEPES gepufferten Elektrolytlösung wieder resuspendiert (siehe Kapitel 3.2.1).

#### 3.2.5.2 *Die Stimulation*

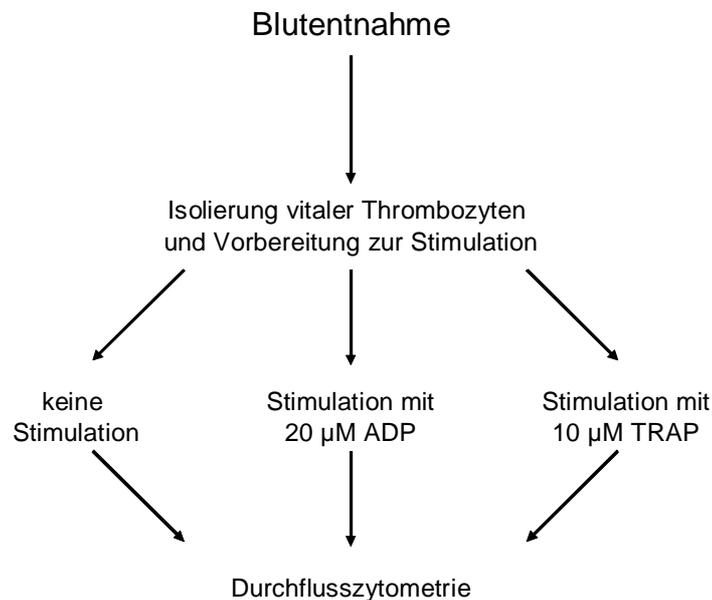
Vor der Stimulation erfolgte die Zählung der Thrombozyten mit dem in Kapitel 3.2.4.1 beschriebenen Zellzähler. Zur Stimulation wurden die Thrombozyten auf 50000/ $\mu$ l verdünnt. In einem eigens entwickelten Verdünnungsprotokoll wurden die Volumina der verdünnenden Lösung (HEPES gepufferte Elektrolytlösung), der zusätzlichen Lösungen ( $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$ ) und stimulierenden Reagenzien (ADP und TRAP) errechnet und eingetragen. Nach diesem Protokoll wurden erst der HEPES-Puffer, dann das  $\text{MgCl}_2$  (2,0 mM) und schließlich das  $\text{CaCl}_2$

(7,5 mM) kurz vor dem Stimulationszeitpunkt hinzugefügt.

Stimuliert wurde mit ADP (20  $\mu$ M) bzw. TRAP (10  $\mu$ M) für fünf Minuten. Eine dritte Probe wurde als Kontrolle unstimuliert mitgeführt (siehe Abbildung 6). Die Stimulation startete durch Zugabe der stimulierenden Reagenzien sowie durch den letzten Milliliter des HEPES-Puffers, der definiert für eine Durchmischung der Lösungen sorgte.

Nach fünf Minuten wurde die Stimulation durch Zugabe der PFA-Lösung (0,5%) gestoppt und die Thrombozyten durch Inkubation in dieser Lösung für zehn Minuten fixiert.

Abb. 6: Ablauf der Messung



### 3.2.5.3 Antikörperinkubation und Messvorbereitung

Die Lösung mit den fixierten Thrombozyten wurde mit 10%igem Kaninchenserum versetzt, um die unspezifischen Bindungen auf der Thrombozytenoberfläche abzusättigen. Es folgte eine weitere Zentrifugation mit 1500 g für fünf Minuten. Das entstandene Thrombozytenpellet wurde mit Waschlösung resuspendiert und gewaschen. Mithilfe des Zellzählers wurden erneut die Thrombozyten gezählt und mit PBS-Lösung auf 50000/ $\mu$ l verdünnt. Aus der erhaltenen Plättchensuspension wurden 100  $\mu$ l entnommen (5 Millionen Thrombozyten/Probe) und mit jeweils 25  $\mu$ l der Antikörperlösungen (siehe Kapitel 3.2.3) bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert. Pro Antikörper erfolgte ein Zweifachansatz. Anschließend wurde jeder Ansatz lichtgeschützt für 30 min mit 50  $\mu$ l der Lösung aus FITC konjugierten Schaf-anti-Maus-Antikörpern inkubiert. Der 9fache Überschuss an Sekundärantikörpern führte zur Fluoreszenzmarkierung der gebundenen Primärantikörper. Im nächsten Schritt wurden die Proben durch Verdünnung und Zentrifugation (1000 g, 5 Minuten) gewaschen und anschließend

zur durchflusszytometrischen Messung mit je 1 ml FACS-Flow<sup>®</sup>-Lösung (Becton Dickinson) resuspendiert.[54;71;86;89;90]

