

**Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der
Kreislaufkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. P. C. Weber**

**Initiierung der Thrombusbildung durch humane
atherosklerotische Plaques: Kinetik und Mechanismen**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Maria Isabell Bernlochner**

**aus
München**

2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

1.Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Wolfgang Siess
2.Berichterstatter:	Prof. Dr. Martin Dichgans
Mitberichterstatter:	Priv.Doz. Dr.Johannes Rieber Priv.Doz. Dr. Robert Blum
Mitbetreuung durch den habilitierten Mitarbeiter:	apl.Prof. Dr. med. A. Reininger
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M.Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	23.04.2009

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Einheiten	X
1 Einleitung	1
2 Stand der Forschung	3
2.1 Atherosklerotische Plaques: Entstehung und Zusammensetzung	3
2.2 Arterielle Thrombusbildung nach Plaqueruptur und –erosion	5
2.2.1 Mechanismen der Plaqueruptur und Exposition thrombogener Plaque-Substanzen	5
2.2.2 Tissue-faktor als Initiator der Atherothrombose	8
2.2.2.1 Struktur und Physiologie von TF	8
2.2.2.2 Plaque-TF	9
2.2.2.3 Intravaskulärer TF und Mikropartikel.....	11
2.2.2.4 TF-modulierte Aktivierung der Gerinnungskaskade und prokoagulatorische Thrombozyten-Aktivität	12
2.2.3 F XII-Aktivierung und intrinsisches Gerinnungssystem.....	18
2.2.4 Kollagen-induzierte Atherothrombose	19
2.2.4.1 Struktur von Kollagen und GPVI.....	19
2.2.4.2 Heterogene Kollagene im Plaque.....	20
2.2.4.3 Thrombozytenaktivierung vermittelt durch Kollagen und andere Agonisten.....	21
3 Fragestellung und Zielsetzung	25
4 Material und Methode	27
4.1 Material	27
4.1.1 Verwendete Chemikalien, Enzyme und Hemmsubstanzen	27
4.1.2 Puffer und Lösungen	29
4.1.3 Geräte und Software.....	30
4.2 Methode	31
4.2.1 Gewinnung und Verarbeitung des Plaquematerials.....	31
4.2.2 Blutentnahme und Antikoagulation.....	32
4.2.3 Gewinnung von plättchenreichem und plättchenarmen Plasma.....	33
4.2.4 Recalcifizierung von Citrat-PPP, -PRP und -Blut	34
4.2.5 Hemmung der Kontaktaktivierung mittels Corn Trypsin Inhibitor	34
4.2.6 Stimulation mit Plaque- Kollagen- und TF im PPP, PRP und Blut	34
4.2.6.1 Messung von Aggregation und Gerinnungszeit des PRP im Aggregometer	34

4.2.6.2	Bestimmung der Thrombinbildung im Thrombogram.....	35
4.2.6.3	Messung der Fibrinbildung mittels Thrombelastographie	36
4.2.6.4	Hemmung von <i>Tissue factor</i> und kollagenen Plaque-Strukturen.....	37
4.2.7	Plaque-induzierte Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen.....	39
4.2.7.1	Beschichtung von Glasdeckplättchen mit Plaque-Homogenaten, fibrillärem Kollagen und TF	39
4.2.7.2	Hemmung des Plaque-TF und der Kollagen-GPVI-Interaktion.....	39
4.2.7.3	Flusskammern	40
4.2.7.4	Messungen mit heparinisiertem oder recalcifiziertem Citrat-Blut.....	41
4.2.7.5	Echtzeit-Darstellung der Thrombusbildung mittels Videomikroskopie.....	41
4.2.7.6	Bildanalyse und Auswertung	42
4.2.8	Nachweis von TF im Plaque Homogenat mittels Immunfluoreszenz.....	43
4.2.9	Nachweis von TF in Plaqueschnitten mittels Immunhistochemie	43
4.2.10	Statistische Auswertung	44
5	Ergebnisse	45
5.1	Rolle der Plaque-, TF- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation und Gerinnung: Messungen im plättchenreichen Plasma im Aggregometer	45
5.1.1	Rolle der CaCl ₂ - und MgCl ₂ - Zugabe	45
5.1.2	Einfluss der Blockade des Faktors XII des Gerinnungssystems.....	49
5.1.3	Einfluss der Thrombin-Hemmung mittels Hirudin.....	51
5.1.4	Einfluss der TF- Blockade im Plaque	52
5.1.5	Rolle von kollagenen Strukturen im Plaque und GPVI-Aktivierung.....	54
5.1.5.1	GPVI Hemmung.....	54
5.1.5.2	Vorbehandlung der Plaques mit Kollagenase und Kollagen I- und III-Antikörpern	57
5.1.6	Kombinierte Hemmung der Kollagen- und TF-Komponente in atherosklerotischen Plaques	60
5.1.6.1	Vorbehandlung der Plaques mit Kollagenase und TF-AK.....	60
5.1.6.2	Hemmung von Kollagen I und III und Thrombin.....	61
5.1.6.3	Hemmung von GPVI und Thrombin	62
5.2	TF- Kollagen- und Plaque-induzierte Thrombinbildung: Messungen mit der Thrombogram Methode im PRP und PFP	64
5.2.1	Kinetik der Thrombinbildung im PRP und PFP	64
5.2.2	Einfluss verschiedener Thrombozytenkonzentrationen	67
5.2.3	Einfluss von CTI.....	70
5.2.4	Rolle von TF und kollagenen Strukturen im Plaque.....	71
5.3	Rolle der Plaque-, TF- und Kollagen-induzierten Fibrinbildung: Messungen mittels Thrombelastographie.....	80
5.3.1	Plaque-, TF- und Kollagen-induzierte Fibrinbildung im PPP, PRP und Blut.....	80
5.3.2	Rolle von TF im Plaque	83
5.3.3	Rolle von kollagenen Strukturen und GPVI-Aktivierung.....	85
5.3.4	Versuche im heparinisierten Blut.....	86

5.4	Analyse von Plaque-induzierter Thrombozytenadhäsion, -aggregation und Fibrinbildung in fließendem Blut	89
5.4.1	Messungen im heparinisiertem Blut: Rolle von GPVI und TF für die thrombozytäre Adhäsion und Aggregation	89
5.4.2	Messungen im recalcifizierten Citratblut.....	92
5.4.2.1	Optimierung der CaCl ₂ Konzentration für die TF-abhängige Gerinnungsaktivierung unter arteriellen Flussbedingungen.....	92
5.4.2.2	Plaque- induzierte Aggregation und Fibrinbildung	93
5.4.2.3	Kollagen- induzierte Aggregation und Fibrinbildung	96
5.4.2.4	TF- induzierte Aggregation und Fibrinbildung	98
5.4.2.5	Einfluss der Faktor XII Blockade auf die Plaque- und Kollagen-induzierte Aggregation und Gerinnung	99
5.4.2.6	Einfluss von GPVI-AK auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation und Fibrinbildung.....	100
5.4.2.7	Einfluss von Plaque-TF auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation und Fibrinbildung.....	103
5.5	Lokalisation von TF im Plaque.....	107
5.5.1	Darstellung von TF im Plaque Homogenat	107
5.5.2	TF in Plaque Schnitten	108
6	Diskussion	110
6.1	Etablierung eines <i>in vitro</i> Modells zur Untersuchung der Plaque-induzierten Aktivierung von Thrombozyten und Gerinnung.....	110
6.2	Mechanismus der Plaque-induzierten Thrombusbildung unter statischen Bedingungen.....	112
6.2.1	Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation	112
6.2.2	Plaque-induzierte Thrombin- und Fibrinbildung	114
6.3	Mechanismus der Plaque-induzierten Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen: Rolle von kollagenen Plaque Strukturen und TF.....	118
6.4	Beitrag des F XII des intrinsischen Gerinnungssystems zur Thrombogenität von atherosklerotischen Plaques und fibrillärem Kollagen	122
6.5	Lokalisation von TF in atherosklerotischen Plaques	124
6.6	Mögliche klinische Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick in die Zukunft.....	125
7	Zusammenfassung.....	128
	Anhang	131
	Literaturverzeichnis	133
	Danksagung	149
	Lebenslauf.....	151

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einfluss von CTI auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation und Gerinnung in An- und Abwesenheit von divalenten Kationen.	49
Tabelle 2: Einfluss von CTI auf die TF induzierte Aggregation und Gerinnungszeit nach CaCl_2 und MgCl_2 Zugabe.	49
Tabelle 3: Einfluss von CTI auf die Kollagen- induzierte Aggregation und Gerinnungszeit mit und ohne CaCl_2 und MgCl_2 Zugabe.	50
Tabelle 4: Einfluss der Thrombin-Hemmung mittels Hirudin auf die Plaque-, Kollagen-, und TF- induzierte Aggregation und Gerinnung in Anwesenheit von CaCl_2 und MgCl_2 ohne CTI.	51
Tabelle 5: Einfluss von TF-AK auf die Plaque-induzierte Aggregation und Gerinnungszeit in Anwesenheit von divalenten Kationen ohne CTI.	53
Tabelle 6: Einfluss von TF-AK auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation und Gerinnung in Anwesenheit von CTI und divalenten Kationen.	54
Tabelle 7: Einfluss von GPVI Hemmung auf die thrombozytäre Aggregation und Gerinnungszeit in Anwesenheit von divalenten Kationen ohne CTI.	55
Tabelle 8: Einfluss von GPVI-AK auf die Plaque-induzierte Aggregation und Gerinnung in Anwesenheit von CTI.	56
Tabelle 9: Auswirkung der Vorbehandlung der Plaques mit Kollagenase auf die Plaque-induzierte Aggregation und Gerinnungszeit in Anwesenheit von CaCl_2 und MgCl_2 ohne CTI.	57
Tabelle 10: Auswirkungen der Vorbehandlung der Plaques mit Kollagenase auf die Plaque-induzierte Aggregation und Gerinnungszeit in Anwesenheit von CaCl_2 / MgCl_2 und CTI.	58
Tabelle 11: Auswirkungen der Vorbehandlung der Plaques mit Kollagen I- und III Antikörpern auf die Plaque-induzierte Aggregation in Anwesenheit von CaCl_2 / MgCl_2 und CTI.	59
Tabelle 12: Einfluss der Hemmung von GPVI und Thrombin auf die thrombozytäre Aggregation und Gerinnungszeit in Anwesenheit von CaCl_2 / MgCl_2 und CTI.	63
Tabelle 13: Kein signifikanter Einfluss der Plaque-TF-Hemmung auf die Aggregatbildungszeit.	103
Tabelle 14: Kein Einfluss der TF-Hemmung auf die Fläche der Aggregatbildung im Verhältnis zur Plaque Fläche.	105

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Plaque-Ruptur mit konsekutiver Aktivierung von Thrombozyten und Gerinnungssystem.	6
Abbildung 2: Kristalline Struktur des membrangebundenen TF-FVIIa-Komplexes abgebildet in zwei Orientierungen.....	8
Abbildung 3: Rolle von TF bei der Ruptur eines atherosklerotischen Plaques.	13
Abbildung 4: Die Koagulationskaskade (vereinfacht).....	14
Abbildung 5: Proteine der Thrombozytenoberfläche, die die Bindung von Koagulationsfaktoren vermitteln.....	16
Abbildung 6: Initiations- und Propagationsphase der Blutgerinnung in Abhängigkeit einer prokoagulatorischen Thrombozytenfunktion.	17
Abbildung 7: Aktivierung der Thrombozyten durch adhäsive Proteine und lösliche Agonisten.	24
Abbildung 8: Untersuchung der Mechanismen der arteriellen Thrombusbildung durch die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques.	26
Abbildung 9: Photographie eines Plaque-Stücks nach Entnahme aus A. carotis interna durch TEA.	31
Abbildung 10: Aggregationskurven. Auswirkungen der Zugabe der divalenten Kationen (CaCl_2 und MgCl_2) zum gerührten PRP.	46
Abbildung 11: Einfluss der Zugabe der divalenten Kationen auf die Plaque- und Kollagen-induzierte Aggregation und Gerinnung im PRP.....	47
Abbildung 12: Einfluss der Zugabe der divalenten Kationen auf die TF-induzierte Aggregation im PRP.....	48
Abbildung 13: Einfluss der Blockade des FXII mittels CTI auf die Plaque-, TF-, und Kollagen-induzierte Gerinnungszeit im Aggregometer nach Zugabe von CaCl_2 und MgCl_2	50
Abbildung 14: Einfluss von TF-AK auf die Plaque-induzierte Gerinnungszeit in Anwesenheit von divalenten Kationen.	53
Abbildung 15: Einfluss von GPVI Hemmung auf die thrombozytäre Aggregation und Gerinnungszeit in Anwesenheit von divalenten Kationen ohne CTI.	56
Abbildung 16: Plaque Vorbehandlung mit Kollagenase oder Kontrollpuffer.....	58
Abbildung 17: Vorbehandlung der Plaques mit Kollagen I- und III-Antikörpern in Anwesenheit von CaCl_2 , MgCl_2 und CTI.	59
Abbildung 18: Auswirkung der Vorbehandlung der Plaques mit Kollagenase und TF-AK auf Plaque-induzierte Aggregation und Gerinnungszeit in Anwesenheit von CaCl_2 / MgCl_2 und CTI.....	60
Abbildung 19: Auswirkungen der kombinierten Hemmung von Kollagen I und III im Plaque-Homogenat und von Thrombin auf die Plaque-induzierte Aggregation und Gerinnung in Anwesenheit von CTI.	62
Abbildung 20: Plaque-induzierte Thrombinbildung im PRP und PFP.....	64
Abbildung 21: Vergleich der Plaque-, TF- und Kollagen-induzierten Thrombinbildung im PRP und PPP.....	66
Abbildung 22: Vergleich der Plaque-, TF- und Kollagen-induzierten Thrombinbildung im PRP bei verschiedenen Thrombozytenkonzentrationen.	69
Abbildung 23: Einfluss der Hemmung der intrinsischen Gerinnung durch Blockade des F XII mittels CTI auf die Kollagen- und Plaque-induzierte Thrombinbildung.....	71

Abbildung 24: Einfluss von TF-AK und Kollagenase auf die Plaque-induzierte Thrombinbildung im PRP.	72
Abbildung 25: Einfluss von TF-AK und Kollagenase auf die Plaque-induzierte Thrombinbildung im PRP.	73
Abbildung 26: Einfluss von TF und kollagenen Strukturen auf die Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit der Thrombinbildung (<i>ttpeak</i>) nach Plaque-Zugabe zum im PRP.	74
Abbildung 27: Einfluss von TF und kollagenen Strukturen auf das endogene Thrombin Potential (etp) der Plaque-induzierten Thrombinbildung im PRP.	75
Abbildung 28: Einfluss von TF und kollagenen Strukturen auf die maximal gebildete Menge Thrombin (<i>peak thrombin</i>) der Plaque-induzierten Thrombinbildung im PRP.	76
Abbildung 29: Einfluss von TF und kollagenen Strukturen im Plaque auf die Thrombinbildung im PFP.	78
Abbildung 30: Einfluss von TF und kollagenen Strukturen auf die Plaque-induzierte Thrombinbildung im PFP.	79
Abbildung 31: Vergleich der Plaque- und TF- und Kollagen-induzierten Fibrinbildung im PPP, PRP und Blut.	82
Abbildung 32: Hemmung der Plaque-induzierten Fibrinbildung durch TF-AK in PPP, PRP und Blut.	84
Abbildung 33: Einfluss der GPVI- Blockade und des enzymatischen Kollagen-Abbaus auf die Plaque-induzierte Fibrinbildung.	86
Abbildung 34: Plaque- TF- und Kollagen- induzierte Fibrinbildung in LMWH-Blut.	87
Abbildung 35: Einfluss der Hemmung des Plaque-TF mittels TF-AK auf die Plaque-induzierte Fibrinbildung in LMWH-Blut.	88
Abbildung 36: Einfluss von rekombinantem GPVI-Fc auf die Plaque-induzierte Adhäsion und Aggregation unter arteriellem Blutfluss zum Zeitpunkt t= 3 min nach Flussbeginn. ...	90
Abbildung 37: Einfluss von rekombinantem GPVI-Fc auf die Plaque-induzierte Adhäsion und Aggregation unter arteriellem Blutfluss zum Zeitpunkt t= 5 min nach Flussbeginn. ...	91
Abbildung 38: Kein Einfluss von TF-AK auf die Plaque-induzierte Adhäsion und Aggregation unter arteriellem Blutfluss.	92
Abbildung 39: Thrombelastographische Messungen zur Bestimmung der optimalen CaCl ₂ Konzentration die Gerinnungsaktivierung durch TF im Citratblut.	93
Abbildung 40: Plaque-induzierte Tz-Adhäsion, -Aggregation und Fibrinbildung unter arteriellen Strömungsbedingungen.	96
Abbildung 41: Kollagen-induzierte Tz-Adhäsion, -Aggregation und Fibrinbildung unter arteriellen Strömungsbedingungen.	97
Abbildung 42: TF-induzierte Aggregation und Fibrinbildung unter arteriellen Strömungsbedingungen.	99
Abbildung 43: Einfluss von GPVI-AK auf die Plaque-induzierte Adhäsion und Aggregation unter arteriellem Blutfluss.	101
Abbildung 44: Einfluss von GPVI-AK auf die Plaque-induzierte Adhäsion und Aggregation unter	102
Abbildung 45: Einfluss von GPVI-AK auf die Plaque-induzierte Adhäsion und Aggregation unter	104
Abbildung 46: Signifikante Verzögerung der Fibrinbildungszeit durch Plaque-TF-Blockade.	105
Abbildung 47: Plaque-induzierte Fibrinbildung nach Vorbehandlung mit Kontroll-rabbit IgG und TF-AK.	106
Abbildung 48: Identifizierung TF-positiver Strukturen im atherosklerotischen Plaque Homogenat mittels Immunfluoreszenz.	108

Abbildung 49: Immunhistochemische Markierung von TF in diversen charakteristischen Regionen eines atherosklerotischen Carotis-Plaques.	109
Abbildung 50: 2-Phasen Modell der Atherothrombose.....	129

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
<i>blood borne</i> TF	intravaskulärer TF, systemisch im Blut gebildeter TF
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
Citrat-Blut	Mit 3,8%-iger Natriumcitrat-Lösung antikoaguliertes Vollblut im Verhältnis 1:10
CT	<i>clotting time</i> , Gerinnungszeit
CTI	<i>Corn trypsin inhibitor</i>
etp	endogenes Thrombin Potential
FV/FVa	Gerinnungsfaktor V, aktivierter Gerinnungsfaktor V
FVII/FVIIa	Gerinnungsfaktor VII, aktivierter Gerinnungsfaktor VII
FVIII/FVIIIa	Gerinnungsfaktor VIII, aktivierter Gerinnungsfaktor VIII
FIX/FIXa	Gerinnungsfaktor IX, aktivierter Gerinnungsfaktor IX
FXI/FXIa	Gerinnungsfaktor XI, aktivierter Gerinnungsfaktor XI
FXII/FXIIa	Gerinnungsfaktor XII, aktivierter Gerinnungsfaktor XII
FXIII	Gerinnungsfaktor XIII
Fc-Kontrollprotein	Fc-Protein als Kontrolle für das GPVI-Fc
GP	Glykoprotein
GPVI-Fc	rekombinantes dimeres GPVI-Fc Fusionsprotein
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfa
HMWK	<i>high molecular weight kininogen</i>
IgG	Immunglobulin G
intravaskulärer TF	<i>blood borne</i> TF, systemisch im Blut gebildeter TF
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LMWH	<i>Low molecular weight heparin</i> , niedermolekulares Heparin
LMWH-Blut	Mit niedermolekularem Heparin antikoaguliertes Vollblut (0,4 Einheiten pro ml)
LPA	<i>lipoprotein acid</i> , Lipoproteinsäure

M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MW	Mittelwert
MMPs	Matrix-Metallo-Proteasen
NGS	<i>Normal goat serum</i>
NF-kappa-B	<i>nuclear factor-kappa-B</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PC	Phosphatidylcholin
Plaque-TF	Der sich im atherosklerotischen Plaque befindliche TF
PDGF	Platelet derived growth factor
PFP	Plättchenfreies Plasma
PPP	Plättchenarmes Plasma
PRP	Plättchenreiches Plasma
PL	Phospholipide
PKC	Proteinkinase C
PS	Phosphatidylserin
rabbit IgG (rIgG)	Immunglobulin G aus Kaninchen gegen Mensch
rat IgG	Immunglobulin G aus Ratte gegen Mensch
RICM	Reflektionsinterferenzkontrastmikroskopie
SA	Standardabweichung
SSRE's	<i>shear stress responsive elements</i>
TEA	Thrombendarterektomie
TES	N-Tris[Hydroxymethyl]-methyl-2-aminoethan-sulfon Säure
TESCA	TES + CaCl ₂
TF	<i>Tissue factor</i> (Gewebsthromboplastin)
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
<i>tpeak</i>	<i>time to peak</i>
Tz-Aktivierung	Thrombozyten-Aktivierung
vWF	von Willebrand-Faktor

Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunde
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar (= mol/l)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mol	Mol
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
% (v/v)	Volumenprozent (Volumen pro Volumen)
% (w/v)	Gewichtsprozent (Gewicht pro Volumen)
rpm	Umdrehungen pro Minute („ <i>revolutions per minute</i> “)
sec.	Sekunden (<i>seconds</i>)
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen, darunter vor allem ischämische Herzkrankheiten, zählen zu den häufigsten Erkrankungen in Ländern mit höherem Lebensstandard. In Deutschland stehen die Herz-Kreislauf-Krankheiten mit 43,7 % nach wie vor an erster Stelle der Todesursachen, gefolgt von den Krebskrankheiten mit 25,7 % (Statistisches Bundesamt, Gesundheitswesen 2006). Aufgrund der zunehmenden Verbreitung von Adipositas und Diabetes mellitus in der westlichen Welt und wegen der Zunahme kardiovaskulärer Erkrankungen auch in osteuropäischen Ländern und sogar in Entwicklungsländern könnten kardiovaskuläre Erkrankungen in naher Zukunft auch weltweit die häufigste Todesursache sein (Murray and Lopez, 1997).

Die Atherosklerose betrifft die großen und mittelgroßen Arterien. Klinisch von Bedeutung sind v.a. Gefäßwandläsionen der Aorta, der Koronararterien, der Carotidarterien, der größeren gehirnversorgenden Gefäße, sowie der peripheren Arterien in den Beinen. Ein atherosklerotischer Plaque entsteht meistens unbemerkt über Jahre oder Jahrzehnte unter dem Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren im Rahmen entzündlich-proliferativer Prozesse durch fokale und asymmetrische Verdickungen und Verhärtungen (griech. *skleros*: hart) der innersten Wand einer Arterie (Intima). Die Risikofaktoren sind insbesondere Hyperlipidämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus und entzündliche Vorgänge an der Gefäßwand (Ross, 1999). Aber auch Alter, Geschlecht, genetische Disposition, Stress und Bewegungsmangel tragen zur Entwicklung atherosklerotischer Läsionen bei.

Atherosklerotische Plaques zeigen trotz eines gemeinsamen Entstehungsmechanismus eine große Variabilität in Aufbau und Zusammensetzung. Nicht die Größe eines atherosklerotischen Plaques, sondern die Plaque-Zusammensetzung ist von entscheidender Bedeutung für dessen Risiko akute, oft nicht vorhersehbare, lebensbedrohliche thrombembolische Komplikationen hervorzurufen. Durch die plötzliche Ruptur oder Erosion eines atherosklerotischen Plaques werden die im Plaque eingelagerten thrombogenen Substanzen dem fließenden Blut exponiert und es kommt zur arteriellen Thrombusbildung. Die Konsequenzen sind in den meisten Fällen akute, oftmals tödlich endende klinische Ereignisse, wie Myokardinfarkt, Hirninfarkt und periphere arterielle Thrombose.

Tissue factor (TF) gilt als potentester Initiator der Blutgerinnung. Die gängige Meinung macht im Plaque eingelagerten TF im Wesentlichen für die Plaque-induzierte Thrombusbildung verantwortlich (Badimon et al., 1999; Mackman, 2004). Nach neuesten Erkenntnissen trägt auch ein im Blut „geborener“ TF (*blood borne TF*) zur arteriellen Thrombusbildung bei (Furie

and Furie, 2006a). Blutplättchen werden entsprechend diesen Modellen erst sekundär, nach vorausgehender Stimulation der Koagulationskaskade, durch Thrombin aktiviert.

Vor einiger Zeit wurde allerdings gezeigt, dass nach Plaqueruptur die direkte Thrombozytenaktivierung durch heterogene kollagene Plaque-Strukturen via GPVI-Rezeptor Aktivierung ebenfalls von sehr großer Bedeutung für die arterielle Thrombusbildung ist (Penz et al., 2005).