#### 3.2.5.4 Messung und Auswertung

Zur Eichung des Durchflusszytometers wurden Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-markierte (grün) und Phycoerythrin (PE)-markierte (rot-orange) sowie unmarkierte (farblos) Calibrite Beads<sup>®</sup> (Becton Dickinson) verwendet, die in ihrer Streulichteigenschaft und in ihrer Färbung natürlichen fluoreszenzmarkierten Blutzellen entsprechen. Durch Einstellung auf maximale Diskriminierung von ungefärbten und gefärbten Beads konnte eine optimale Justierung des Durchflusszytometers erfolgen und so eine optimale Diskriminierung der Fluoreszenzsignale während der Messung gewährleistet werden.

Pro Antikörper erfolgten zwei Messungen, wobei pro Ansatz jeweils 10.000 Thrombozyten analysiert wurden. Die Thrombozyten besitzen aufgrund ihrer eigenen chemischen Zusammensetzung eine zelluläre Autoimmunfluoreszenz und emittieren bei Anregung durch den Laser ein eigenes Fluoreszenzmuster. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine mit polyklonalem Maus-IgG inkubierte Probe als unspezifische Kontrolle untersucht. In der Auswertung mit der CellQuest<sup>®</sup>-Software (Becton Dickinson) wurden die spezifischen Fluoreszenzsignale der markierten Oberflächenproteine und die unspezifischen Signale der Maus-IgG-Kontrolle aufeinander projiziert und anschließend digital voneinander subtrahiert. Die Subtraktionskurve entspricht der spezifischen Immunfluoreszenz aller markierten Thrombozyten. Sie stellt die statistische Verteilung der Dichte der entsprechenden Oberflächenproteine auf den Thrombozyten dar. Der Median der statistischen Verteilung der Immunfluoreszenz wurde ermittelt und in Arbeitseinheiten (AU) angegeben. Die Fläche unter der Subtraktionskurve gibt außerdem die Anzahl der als positiv markierten Thrombozyten an. Bezogen auf die untersuchten 10000 Thrombozyten wird so der Anteil der positiv markierten Thrombozyten ermittelt. Auf diese Weise werden für jeden Antikörper zwei Werte generiert: der Median der Immunfluoreszenzen (in AU) und der Anteil der positiven Thrombozyten (in Prozent). Die Messergebnisse aus den Zweifachansätzen für jeden Antikörper wurden in einem arithmetischen Mittel zusammengefasst.[24;25;54;60;71;86;89;90]

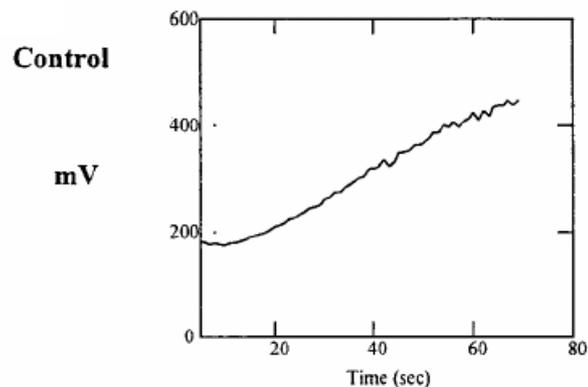
### 3.3 Die Vollblutagglutination im Ultegra - TRAP - RPFA<sup>™</sup>

Das Rapid Platelet Function Assay (RPFA<sup>™</sup>) ist ein Vollblut-Thrombozytenassay zur Bestimmung der Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten. Dieser Assay wurde entwickelt, um die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten unter einer antiaggregatorischen Therapie mit

einem GP IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten wie Abciximab zu beurteilen.

In einer kleinen Kassette wird Citratblut mit iso-TRAP (4  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. Die Aktivierung erfolgt über die PAR-1 und PAR-4 Rezeptoren (siehe Kapitel 2.1.2) Die aktivierten Thrombozyten agglutinieren an mit Fibrinogen bedeckten Polystyren-Kügelchen. Das daraus entstehende Aggregat bindet weitere lichtundurchlässige Blutbestandteile. Der Lichtweg, in dem sich die Kassette befindet, wird dadurch freigegeben. Eine Photodiode misst die Zunahme der Transmission. Der integrierte Algorithmus errechnet aus der Geschwindigkeit der Zunahme und der absoluten Transmission das Ausmaß der Thrombozytenaggregation. Dies wird in der Einheit „Platelet Aggregation Units“ (PAU) angegeben (Abb. 7).[52;77;81]