Steht in der initialen Phase, unmittelbar nach Ruptur eines humanen atherosklerotischen Plaques, die Aktivierung der Blutplättchen oder die Aktivierung der Gerinnungskaskade im Vordergrund?

In der vorliegenden Arbeit werden neue Erkenntnisse über mögliche Mechanismen der arteriellen Thrombusbildung in der initialen Phase nach Plaque-Ruptur beschrieben.

2 Stand der Forschung

2.1 Atherosklerotische Plaques: Entstehung und Zusammensetzung

Atherosklerose ist eine progrediente Erkrankung der Arterienwand im Sinne einer chronischen Entzündung und ist charakterisiert durch die Einlagerung von Lipiden, sowie zellulären und fibrösen Elementen in die Intima. Das entscheidende Ereignis, das zur Entwicklung der Atherosklerose führt, ist eine endotheliale Dysfunktion (Ross, 1999). Das Endothel als autokrines und parakrines Organ spielt eine herausragende Rolle für die Aufrechterhaltung von physiologischen rheologischen Konditionen. Die endotheliale Dysfunktion ist vor allem charakterisiert durch die verminderte Produktion vasodilatierender Substanzen, v.a. NO, und durch die vermehrte Sekretion von Vasokonstriktoren, z.B. Endothelin-1, mit der Folge der Minderung der endothel-abhängigen Vasodilatation (Viles-Gonzalez et al., 2004a). Dysfunktionale Endothelzellen produzieren proinflammatorischer Zytokine und Adhäsionsmoleküle, z.B. *intercellular adhesion molecule* (ICAM), *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1) und E-Selektin (Corti et al., 2003). Sie ermöglichen Entzündungszellen, vor allem Monozyten und T-Lymphozyten, und adulten Stammzellen das „homing“ und die Infiltration in die subendotheliale Matrix (Hirschi et al., 2008; Luscher et al., 1993).

Die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen und die Aktivierung von Endothelzellen findet vor allem an Stellen hämodynamischer Belastung (Gefäßgabelungen und -biegungen) statt (Nakashima et al., 1998) und ist ähnlich in Bein-, Koronar-, Carotis- und Hirnarterien. Physiologische Scherkräfte, die bei hohen arteriellen Strömungsgeschwindigkeiten auf das Endothel wirken, stimulieren in gesunden Gefäßen biochemische Reaktionen (v.a. Erhöhung der NO Sekretion), die der endothelialen Dysfunktion entgegenwirken. Störungen des physiologischen Scher-Stresses, insbesondere oszillatorische und niedrige Wandscherraten begünstigen in spezifischen arteriellen Regionen (z.B. A. carotis communis Gabelung, Koronararterienaufzweigungen) die Entstehung atherosklerotischer Plaques. (Chatzizisis et al., 2007). Sie führen am Endothel zu einer erhöhten Permeabilität für Makromoleküle (z.B. LDL) (Gimbrone, 1999). Änderungen des Blutflusses, z.B. durch Vasokonstriktion, können auch die endotheliale Genexpression modulieren (Malek et al., 1999) und beeinflussen über *shear stress responsive elements* (SSRE's) sogar die TF-Gen Expression der Endothelzellen (Viles-Gonzalez et al., 2004b).

Der Funktionsverlust des Endothels begünstigt eine vermehrte Infiltration und Retention von LDL in der arteriellen Intima (Skalen et al., 2002). Die Akkumulation ist umso größer, je mehr LDL im Blut zirkuliert. Oxidation und enzymatische Veränderungen des in der

subendothelialen Matrix eingelagerten LDL durch lokale vaskuläre Zellen (Endothelzellen, Makrophagen, glatte Muskelzellen), tragen zu der Endothelzellaktivierung bei (Furnkranz et al., 2005). Auch einige der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, wie z.B. Zigarettenrauchen oder Adipositas führen zu einer erhöhten Konzentration von oxidiertem LDL im Blut (Beck et al., 2008; Linna et al., 2008). Diabetes mellitus führt zu einer erhöhten Expression von *lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1* auf Endothelzellen, der als wichtigster Rezeptor von oxidiertem LDL dessen Aufnahme in die Zellen vermittelt (Renie et al., 2007). Oxidiertes LDL stimuliert die Endothelzellen zur Produktion von proinflammatorischen Molekülen, Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, z.B. *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF). Außerdem vermag oxidiertes LDL die Produktion von NO zu inhibieren (Lusis, 2000). Bekanntermaßen erhöhen „Cholesterinsenker“ aus der Gruppe der Statine die Stabilität der fibrösen Kappe eines atherosklerotischen Plaques (s.u.), was auf eine Senkung des LDL-Spiegels im Blut und eine Reduktion der intimalen Inflammation zurückgeführt wird (Libby, 2002).

Thrombozyten unterhalten den inflammatorischen Prozess der Atherosklerose, indem sie, zumindest in Tierversuchen gezeigt, bereits in initialen Stadien der Krankheit mit dem Endothel interagieren und an dieses adhären (Massberg et al., 2002). Im Apo-E *-/-* Modell der Maus wurde gezeigt, dass die thrombozytären Rezeptor-Glykoproteine Ib und IIb/IIIa mit dem dysfunktionalen Endothel interagieren. Dies führt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκ-B zur Expression von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1 und MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*)) und proinflammatorischen Zytokinen auf der Endotheloberfläche und trägt damit zur Rekrutierung von Lymphozyten und Monozyten bei (Brand et al., 1996; Collins and Cybulsky, 2001; Gawaz et al., 2000; Gawaz et al., 2005; Gawaz et al., 1998). Die einwandernden Monozyten werden vor allem durch das Zytokin M-CSF zur Proliferation und Differenzierung zu Makrophagen stimuliert. Als solche nehmen sie das in der Intima eingelagerte und oxidierte LDL auf und werden zu Schaumzellen. Diese initialen Verdickungen der Intima der Arterienwand werden als Fettstreifen (*fatty streaks*) bezeichnet und konnten bereits in der Intima von Kindern gefunden werden (Stary et al., 1994).

Im weiteren Verlauf entstehen daraus fibroatheromatöse Plaques. Diese sind einerseits charakterisiert durch die zunehmende Einlagerung extrazellulärer Lipide (v.a. Cholesterin und seine Ester). Außerdem werden glatte Muskelzellen aus der arteriellen Media durch Zytokine und Wachstumsfaktoren (z.B. *platelet derived growth factor*, PDGF), freigesetzt von aktivierten Makrophagen, Lymphozyten und Thrombozyten) zur Dedifferenzierung und Migration in die Intima stimuliert (Libby, 2002). Hier proliferieren sie und sezernieren extrazelluläre Matrix (z.B. Kollagen, Glykoproteine), was zur Bildung einer bindegewebigen

Kappe, vorwiegend bestehend aus glatten Muskelzellen und Kollagen, führt. Diese trennt den thrombogenen lipidreichen Kern vom Blutstrom. Der Prozess des Einwanderns glatter Muskelzellen in die Intima und deren Proliferation wird auch als Neointima-Bildung bezeichnet. Verschiedene Faktoren, unter anderem Hormone, Bluthochdruck und erhöhte Homocystein-Spiegel im Blut, tragen zur Entwicklung von fibrösen Läsionen bei (Lusis, 2000). Arterielle Hypertonie stimuliert in glatten Muskelzellen von Ratten die Expression von PDGF, das ein potenter Stimulus für deren Proliferation ist (Negoro et al., 1995). Auch Angiotensin II, dessen Konzentration im Blut bei arterieller Hypertonie erhöht ist, aktiviert glatte Muskelzellen zur Produktion von extrazellulärer Matrix (Lusis, 2000).

Vor allem in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose kommt es auch in der unter der Intima liegenden Media und Adventitia zu sekundären Veränderungen (Rauch et al., 2001). Sartore et al. zeigten, dass Fibroblasten aus der Adventitia, die sehr lange Zeit für unbeteiligt an dem atherosklerotischen Geschehen gehalten wurden, ebenso zum Prozess der Neointima Bildung beitragen (Sartore et al., 2001). Calcium-Einlagerungen in atherosklerotische Plaques erhöhen die Brüchigkeit des Plaques und verringern die Elastizität der Arterienwand (Proudfoot et al., 1998). Es wird davon ausgegangen, dass klinisch stumme Plaquerupturen, oder –fissuren durch Thrombozyten- und Gerinnungsaktivierung ebenfalls zur Plaque-Progression beitragen (Burke et al., 2001). Auch die Ruptur neu gebildeter Mikrogefäße im Plaque, die ebenfalls als Quelle inflammatorischer Zellen dienen, führt über Einblutungen zu fortgeschrittenen Plaques (de Boer et al., 1999).

2.2 Arterielle Thrombusbildung nach Plaqueruptur und –erosion

2.2.1 Mechanismen der Plaqueruptur und Exposition thrombogener Plaque-Substanzen

Die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques, d.h. das Reißen der fibrösen Kappe und die Exposition thrombogener Plaque-Substanzen zum Blutstrom ist für bis zu 70% der Fälle von Myokardinfarkt und plötzlichem Herztod verantwortlich (Naghavi et al., 2003). Es kommt zur Aktivierung der Thrombozyten und des Gerinnungssystems, wodurch ein Plättchen- und Fibrin-reicher arterieller Thrombus entsteht (Abb.1), der zu einem Verschluss des Gefäßes und einer Ischämie des gefäßabhängigen Gewebes führen kann (Mohler, 2007). So zeigten zahlreiche Autopsie-Studien nach akutem Myokardinfarkt, dass 85% aller okklusiven Thrombi sowohl aus Thrombozyten, als auch aus Fibrin bestehen (Rentrop, 2000). Dabei sind arterielle „weiße“ Thromben überwiegend plättchenreich, während die venösen, „roten“ Thromben vor

allein aus polymerisiertem Fibrin und Erythrozyten bestehen (Jackson and Schoenwaelder, 2003).

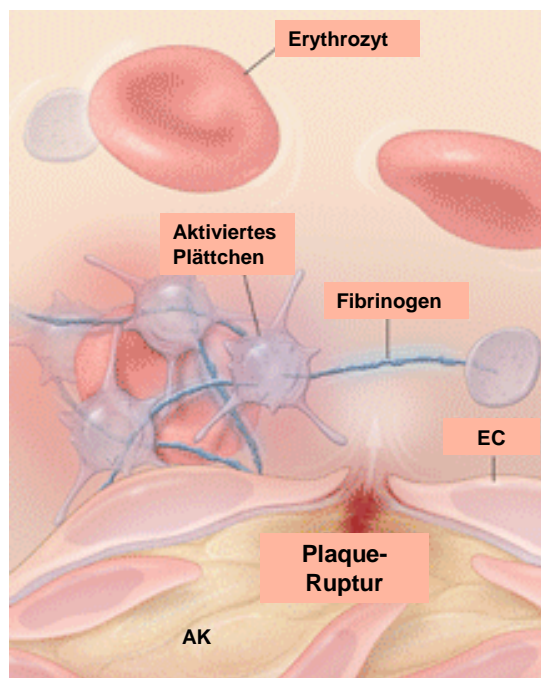


Abbildung 1: Plaque-Ruptur mit konsekutiver Aktivierung von Thrombozyten und Gerinnungssystem.

AK = Atheromatöser Kern. EC = Endothelzelle. Modifiziert nach (Mohler, 2007).

Der atheromatöse Kern gilt als die am stärksten thrombogen wirkende Komponente atherosklerotischer Plaques. Er besteht morphologisch hauptsächlich aus Cholesterinkristallen, extrazellulären Lipiden, die aus zerfallenen Schaumzellen freigesetzt werden, nekrotischen Zellbestandteilen und extrazellulärer Matrix (Fernandez-Ortiz et al., 1994). Daher trägt dessen Größe entscheidend zur Thrombogenität der Plaques bei (Rekhter, 2002).

Zu den Plättchen-aktivierenden Komponenten atherosklerotischer Plaques gehören vor allem heterogene kollagene Strukturen, aber auch von Willebrand-Faktor (vWF), Fibronectin, Laminin, Thrombin, Fibrin/Fibrinogen, oxidiertes LDL (*low density lipoprotein*), LPA (Lysophosphatidsäure) (De Meyer et al., 1999; Penz et al., 2005; Rother et al., 2003; Siess et al., 1999). *Tissue factor* (TF) ist als zellgebundenes Protein, aber auch extrazellulär in atherosklerotischen Plaques lokalisiert. Er aktiviert das extrinsische Blutgerinnungssystem und führt über die Bildung von Thrombin sowohl zur Gerinnselformung, als auch zur Thrombozytenaktivierung.