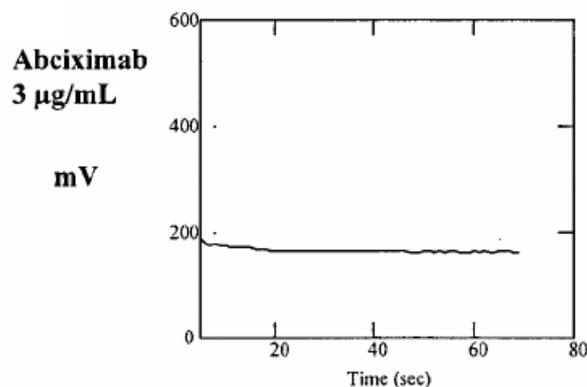
Abb. 7: Transmissionszunahme in Citratblut [77]



Durch Ausbleiben bzw. Verzögerung der Lichttransmissionszunahme kann so eine Aussage über die Wirksamkeit der antiaggregatorischen Therapie mit einem Anti-Integrin z.B. Abciximab getroffen werden (Abb. 8).[52;77;81]

Da Clopidogrel auch die Aktivierung des GP IIb/IIIa-Rezeptors hemmt, müsste auch hier ein Effekt der antithrombozytären Therapie im RPFA messbar sein.

Abb. 8: Ausbleibende Transmissionszunahme durch Abciximab in Citratblut[77]



### **3.4 Statistik**

Die Daten dieser Studie wurden mit SPSS<sup>®</sup> (Statistical Analysis Program for Windows<sup>®</sup>, Vers. 11.0.1) analysiert. Die Daten wurden mittels des Kolmogoroff Smirnov Testes auf Normalverteilung geprüft. Entsprechend wurden die Daten als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

Das Hauptbeobachtungskriterium war der Vergleich der Marker der thrombozytären Aktivierung (Degranulation und Aggregation) zwischen den Probanden mit und ohne Atorvastatin vor Medikamenteneinnahme und 96 Stunden nach Clopidogreleinnahme. Dieser Vergleich wurde mithilfe des t-Testes für unabhängige Stichproben durchgeführt. Der Fisher Exact Test wurde genutzt, um binäre Variablen zwischen den gesunden Probanden zu vergleichen.

Nebenbeobachtungskriterium war der Zeitverlauf der Thrombozyteninhibition in jeder der drei Gruppen. Die Unterschiede der Immunfluoreszenzen und der Prozentwerte innerhalb einer Gruppe über den zeitlichen Verlauf wurde mithilfe des MANOVA getestet, mit einem Faktor für die Subjekte und getrennt für alle drei Stimulierungen (nicht stimuliert, ADP und TRAP). Wenn durch diesen Test Differenzen der Immunfluoreszenzen und Prozentwert während des Gesamtzeitverlaufs aufgedeckt wurden, erfolgten paarweise Vergleiche zwischen den Zeitpunkten mit dem t-Test für abhängige Stichproben und anschließender Bonferroni-Korrektur. In Gruppe A und C wurden die Zeitpunkte 4, 24 und 96 Stunden mit dem Zeitpunkt vor Clopidogrelgabe verglichen (Korrekturfaktor 3). In Gruppe B wurden 4, 24, 96 Stunden und vor Atorvastatingabe mit dem Zeitpunkt vor Clopidogrelgabe verglichen (Korrekturfaktor 4).

Die Daten des Ultegra-RPFA<sup>™</sup> wurden innerhalb der Gruppen vor und nach der Medikamentgabe mit dem t-Test für abhängige Stichproben verglichen. P-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

### **3.5 Diskussion der methodischen Einschränkung**

Die hier verwendete In-vitro-Stimulierung von Thrombozyten ist zwar geeignet, die direkte Wirkung von Thrombozyten inhibierenden Substanzen zu beobachten, jedoch bildet sie keine Korrelation zu tatsächlich an der verletzten Gefäßwand ablaufenden Prozessen. In vivo hat neben den Thrombozyten auch die plasmatische Gerinnung ihren Anteil an der Thrombenentstehung.

Das ebenfalls zum Einsatz gekommene RPFA<sup>™</sup>-TRAP-System wurde konstruiert, um den Grad der Thrombozyteninhibition nach Gabe von GP IIb/IIIa-Inhibitoren zu bestimmen. Eine Clopidogreltherapie wurde mit diesem System noch nicht überwacht. Da Clopidogrel ein P2Y<sub>12</sub>-ADP-Rezeptorantagonist auf den Thrombozyten ist, wäre ein spezifischer Aktivator dieses Rezeptors nützlicher.