Die Zusammensetzung und der Grad der Inflammation eines atherosklerotischen Plaques, viel eher als die lumenale Stenose, sind entscheidend verantwortlich für das Auftreten einer Plaqueruptur mit nachfolgender arterieller Thrombose (Hansson, 2005). So sind Gefäßwandläsionen, die für die Entstehung von Myokardinfarkten verantwortlich sind, teilweise nur gering stenosierend und angiographisch nicht detektierbar (Falk et al., 1995). Dies hat zur Einführung des Begriffs des „vulnerablen Plaques“ geführt: Dieser ist gekennzeichnet durch einen großen lipidreichen, nekrotischen Kern und durch eine sehr dünne fibröse Kappe mit hoher Dichte an Entzündungszellen (Corti et al., 2002). Damit ist ein vulnerabler Plaques besonders weich, instabil und neigt zur Ruptur. Inflammatorische Zellen, vor allem Monozyten und Makrophagen, spielen eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung vulnerabler Plaques, da sie Wachstumsfaktoren, proinflammatorische Zytokine, Proliferationsfaktoren und lytische Faktoren produzieren (Libby, 2002). Durch die Sekretion proteolytischer Enzyme, z.B. Matrix-Metallo-Proteasen (MMPs) kommt es zur Degradierung der extrazellulären Matrix im Plaques (Galis and Khatri, 2002). Somit führt vor allem der Kollagen-Abbau in der fibrösen Kappe zu deren Ausdünnung und damit zur Plaques-Instabilität (Aikawa et al., 1998).

Atherosklerotische Plaques rupturieren meistens an ihrem schwächsten Punkt an den Rändern der Läsion, der „Plaques-Schulter“. Hier ist die fibröse Kappe häufig am dünnsten und die Inflammation im Sinne einer Infiltration durch Schaumzellen, Makrophagen und kolokalisierten MMPs am größten (Michel, 2001). Auch physikalische Kräfte an der Läsion, insbesondere Störungen der rheologischen Bedingungen im Sinne von Rezirkulationszonen und die verminderte Elastizität der Gefäßwand, sind für die Plaques-Ruptur von Bedeutung. Arterielle Hypertonie und eine vermehrte Sympatikusaktivität führen über die verstärkte Dehnung der Gefäßwand zu einer vermehrten mechanischen Belastung der Coronargefäße, wodurch ebenfalls die Wahrscheinlichkeit einer Plaques-Ruptur erhöht wird.

Etwa einem Drittel aller akuten koronaren Ereignisse liegt eine oberflächliche Erosion, d.h. eine Verletzung der schützenden Endothelzellschicht, eines meist stenosierenden, fibrösen und nur gering inflammatorischen atherosklerotischen Plaques zugrunde (Virmani et al., 2000). Der Verlust der Integrität der Endothelzellen ist möglicherweise durch inflammatorische oder apoptotische Vorgänge bedingt (Mallat et al., 1999). Eine erhöhte systemische Thrombose-Neigung durch klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Rauchen, Diabetes mellitus oder Hyperlipidämie begünstigen möglicherweise die arterielle Thrombusbildung gerade in Fällen der Plaques-Erosion (Corti et al., 2002). Einige Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen einem hyperaktiven Gerinnungssystem (z.B. erhöhte Blutspiegel von F VIII, erhöhte D-Dimere aufgrund der vermehrten Fibrinolyse) und dem Risiko einer arteriellen Thrombose (Reitsma, 2004; Spronk et al., 2004). Außerdem wurde bei Patienten

mit kardiovaskulären Erkrankungen erhöhte Spiegel von zirkulierendem TF Antigen und aktivierten Thrombozyten gefunden, was mit einer erhöhten Thrombogenität des Blutes assoziiert wurde (Podrez et al., 2007; Sambola et al., 2003; Soejima et al., 1999; Watala, 2005).

2.2.2 Tissue-faktor als Initiator der Atherothrombose

2.2.2.1 Struktur und Physiologie von TF

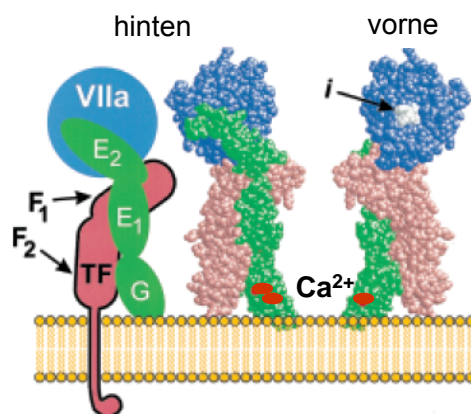


Abbildung. 2: Kristalline Struktur des membrangebundenen TF-FVIIa-Komplexes abgebildet in zwei Orientierungen.

Rot: TF mit zwei Fibronectin Typ III Domänen F1 und F2. Grün: leichte Kette von F VIIa mit Gla Domäne (G) und zwei EGF-like Domänen (E1 und E2). Blau: schwere Kette von F VIIa oder Serin-Proteasen Domäne. Ca^{2+} Ionen sind als rote Punkte dargestellt. "i" bezeichnet tripeptidyl-chlormethylketon Inhibitor im Bereich der aktiven Stelle von F VIIa. Modifiziert nach (Morrissey, 2001).

TF, der wichtigste Initiator der extrinsischen Blutgerinnung, ist ein glykosyliertes Membran-Protein, bestehend aus einer einzelnen Polypeptidkette. TF hat drei Domänen (siehe Abb. 2): 1) Eine aminoterminal, extrazelluläre Domäne, die mit hoher Affinität an FVIIa bindet; 2) Eine transmembranäre Domäne, über die das Protein in der zellulären Membran verankert wird; 3) Eine carboxyterminale, zytoplasmatische Domäne. In normalen Gefäßen wird TF subendothelial vor allem von glatten Muskelzellen der Tunica media und von Fibroblasten der Tunica adventitia synthetisiert und exprimiert (Osterud et al., 1995; Wilcox et al., 1989). Unter physiologischen Bedingungen wird TF nicht dem fließenden Blut exponiert. Das Endothel, das im inaktiven Zustand nicht zu den TF-exprimierenden Zellen gehört, bildet einen Schutz vor

einer unkontrollierten Gerinnungsaktivierung (Eilertsen and Osterud, 2004; Wilcox et al., 1989). Nach einer Gefäßwandverletzung bindet subendothelialer, auf Zelloberflächen exprimierter TF an das glykosylierte Plasma-Protein F VII im Blut. Durch eine Konformationsänderung der Proteasenregion des F VII (siehe Abb. 2, blau) wird dieser zu F VIIa aktiviert (Morrissey, 2001; Nemerson and Repke, 1985; Osterlund et al., 2005). TF und F VIIa haben eine hohe Affinität füreinander, und keiner der beiden Komponenten alleine vermag in physiologischen Konzentrationen das Gerinnungssystem zu aktivieren (Moons et al., 2002). Gemeinsam als TF - FVIIa-Komplex initiieren sie die Blutgerinnung (siehe 2.2.2.4).

Bogdanov et al. entdeckten kürzlich eine alternativ gespleisste Form von TF in humanem Blut, die aus nahezu der gesamten extrazellulären Domäne besteht, jedoch keine transmembranäre Domäne besitzt und eine einzigartige Peptidsequenz am C-terminalen Ende hat. Als im Blut zirkulierende, nicht zellgebundene, sondern lösliche Form, reichert sich dieser TF im wachsenden Thrombus an, bindet an Thrombozyten und aktiviert F X zu F Xa (Bogdanov et al., 2003).

2.2.2.2 Plaque-TF

Plaque-TF trägt wesentlich zur Thrombogenität atherosklerotischer Läsionen bei (Mackman, 2004; Toschi et al., 1997). Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen dem TF-Gehalt in atherosklerotischen Plaques und der Plaque-induzierten Atherothrombose (Ardissino et al., 1997; Ardissino et al., 2001; Badimon et al., 1999; Ott, 2003; Toschi et al., 1997). Bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und hohem TF-Gehalt in atherosklerotischen Coronar-Plaques wurde eine erhöhte Thrombinbildung (gemessen anhand erhöhter Plasmaspiegel von Prothrombinfragment 1 + 2) gefunden (Ardissino et al., 2001). In atherosklerotischen Plaques von Patienten mit instabiler Angina pectoris wurde eine signifikant höhere TF-Aktivität und -Expression (durchschnittlich 60 pg/mg Plaque Feuchtwicht) gefunden, als in Plaques von Patienten mit stabiler Angina pectoris (durchschnittlich 30 pg/mg Plaque Feuchtwicht) (Ardissino et al., 1997). Cortellaro et al. fanden durchschnittlich 55 ± 56 pg TF/ mg Plaque Protein in atherosklerotischen Läsionen (Cortellaro et al., 2002).

In vulnerablen, morphologisch weichen atherosklerotischen Plaques ist TF vor allem im lipidreichen nekrotischen Kern lokalisiert. Dort liegt er extrazellulär, vor allem an Mikropartikel assoziiert, vor. Diese Mikropartikel stammen vor allem von apoptotischen Makrophagen und Lymphozyten, aber auch zu einem geringen Anteil von glatten Muskelzellen und Endothelzellen (Mallat et al., 1999; Tedgui and Mallat, 2001; Toschi et al., 1997). Dies ist insofern interessant, als der Vorgang der Apoptose zur Mikropartikel-Bildung und zu einer vermehrten Expression von Phosphatidylserin führt, das als negativ geladene Oberfläche die

katalytische Aktivität der Enzyme der Gerinnungskaskade stimuliert und somit auch eine mögliche Ursache für eine erhöhte TF-Aktivität ist (Viles-Gonzalez et al., 2004a).

Neben dieser extrazellulären Form existiert auch eine zellgebundene Form: TF wird von zahlreichen Zellen in atherosklerotischen Plaques synthetisiert: Plaque-TF mRNA und Plaque-TF Antigen wurden in und auf glatten Muskelzellen, Makrophagen und vor allem in Schaumzellen atherosklerotischer Plaques nachgewiesen (Marutsuka et al., 2005; Toschi et al., 1997).

Eine Gruppe zeigte *in vitro*, dass Plaque-Homogenate Monozyten und Makrophagen zur Expression von aktivem TF induzierten (Muhlfelder et al., 1999). Die Expression von TF wird durch zahlreiche Mechanismen getriggert: Zum Beispiel produzieren Th1 Lymphozyten spezifische Zytokine wie IL-2, TNF- β und Interferon γ , die die TF Expression in mononukleären Zellen induzieren (Del Prete et al., 1995; Shebuski and Kilgore, 2002). Oxidiertes LDL stimuliert Monozyten und Makrophagen zur Expression und Präsentation von TF (Lewis et al., 1995). Auch die Umwandlung von Makrophagen in Cholesterol-haltige Schaumzellen führt zur vermehrten Expression von TF (Colli et al., 1999). *In vitro* werden glatte Muskelzellen durch Thrombin und platelet derived growth factor zur TF Expression stimuliert (Schechter et al., 1997; Taubman et al., 1993). Des Weiteren wird die zelluläre Expression von TF durch das Zytokin CD 40 Ligand (CD40 L) reguliert. Es wurde in atherosklerotischen Plaques kolokalisiert mit TF gefunden und die Bindung an seinen Rezeptor CD 40 auf Endothelzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen führt zu einer vermehrten Expression und Aktivität von TF auf diesen Zellen (Anand et al., 2003; Bavendiek et al., 2002; Mach et al., 1997; Schonbeck et al., 2000). Thrombozyten könnten im Bereich rupturierter atherosklerotischer Plaques als Quelle für CD 40 L dienen, da sie im aktivierten Zustand CD40L auf ihrer Oberfläche exprimieren (Andre et al., 2002).

Endothelzellen trennen atherosklerotische Plaques vom Blutstrom und exprimieren unter physiologischen Bedingungen keinen TF. Allerdings können akute hämodynamische Störungen des Blutflusses durch die Aktivierung von SSRE's in Endothelzellen die TF-Genexpression über einen AP-1-, *nuclear factor-kappa-B-* (NF- κ -B-) und Egr-1-abhängigen Mechanismus induzieren (Mazzolai et al., 2002). Diesen prothrombotischen Prozessen wird vor allem durch die endotheliale Produktion von NO entgegengewirkt, das die Endotoxin- und Zytokin-induzierte Expression von TF reduziert (Yang and Loscalzo, 2000).

Badimon et al. zeigten, dass die Hemmung von Plaque-TF durch Inkubation mit dem *Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)* die Thrombogenität von atherosklerotischen Plaques stark reduziert (Badimon et al., 1999). TFPI wird in atherosklerotischen Plaques von Makrophagen exprimiert (Drew et al., 1997), wurde kolokalisiert mit TF gefunden, und die Expression von

TFPI war mit einer reduzierten TF-Aktivität assoziiert (Caplice et al., 1998; Kaikita et al., 1999).

2.2.2.3 Intravaskulärer TF und Mikropartikel

In jüngster Zeit wurden zahlreiche Studien bezüglich der Existenz einer weiteren TF-Quelle publiziert. Dieser intravaskuläre TF (blood-borne TF) könnte zusätzlich zur Thrombus-Bildung nach Plaque-Ruptur beitragen (Mackman, 2004). In diesem Sinne wurden bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen erhöhte Plasmakonzentrationen von zirkulierendem TF-Antigen nachgewiesen (Giesen et al., 1999; Kaikita et al., 1997). Über Form, Herkunft und Aktivität von intravaskulärem TF herrschen kontroverse Ansichten: Viele Arbeiten haben gezeigt, dass der größte Anteil von intravaskulärem TF gebunden an Mikropartikel im Blut zirkuliert (Berckmans et al., 2001; Biro et al., 2003; Sturk-Maquelin et al., 2003). Von welchen Blut-Zellen TF-exponierende Mikropartikel stammen, ist nicht geklärt. Diskutiert werden v.a. Thrombozyten und Monozyten. Für die Mikropartikel-Entstehung spielen sowohl Zellaktivierung als auch apoptotische Vorgänge eine große Rolle (Schenone et al., 2004). Neben Mikropartikeln wurden zirkulierende Leukozyten als die hauptsächliche Quelle von zirkulierendem TF genannt (Giesen et al., 1999; Sim et al., 2005). Aktivierte Monozyten in der Blutzirkulation scheinen eine Quelle für TF-tragende Mikropartikel zu sein, wobei die Aktivierung der Monozyten zum Beispiel durch erhöhte LPA-Spiegel im Blut oder Zigarettenkonsum verursacht werden könnte (Corti et al., 2003). Rauch et al. gehen davon aus, dass in entstehenden arteriellen Thrombi ein CD15 Rezeptor vermittelter TF-Transfer von Monozyten auf Thrombozyten stattfindet (Rauch et al., 2000). Andere Gruppen haben die Expression und die Freisetzung von TF durch aktivierte Thrombozyten vorgeschlagen (Camera et al., 2003; Muller et al., 2003; Siddiqui et al., 2002). Bei der Aktivierung von Plättchen-assoziiertem TF könnte die Hemmung von TFPI durch die leukozytäre Elastase neutrophiler Granulozyten eine Rolle spielen (Zillmann et al., 2001). Gross et al. haben gezeigt, dass der sich im wachsenden arteriellen Thrombus ansammelnde intravaskulärer TF initial von zirkulierenden Mikropartikeln stammt und später auch TF-tragende Leukozyten zur Akkumulation von TF in der Läsion beitragen (Gross et al., 2005). Die Konzentration von TF-tragenden Mikropartikeln im arteriellen Thrombus und die Fibrinbildung scheint über die Bindung der Adhäsionsmoleküle P-Selektin auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten an PSGL-1 auf Mikropartikeln vermittelt zu sein (Falati et al., 2003).

Viele Unklarheiten herrschen darüber, ob der intravaskuläre TF aktiv ist, d.h. ob er die Serinprotease F VII im Plasma komplexieren und zu FVIIa aktivieren kann, oder nicht. Zahlreiche Studien sprechen für die physiologische Bedeutung von aktivem, im Blut zirkulierenden und lokal gebildeten TF (Albrecht et al., 1996; Balasubramanian et al., 2002;

Engelmann et al., 2003; Giesen et al., 1999; Koyama et al., 1994; Siddiqui et al., 2002; Sim et al., 2005). Sogar Konzentrationen von mehr als 30pM aktivem TF wurden vorgeschlagen (So et al., 2003). Dies steht jedoch im Kontrast zu Meinungen und Ergebnissen von anderen Gruppen: So wurde behauptet, dass physiologisch höchstens 20 fM aktiver TF im Blut zirkulieren kann, da bei höheren Konzentrationen eine Blutgerinnung induziert werden würde (Butenas et al., 2005). Außerdem konnten viele Gruppen keine TF-Aktivität im Blut von gesunden Probanden nachweisen (Berckmans et al., 2001; Butenas et al., 2005; Butenas and Mann, 2004; Santucci et al., 2000).

Bezüglich des Beitrags von zirkulierendem TF bei der arteriellen Thrombusbildung gibt es unterschiedliche Daten. Von vielen Gruppen wird die Akkumulation von zirkulierendem TF im Rahmen der Thrombusbildung favorisiert (Bogdanov et al., 2003; Furie and Furie, 2008). Furie et al. zeigten im Mausmodell, dass intravaskulärer, an Mikropartikel gebundener TF, zur Gerinnungsaktivierung nach einer Gefäßwandverletzung beiträgt (Falati et al., 2003). Jedoch herrschen andererseits Zweifel darüber, ob die nötigen Konzentrationen von intravaskulärem TF an der Läsion zur Aktivierung der Blutgerinnung in der physiologischen Zeitspanne erreicht werden können (Butenas et al., 2005).

2.2.2.4 TF-modulierte Aktivierung der Gerinnungskaskade und prokoagulatorische Thrombozyten-Aktivität

Durch die Exposition von aktivem TF nach Plaque-Ruptur oder –Erosion kann durch die Aktivierung der extrinsischen Blutgerinnung ein arterieller Thrombus entstehen (Abb.3). Intravaskulärer TF könnte ebenso zum Wachstum des arteriellen Thrombus beitragen (siehe 2.2.3.2). Thrombozyten werden entsprechend diesem Modell erst sekundär durch Thrombin, das durch das Gerinnungssystem generiert wird, aktiviert.

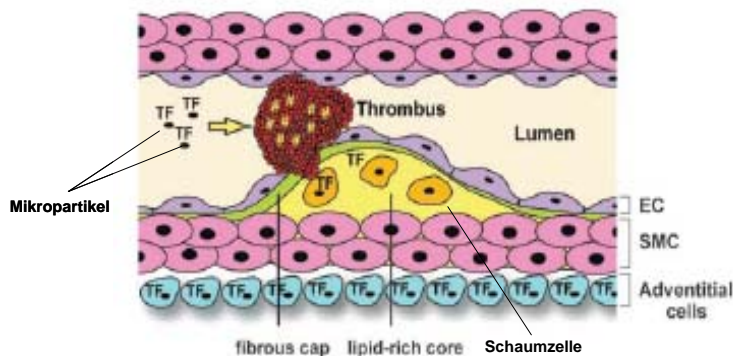


Abbildung 3: Rolle von TF bei der Ruptur eines atherosklerotischen Plaques.

TF wird im von Schaumzellen (Orange) exprimiert, und befindet sich extrazellulär, hauptsächlich auf Mikropartikeln im lipidreichen Kern (Gelb, lipid rich core). Fibrous cap = fibröse Kappe des atherosklerotischen Plaques. Nach Plaque-Ruptur wird TF dem fließenden Blut exponiert und aktiviert das Gerinnungssystem. Zusätzlich könnte intravaskulärer, auf Mikropartikeln exprimierter TF lokal aktiviert gebildet werden und zum Thrombus Wachstum beitragen. *Modifiziert nach (Mackman, 2004).*

Die plasmatische Gerinnung stellt eine Serie sequentieller Aktivierungen von plasmatischen Serin-Proteasen dar und gliedert sich in zwei „Arme“: den schnellen extrinsischen und den langsameren intrinsischen Pfad. Beide münden über die Aktivierung von FX zu FXa in der Bildung von Thrombin, das als „Schlüssel-Enzym“ der Gerinnungskaskade (Mann, 1999) für die Konvertierung von Fibrinogen zu Fibrin, dem letzten Schritt der Koagulationskaskade, verantwortlich ist (siehe Abb.4). Die Thrombin-abhängige Aktivierung humaner Thrombozyten wird durch PAR-1 und PAR-4, sowie durch die Bindung an Glykoprotein Ib vermittelt (Heemskerk et al., 2002; Kahn et al., 1998). Es existiert möglicherweise auch eine TF-unabhängige Thrombinbildung, bei der Thrombin durch aktivierte Plättchen generiert wird, die ein *active factor X-like protein* sezernieren (Butenas et al., 2003; Tuszynski et al., 1982).

TF aktiviert den extrinsischen Pfad der Gerinnung, indem er an zirkulierenden FVII bindet, wodurch dieser durch limitierte Proteolyse zu dem aktivierten FVIIa umgewandelt wird (Nemerson and Repke, 1985). Ungefähr 1% des FVII liegt in der Blutzirkulation physiologisch als FVIIa vor, der alleine in hohen Konzentrationen auch eine Fibrinbildung induzieren kann (Morrissey, 2001). F VIIa ist jedoch eine sehr schwache Serinprotease. Erst der Komplex aus TF-FVIIa, führt zu einer millionenfachen Verstärkung der Proteaseaktivität und initiiert die Koagulation durch die Aktivierung von FX zu FXa und FIX zu FIXa (siehe Abb. 4) (Morrissey, 2001). Der Komplex aus TF-FVIIa wird mittlerweile als wichtigster Initiator der extrinsischen Blutgerinnung gesehen und viele Hypothesen besagen, dass die Bildung von Fibrin *in vivo* hauptsächlich, ja sogar ausschließlich vom TF-FVIIa-Komplex abhängig ist (Mackman, 2004; Mann et al., 2003b). Diese These wird durch die Tatsache erhärtet, dass Mäuse, die keinen

TF oder VII besitzen, bereits intrauterin an ausgeprägten Hämorrhagien sterben (Bugge et al., 1996; Rosen et al., 1997).

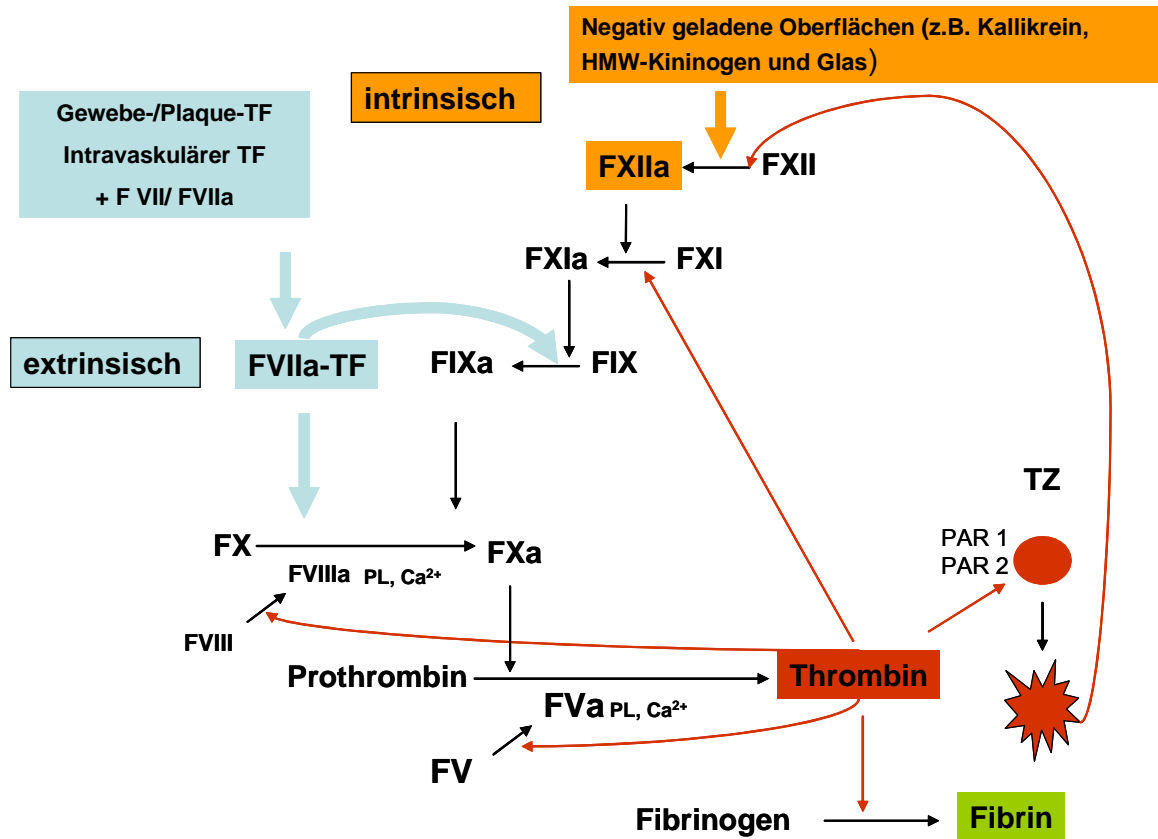


Abbildung 4: Die Koagulationskaskade (vereinfacht).

Der gebildete FVIIa-TF-Komplex initiiert die extrinsische Gerinnung durch die Aktivierung von FIX und F X. FIX kann alternativ über den intrinsischen Gerinnungsweg durch FXIa aktiviert werden. Der intrinsische Pfad der Gerinnung beginnt mit der F XII Aktivierung. Aktivierter Faktor XII (FXIIa) entsteht, indem FXII mit negativ geladenen Oberflächen in Berührung kommt. Der Prothrombinase-Komplex (FVa-FXa) aktiviert Prothrombin zu Thrombin. Thrombin aktiviert zahlreiche Proteine und schneidet Fibrinogen zu Fibrin-Monomeren, die dann zu Fibrinfasern polymerisieren. Außerdem bindet Thrombin an PARs (protease activated receptors) auf Thrombozyten, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Reaktionen, die Ca^{2+} -Ionen und eine Phospholipid-Oberfläche, z.B. auf aktivierten Thrombozyten oder apoptotischen Mikropartikeln, benötigen, sind mit PL (Phospholipide) und Ca^{2+} (Calcium) gekennzeichnet. Zu den Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren gehören die enzymatischen Faktoren FIX, FX, sowie die nicht-enzymatischen Ko-Faktoren FV und FVIII. Weggelassen wurden der hämostatisch relevante antikoagulatorische FXIII, der die Fibrinpolymerisation hemmt, sowie der TFPI, der den TF-FVIIa Komplex hemmt. Vernachlässigt wurden außerdem weitere natürlichen Antikoagulantien und diverse Rückkopplungsreaktionen.

Der intrinsische Pfad der Gerinnung beinhaltet die Aktivierung des Gerinnungsfaktors FXII durch negativ geladene Oberflächen (siehe Abb. 4 und Abschnitt 2.2.3). Außerdem kann der FXI durch Thrombin und der FIX durch den TF-FVIIa-Komplex aktiviert werden (Abb.4). Diese intrinsische Gerinnung führt dann ebenfalls zur Aktivierung von FX zu FXa, dem ersten gemeinsamen Schritt der Gerinnungskaskade. Die Bildung bereits kleinster (nanomolarer) Mengen Thrombin führt durch einen „positiven feedback“ zur Aktivierung von Thrombozyten und zahlreichen Gerinnungsfaktoren (v.a. FV, FVIII, FXI). Schließlich sorgt es durch die Katalyse des letzten Schritts der Gerinnungskaskade, der Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin, für die Gerinnungsbildung.

Die Aktivität der Gerinnungskaskade ist in höchstem Maße abhängig von der Anwesenheit von speziellen Phospholipidmembranen, v.a. Phosphatidylserin (PS), die *in vivo* vor allem an der Oberfläche aktivierter Thrombozyten bereitgestellt werden (Heemskerk et al., 2002; Monroe et al., 1994). Aktivierte Thrombozyten erhöhen die exponierte PS-Menge auf ihrer Oberfläche von 2% auf bis zu 12% (Bever et al., 1986; Comfurius et al., 1996; Solum, 1999). Auch andere Phospholipide, vor allem Phosphatidylethanolamin, spielen eine wichtige Rolle im Koagulations-Prozess, indem sie, ebenso wie PS, die Bindungs-Affinität für die hydrophoben Faktoren Va und VIIIa erhöhen (Gilbert and Arena, 1995; Smeets et al., 1996). Zahlreiche Agonisten (z.B. Kollagen, Thrombin, ADP, Thromboxan A₂) binden an ihre spezifische Rezeptoren auf der Plättchenmembran und induzieren dadurch die PS-Exposition, sowie die Bildung von PS-tragenden Mikrovesikeln (Heemskerk et al., 2002). Durch eine duale Stimulation der Thrombozyten mit Kollagen und Thrombin summieren sich die aktivierenden Effekte der einzelnen Agonisten (Hemker et al., 1983). *In vivo* scheint in einem sich entwickelnden arteriellen Thrombus insbesondere die Bindung von Kollagen an den GPVI-Rezeptor für die Thrombozytenaktivierung und konsekutiver PS-Exposition verantwortlich zu sein (Heemskerk et al., 2002). So können in der Klinik verwendeten Thrombozytenaggregations-Hemmer wie z.B. die Glykoprotein IIb-IIIa Antagonisten Abciximab und Integrelin, oder auch ADP-Rezeptor Antagonisten einen suppressiven Effekt auf die Initiations- und Propagationsphase der Blutgerinnung haben (Leon et al., 2004; Mann et al., 2003b). Auch die Bindung des Gerinnungsfaktor Prothrombin an den GPIIb-IIIa Rezeptor von Thrombozyten führt zur Thrombozytenaktivierung gefolgt von PS-Exposition (Byzova and Plow, 1997; Plow et al., 2001). Sogar die Bindung von Thrombozyten an Fibrin, das als Endprodukt der Gerinnungskaskade entsteht, führt zur prokoagulatorischen Transformation der Thrombozyten (Beguín and Kumar, 1997; Billy et al., 1997). Die Bindung an die Phospholipide der Thrombozytenmembran führt zu einer erhöhten lokalen Konzentration der Gerinnungsfaktoren, ermöglicht deren Konformationsänderung, sorgt für deren optimale Aktivität und für die Restriktion des Gerinnungsprozesses am Ort der Thrombozytenaktivierung (Chen and Lentz, 1997; Kalafatis et al., 1994). Dabei wird die

Bindung der Gerinnungsenzyme an die Thrombozyten außer durch die Phospholipidoberfläche auch durch spezifische Proteine auf der Thrombozytenoberfläche vermittelt, die bisher nur zum Teil bekannt sind (Abb.5) (Monroe et al., 2002).

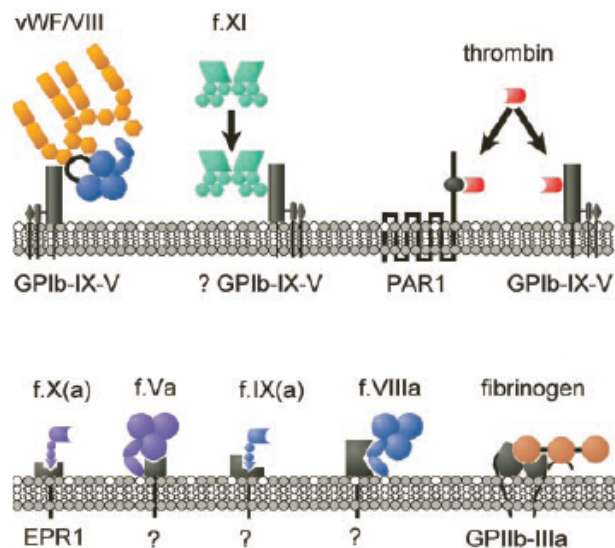
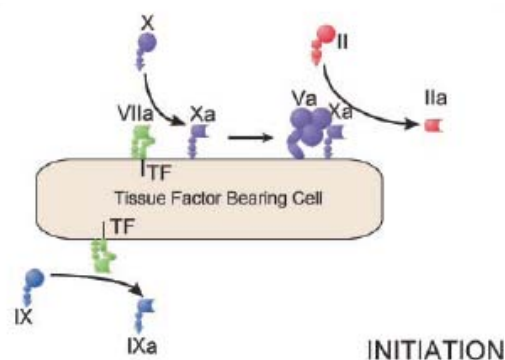


Abbildung 5: Proteine der Thrombozytenoberfläche, die die Bindung von Koagulationsfaktoren vermitteln.

Die Bezeichnung der bekannten Proteine der Thrombozyten steht jeweils unter dem Protein. Bindungsproteine für Gerinnungsfaktoren, die bisher nicht identifiziert wurden, jedoch vermutet werden, sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet. GP = Glykoprotein. EPR1 = *effector-cell protease receptor-1*. PAR1 = *protease-activated receptor-1*. Modifiziert nach (Monroe et al., 2002).

Gesamtheitlich wird die Gerinnungskaskade in eine Initiationsphase (initiation phase) und eine Propagationsphase (propagation phase) unterteilt (Mann et al., 2003a). Im „zell-basierten“ Modell der Gerinnungskaskade wird das Abfließen der katalytischen Reaktionen dieser beiden Phasen auf der Zelloberfläche von TF-exponierenden Zellen, und Mikropartikeln und auf der Oberfläche aktivierter, PS-exponierender Thrombozyten dargestellt (Abb.6).



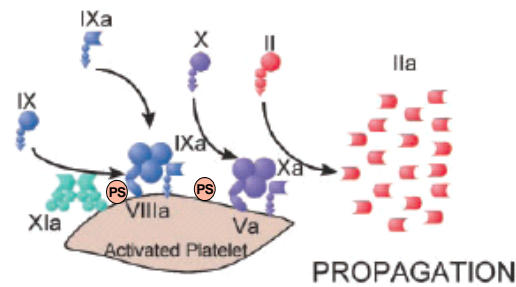


Abbildung 6: Initiations- und Propagationsphase der Blutgerinnung in Abhängigkeit einer prokoagulatorischen Thrombozytenfunktion.

Initiation = Initiationsphase: zellgebundener TF (*Tissue factor bearing cell*), aber auch extrazellulärer TF, z.B. in atherosklerotischen Plaques (hier nicht dargestellt) aktiviert FVII zu FVIIa, komplexiert FVIIa und ermöglicht so die Bildung von FIXa und FXa. FXa aktiviert dann FV zu FVa, komplexiert mit diesem und konvertiert dadurch kleinste Mengen Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa). Thrombin aktiviert andere Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten (activated platelet) mit der Folge der PS Exposition. Propagation = Propagationsphase: FIXa stimuliert zusammen mit FVIIIa die Tenase-Reaktion auf PS-exponierenden aktivierten Thrombozyten, die zur Entstehung von FXa führt. FXa stimuliert zusammen mit FVa die Prothrombinase-Reaktion, ebenfalls auf der PS-exponierenden Thrombozytenoberfläche, die zur Entstehung von großen Mengen Thrombin führt. Modifiziert nach (Monroe et al., 2002).

In der Initiationsphase ist TF im Wesentlichen für die Gerinnungsaktivierung verantwortlich (Heemskerk et al., 2002; Mann et al., 2003a). Durch den TF-FVIIa Komplex werden geringe Mengen FIXa und FXa und Thrombin gebildet, die dann die restlichen Gerinnungsfaktoren der Kaskade aktivieren.

Über 96% des gesamten Thrombins wird allerdings erst in der Propagationsphase gebildet, die nahezu unabhängig von dem TF-FVIIa-Komplex abläuft. Der Grund hierfür ist die Expression von TFPI auf der Oberfläche von Thrombozyten, Endothelzellen und anderen Blutzellen, durch den der TF-F VIIa-Komplex zu diesem Zeitpunkt bereits inhibiert wird (Mann, 1999). In der Propagationsphase sind hauptsächlich der Tenase-Komplex und der Prothrombinase-Komplex für die Bildung von FXa und für die Thrombinbildung verantwortlich (Mann et al., 2003a). Die beiden Ko-Faktoren FVa und FVIIIa tragen wesentlich zur Katalyse dieser beiden Reaktionen bei (Nesheim et al., 1988). Der intrinsische Tenase-Komplex besteht aus aktiviertem FIX (FIXa) und FVIIIa. Dieser Komplex bildet sich an Phospholipid-Membranen, um in Anwesenheit von Ca^{2+} die Konversion von FX zu FXa zu katalysieren (Schenone et al., 2004). Dieser Komplex katalysiert die FXa-Bildung ca. 50-fach effizienter, als der TF-FVIIa-Komplex (Mann, 1999). Der Prothrombinase-Komplex bildet sich aus dem Komplex aus FXa und FVa und benötigt ebenso negativ geladene Phospholipid-Membranen und Ca^{2+} Ionen, um aus Prothrombin Thrombin zu bilden. F V stammt zu 80% aus dem

Plasma und zu 20% aus den alpha Granula aktivierter Thrombozyten, die auch geringe Mengen von bereits aktivem F Va sezernieren (Schenone et al., 2004).

Renne et al. schlugen kürzlich vor, dass auch aktivierter FXII in der Propagationsphase wesentlich zur Thrombus-Bildung *in vivo* beitragen könnte (Renne et al., 2005) (siehe auch 2.2.3). *In vivo* wird die Propagationsphase im Wesentlichen durch Antithrombin III, Protein C, Protein S und Thrombomodulin negativ reguliert, auf welche hier nicht näher eingegangen wird (Mann, 1999).

2.2.3 F XII-Aktivierung und intrinsisches Gerinnungssystem

Der intrinsische Pfad der Gerinnungskaskade wird durch die Aktivierung von Faktor XII, auch bekannt als Hagemann Faktor, im Blut gestartet. Aktivierter Faktor XII (FXIIa) entsteht, indem FXII mit negativ geladenen Oberflächen in Berührung kommt. Dies wird auch als Kontaktaktivierung bezeichnet. Zu diesen negativ geladenen Oberflächen zählen zum einen lösliche Plasmaproteine wie high molecular weight kininogen und Präkallikrein oder Kallikrein. Zum anderen kann FXII durch Proteine der subendothelialen Matrix aktiviert werden (Hojima et al., 1984). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass verschiedene Kollagene, die bei der Ruptur atherosklerotischer Plaques exponiert werden können, ebenfalls zu den FXII aktivierenden Molekülen gehören und damit prokoagulatorische Aktivität besitzen (Kawamoto and Kaibara, 1990; Osterud et al., 1979). Jedoch kamen nicht alle Forscher zu diesem Ergebnis (Koenig et al., 1991). Es ist strittig, ob die negativ geladene Oberfläche aktivierter Thrombozyten direkt in der Lage ist, FXII zu F XIIa zu aktivieren (Walsh and Griffin, 1981). Auch konnte bisher nicht gezeigt werden, dass F XIIa an aktivierte Thrombozyten bindet. Es ist jedoch gesichert, dass aktivierte Thrombozyten die FXII-abhängigen Thrombin- und Fibrinbildung begünstigen (Johne et al., 2006). Bei *in vitro* Versuchen muss bedacht werden, dass FXII ebenso durch artifizielle negativ geladene Oberflächen, wie beispielsweise Glas, aktiviert werden kann (Gawaz, 2001).

Die Rolle der FXII initiierten Kontaktaktivierung *in vivo* unter physiologischen und pathologischen Bedingungen wurde über Jahrzehnte kontrovers diskutiert. Aufgrund der Beobachtung, dass Menschen und Mäuse, die unter einem Mangel an FXII, HMWK oder Präkallikrein leiden, keine abnormale Blutungsneigung vorweisen, zweifelte man lange an, dass die Kontaktaktivierung via FXII des intrinsischen Systems *in vivo* eine Rolle spielt (Koster et al., 1994; Zeerleder et al., 1999). Dies wird durch die Tatsachen erhärtet, dass das Haupt-Substrat für FXII, der FXI, auch unabhängig von FXII und sogar effizienter durch Thrombin aktiviert werden kann (Baglia and Walsh, 2000) (Abb.4). Außerdem kann der intrinsische FIX

auch über den extrinsischen TF-FVIIa-Komplex aktiviert werden (Osterud and Rapaport, 1977) (Abb. 4).

Andererseits haben klinische Studien erhöhte FXIIa Spiegel im Plasma mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Atherosklerose und dem wieder Auftreten koronarer Ereignisse nach abgelaufenem Myokardinfarkt assoziiert (Colhoun et al., 2002; Grundt et al., 2004; Zito et al., 2000).

Kürzlich wurde von Renné et al. veröffentlicht, dass der FXII und damit die intrinsische Kontaktaktivierung einen wichtigen Einfluss auf die arterielle Thrombusbildung in Mäusen haben (Renne et al., 2005). Mäuse, denen der FXII fehlte, zeigten nach arterieller Gefäßwandverletzung zwar initial eine normale Thrombozytenadhäsion und –aggregation, die Thrombus-Größe war jedoch signifikant geringer im Vergleich zu den wild-typ-Mäusen (Renne et al., 2005).

Die Untersuchung der Rolle der FXII Aktivierung für die Thrombusbildung durch atherosklerotische Plaques ist auch Gegenstand dieser Arbeit.

2.2.4 Kollagen-induzierte Atherothrombose

2.2.4.1 Struktur von Kollagen und GPVI

Kollagene bestehen aus einer tripelhelikalen Polypeptidkette, sowie globulären Domänen. Sie sind die Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix und tragen entscheidend zur Gefäßwandintegrität und Elastizität bei. Sie lassen sich unterscheiden anhand ihrer Aminosäuresequenz und anhand ihrer Fähigkeit, fibrilläre Strukturen auszubilden. So gibt es fibrilläre und nicht-fibrilläre Kollagene und man kennt 28 verschiedene Typen, von denen bisher 14 verschiedene in der Arterienwand nachgewiesen wurden (Barnes and Farndale, 1999; Plenz et al., 2003). Die tertiäre und quarternäre Struktur der Kollagene sind von entscheidender Bedeutung für die Bindung an die jeweiligen Rezeptoren oder Liganden (Farndale et al., 2004).

Die Bindung und Aktivierung der Thrombozyten wird hauptsächlich durch den thrombozytären Kollagenrezeptor GPVI vermittelt (Savage et al., 1999; Ware, 2004). GPVI ist ein 60 bis 65 kDa großes transmembranäres Glykoprotein, gehört zur Familie der Immunglobulinrezeptoren und bildet einen nicht kovalent gebundenen Komplex mit der Fc-Rezeptor γ -Kette (FcR γ). Dieser setzt sich dann aus zwei GPVI-Molekülen und einem FcR γ -Ketten-Dimer zusammen (Clemetson and Clemetson, 2001; Moroi and Jung, 2004; Nieswandt et al., 2001). Die

Bindung an GPVI ist vor allem an Kollagene mit einer fibrillären Struktur möglich (Typ I, II, III, V, XI, XXVI) und führt zu einer Quervernetzung von GPVI, wodurch es zu einer Tyrosinphosphorylierung der ITAM-Domäne von FcR γ (*immunoceptor tyrosine activation motif-domain*) und damit zur Initiation der GPVI/FcR γ -vermittelten Signaltransduktionskaskade kommt (Nieswandt and Watson, 2003; Watson et al., 2000). Über die Aktivierung komplexer intrazellulärer Signalwege wird schließlich die Kollagen-induzierte Thrombozytenadhäsion, -Sekretion und -Aggregation vermittelt (siehe 2.2.4.3).

2.2.4.2 Heterogene Kollagene im Plaque

Kollagene machen einen Großteil (ca. 60%) des Proteingehalts eines atherosklerotischen Plaques aus (Katsuda and Kaji, 2003). Atherosklerotische Plaques enthalten vor allem fibrilläre Kollagene vom Typ I und III (Shekhonin et al., 1987), wobei Kollagen Typ I das vorherrschende Kollagen ist (Barnes, 1985; Mayne, 1986; Shekhonin et al., 1987). Murata et al. publizierten ein Verhältnis des Kollagen-Typ I zu Typ III von 3:1 in humanen atherosklerotischen Plaques (Murata et al., 1986). Kollagen Typ I produzierende Zellen wurden vor allem in der Schulter-Region und in der fibrösen Kappe eines atherosklerotischen Plaques gefunden (Rekhter et al., 1993). Teilweise wurden auch Kollagene des Typ IV, V und VI in der fibrösen Kappe und in der Media der Arterienwände nachgewiesen (Barnes and Farndale, 1999; Katsuda and Kaji, 2003; Katsuda et al., 1992; Ross et al., 1995).

Die nicht-enzymatische Glykosylierung von Kollagenen der atherosklerotischen Gefäßwand, vor allem bei Diabetikern, führt zu einer Quervernetzung der Fasern, was in einer erhöhten Steifigkeit der Gefäßwand resultiert (Barnes and Farndale, 1999).

In atherosklerotischen Plaques findet ein dynamischen Auf- und Abbau von Kollagenfasern statt (Nikkari et al., 1996). Vor allem fibröse Plaques sind reich an kollagenen Strukturen. Die Kollagen-Synthese geschieht vor allem durch in die Intima eingewanderte, dedifferenzierte glatte Muskelzellen und trägt zur zunehmenden arteriellen Stenose der atherosklerotischen Läsionen bei (Barnes and Farndale, 1999). Zahlreiche Wachstumsfaktoren und inflammatorische Zytokine stimulieren glatte Muskelzellen zur Kollagen-Produktion, u.a. TGF β , Interleukin-1, oxLDL, Cholesterin, Endothelin-1 und platelet derived growth factor (PDGF) (Rekhter, 1999). Auch hämodynamische Kräfte könnten zur Plaque-Kollagen-Produktion beitragen, da glatte Muskelzellen in Kultur durch mechanische Dehnung zur Kollagen-Synthese stimuliert werden (Kollros et al., 1987; Kulik and Alvarado, 1993; Sumpio et al., 1988). Dies könnte den Zusammenhang zwischen der vermehrten Gefäßwanddehnung bei arterieller Hypertonie und der Atheroskleroseentwicklung erklären. Mit der Anhäufung von Kollagenen im Plaque wird auch das Depot für proatherogene Moleküle, wie LDL, oxLDL

(oxydiertes LDL) und Wachstumsfaktoren erhöht und die Oxidation von LDL erhöht seine Bindefähigkeit an Kollagen (Greilberger et al., 1997; Taipale and Keski-Oja, 1997).

Im Rahmen der Entstehung vulnerabler Plaques führt die Abnahme des Kollagen-Gehalts in der fibrösen Kappe und in der Plaque-Schulter durch eine verminderte Synthese und durch einen vermehrten enzymatischen Abbau zur Verdünnung und Instabilität der Kappe und steigert damit das Risiko einer Plaque-Ruptur (Lee and Libby, 1997; Libby, 1995). Eine Degradierung der Kollagenfasern wird vor allem durch Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs, z.B. Kollagenasen, Gelatinasen) verursacht. Diese Enzyme werden vor allem von Makrophagen sezerniert (Aikawa et al., 1998). Rekhter et al. identifizierten vor allem im Bereich der Plaque-Schulter MMP-positive Makrophagen (Rekhter et al., 1993). Endothelzellen, glatte Muskelzellen und T-Lymphozyten sind ebenfalls Quellen für MMPs in atherosklerotischen Plaques (Katsuda and Kaji, 2003). Bei der mikroskopischen Untersuchung humaner, thrombogener atherosklerotischer Plaques fanden wir kollagenes Material, das nicht die typische fibrilläre Struktur aufwies, was ebenso für eine vermehrte Degradierung kollagener Fasern in atherosklerotischen Läsionen spricht (Penz et al., 2005).

Ein weiterer Mechanismus der Plaquestabilisierung ist eine verminderte Kollagen-Synthese durch glatte Muskelzellen. Inhibitorische Moleküle, die zu einer Hemmung der Expression der für Kollagen kodierenden Gene führen, sind u.a. NO, Interferon γ aus T-Lymphozyten, und fibroblast growth factor (FGF) (Rekhter, 1999). Ein weiterer Grund für eine Abnahme der Kollagen-Produktion ist wahrscheinlich das vermehrte Absterben glatter Muskelzellen durch apoptotische und nekrotische Vorgänge im Rahmen der Progression eines atherosklerotischen Plaques (Rekhter et al., 2000; Schwartz and Bennett, 1995).

2.2.4.3 Thrombozytenaktivierung vermittelt durch Kollagen und andere Agonisten

Nach der Ruptur –oder Erosion eines atherosklerotischen Plaques kommen zirkulierende Plättchen in Kontakt mit exponierten Kollagenen der extrazellulären Matrix und der fibrösen Kappe (Barnes and Farndale, 1999). Die im Plaque vorherrschenden Kollagene Typ I und III gelten als die wichtigsten Moleküle für die Plaque-induzierte Thrombozytenaktivierung (van Zanten et al., 1994). Eine Gruppe berichtete darüber, dass Kollagen Typ I in atherosklerotischen Läsionen ein potenterer Plättchenaktivator ist, als Kollagen Typ III (Cosemans et al., 2005). Wir fanden, dass die Kollagen-Menge eines atherosklerotischen Plaques nicht das Ausmaß der Thrombozytenaktivierung bestimmt (Penz et al., 2005). Weiterhin wurde gezeigt, dass GPVI auf Thrombozyten (siehe 2.2.4.1) auch unter arteriellen Flussbedingungen der entscheidende Kollagen-Rezeptor für die Plaque-induzierte

Thrombozytenadhäsion, -aggregation und -aktivierung ist (Cosemans et al., 2005; Penz et al., 2005).

GPVI gilt mittlerweile als ein zentraler Rezeptor für Kollagen auf Thrombozyten, und seine Aktivierung führt zu Adhäsion, Aggregation, Sekretion und PS-Exposition der Blutplättchen und damit zum Wachstum eines arteriellen Thrombus (Nieswandt et al., 2001). Patienten mit einem GPVI-Mangel, die nur eine geringe Blutungsdiathese haben, weisen eine deutlich verminderte Adhäsion und Aggregation der Blutplättchen an fibrilläres Kollagen auf (Goto et al., 2002; Moroi et al., 1989). Eine Studie zeigte, dass Mäuse, denen der GPVI-FcR γ Komplex fehlt, ebenfalls nur eine geringe Blutungsneigung, jedoch eine starke Verminderung der arteriellen Thrombusbildung nach Gefäßwandverletzung zeigen (Massberg et al., 2003). Ein Polymorphismus im GPVI Gen wurde in anderen Studien (mit geringer Patientenzahl) mit einem erhöhtem Risiko für das Erleiden eines Myokardinfarkts assoziiert (Bigalke et al., 2006; Ollikainen et al., 2004).

Der zweite Hauptrezeptor für Kollagen ist das Glykoprotein $\alpha 2\beta 1$ oder GPIa-IIa, das ebenso wie GPVI direkt, jedoch in Abhängigkeit von Mg^{2+} mit Kollagen interagiert und eher die Adhäsion von Thrombozyten an lösliches Kollagen vermittelt (Santoro et al., 1991; Sixma et al., 1997). Dieser Rezeptor hat nur eine geringe thrombozytenaktivierende Funktion und dient eher der Stabilisation der Thrombozytenadhäsion an Kollagen (Ruggeri, 2002). Andere Gruppen schlagen jedoch eine wichtige Rolle für Integrin $\alpha 2\beta 1$ bei der Entwicklung eines arteriellen Thrombus vor (Kuijpers et al., 2003; Siljander et al., 2004). Somit ist die Frage nach der prinzipiellen Relevanz der beiden Rezeptoren für die Kollagen-induzierte Thrombozytenaktivierung noch nicht abschließend geklärt. Neben diesen beiden existiert noch der Rezeptor GPIV (*Scavengerreceptor*, CD36), der an Kollagen Typ V bindet, jedoch von untergeordneter Bedeutung ist (Kehrel et al., 1998).

Bei höheren arteriellen Scherraten (ab 1000/s) vermögen die Kollagen-Rezeptoren alleine nicht mehr, das Anhaften der Thrombozyten im schneller strömenden Blut zu vermitteln (Ruggeri, 2002). Hierbei ist der Rezeptor für vWF auf der Thrombozytenmembran von entscheidender Bedeutung (GPIb-V-IX-Komplex). Dieser ist insofern ein indirekter Kollagenrezeptor, weil vWF an Kollagen bindet (Andrews et al., 1999). Die Interaktion zwischen vWF und GPIb-V-IX ist bei höheren Wandscherraten von entscheidender Bedeutung für die Dezeleration und das initiale, transiente (\leq Sekunden) „Rollen“ der Thrombozyten auf dem Subendothel (Savage et al., 1998). Die stabile Adhäsion und das permanente Anhaften der Plättchen an der Gefäßwandläsion durch die Interaktion mit den Kollagenrezeptoren GPVI und Integrin $\alpha 2\beta 1$ werden hierdurch ermöglicht (Ruggeri, 2003). Allerdings fanden Goto et al., dass der GPVI-Rezeptor auch in der Interaktion zwischen

Thrombozyten und vWF involviert sein könnte, da Thrombozyten bei Patienten mit einem GPVI-Mangel unter hohen Scherraten (1500/s) nicht an vWF bedeckte Oberflächen adhären und stabile Thrombi formen konnten (Goto et al., 2002).

Außer Rezeptoren für Kollagen und vWF, besitzen Thrombozyten noch weitere spezifische Rezeptoren für die Adhäsion an andere Proteine der extrazellulären Matrix, vor allem Laminin, Fibronectin und Thrombospondin (Chada et al., 2006; Freedman, 2005; Gawaz, 2001; Inoue et al., 2006). Die Bindung von Kollagen, vWF und Fibrinogen führt zur Stimulierung der Tyrosin-Phosphorylierung der Phospholipase $Cy2$, wodurch es zur Bildung von Inositoltrisphosphat (IP3) und Diacylglycerid (DAG) kommt. IP3 führt zur Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum, und DAG aktiviert die Proteinkinase C (Watson et al., 2000) (Abb.7). Die Thrombozytenadhäsion führt über die Aktivierung intrazellulärer Signalwege zur Oberflächenvergrößerung von $2\mu m$ auf $8-10\mu m$ Durchmesser (Ausbreitung, *spreading*), und zur Freisetzung von Inhaltsstoffen aus den dichten Granula (ADP, Ca^{2+} , ATP, Serotonin, Thromboxan A_2) und α -Granula (Faktor V, vWF, Fibrinogen, P-Selektin) (Valettas and Herrmann, 2003). Außerdem beteiligt an der Aktivierung der Thrombozyten sind vor allem: Thromboxan A_2 (gebildet über COX-1 aus Arachidonsäure und freigesetzt aus aktivierten Thrombozyten), ADP (sezerniert aus Erythrozyten) sowie Thrombin, das durch die aktivierte Gerinnungskaskade entsteht (Abb.7). Diese löslichen Substanzen binden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche, und stimulieren über verschiedene intrazelluläre Signalwege Gestaltwandel und Aggregation (Ruggeri, 2002; Siess, 1989). ADP und TXA_2 verstärken den Adhäsionsprozess und die plasmatische Gerinnung an der Thrombozytenoberfläche (Leon et al., 2004). Dadurch kommt es zur lokalen Thrombusbildung und zur zusätzlichen Rekrutierung von Plättchen (Jackson and Schoenwaelder, 2003; Knight et al., 1984).

Bei der Aggregation der Thrombozyten ist das Glykoprotein IIb-IIIa (=Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) von zentraler Bedeutung (Ruggeri, 2002). Intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse führen zur Aktivierung und Exposition dieses Fibrinogen-Rezeptors (Abb.7). An diesen bindet vor allem Fibrinogen, wodurch die Thrombozyten vernetzt werden. Dies führt zur Anhäufung von immer mehr Plättchen im wachsenden Thrombus und zur Ausbildung stabiler Aggregate.

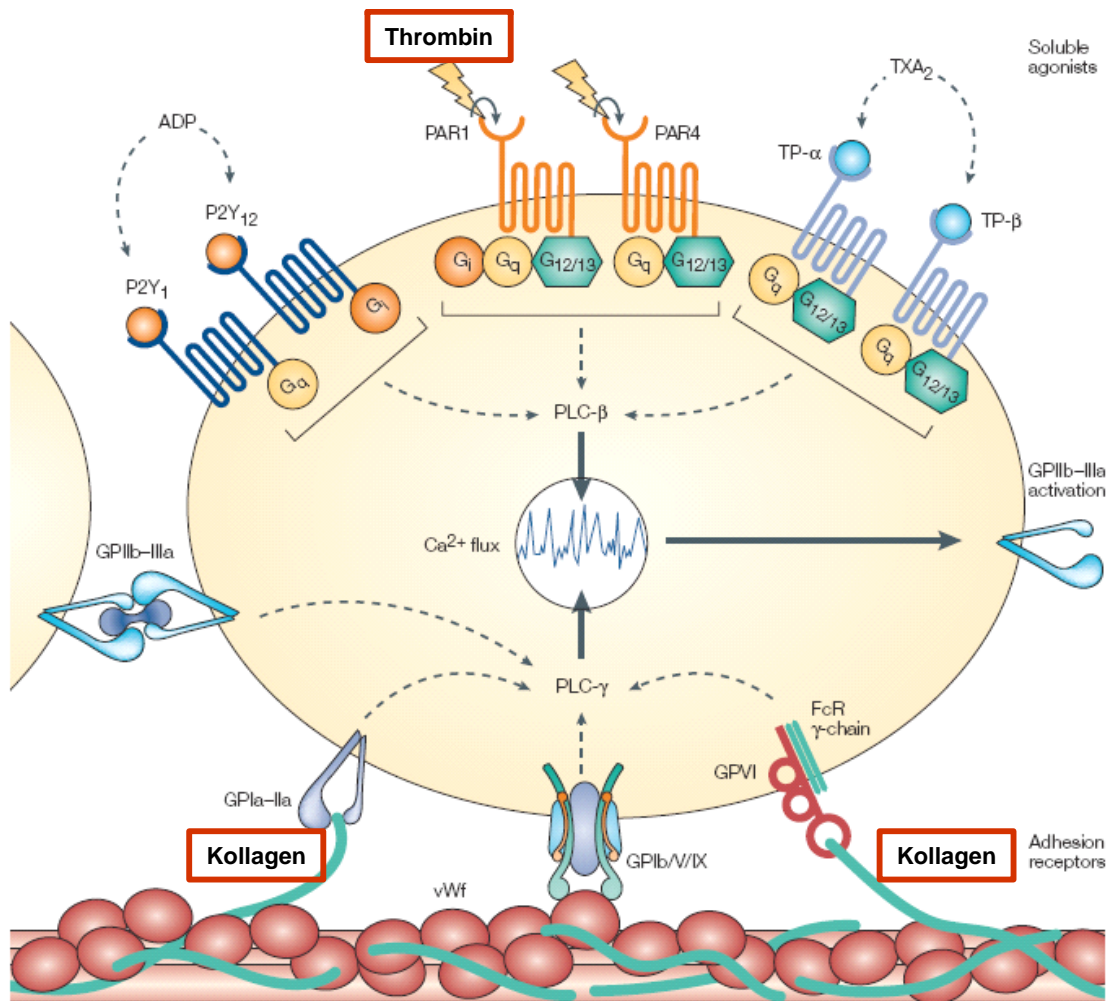


Abbildung 7: Aktivierung der Thrombozyten durch adhäsive Proteine und lösliche Agonisten.

Hier hervorgehoben (rote Rahmen) ist vor allem die Bindung von Kollagen der Gefäßwand an GPVI und GP Ia-IIa, sowie die Bindung von Thrombin an PAR-1 und PAR-4, da diese beiden Stoffe zu den potentesten Thrombozytenagonisten gehören. Alle löslichen Agonisten (Thrombin, ADP, TXA₂) sind G-Protein gekoppelt. Die Signalkaskaden führen zur Mobilisierung von Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum, und es kommt zur Exposition von Bindungsstellen für Fibrinogen (GP IIb-IIIa) auf der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten. GPIIb-IIIa: Rezeptor für viele Liganden, v.a. Fibrinogen, Fibrin, vWf, Fibronektin und CD40-Ligand. Modifiziert nach (Jackson and Schoenwaelder, 2003).

3 Fragestellung und Zielsetzung

Tissue factor (TF) und kollagene Strukturen gelten als die bedeutsamsten thrombogenen Substanzen in atherosklerotischen Plaques. Nach der Ruptur eines atherosklerotischen Plaques werden sowohl Thrombozyten, als auch das Blutgerinnungssystem aktiviert. Beide Mechanismen können zur arteriellen Thrombusbildung führen (siehe Abb. 8). Es herrschen kontroverse Meinungen darüber, ob nach der Ruptur eines atherosklerotischen Plaques die Aktivierung der Blutplättchen durch kollagene Plaque-Strukturen oder die Aktivierung der Gerinnungskaskade durch Plaque-TF im Vordergrund steht (Badimon et al., 1999; Mackman, 2004; Penz et al., 2005). Außerdem wurde in letzter Zeit zunehmend diskutiert, dass ein sog. *blood borne TF* und auch die Aktivierung von F XII des intrinsischen Gerinnungssystems einen wesentlichen Beitrag zur arteriellen Thrombusbildung leisten könnten (Furie and Furie, 2006a; Renne et al., 2005).

Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen der arteriellen Thrombusbildung induziert durch atherosklerotische Plaques sowohl unter statischen, als auch unter arteriellen Flussbedingungen zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere aufgedeckt werden, ob die Gerinnungsaktivierung durch Plaque-TF (Abb.8, a), oder die Thrombozytenaktivierung durch kollagene Plaque-Strukturen (Abb.8, b) in der initialen Phase der Thrombusbildung (0-15 min nach Kontakt des Plaque-Materials mit dem Blut) im Vordergrund steht. Außerdem sollte geklärt werden, ob diese Mechanismen getrennt voneinander ablaufen, oder zusammenhängen. Einerseits wäre eine sekundäre Aktivierung der Thrombozyten durch das während der Koagulation gebildete Thrombin denkbar (Abb.8, c). Dieses Thrombin könnte im Rahmen der Blutgerinnung durch drei verschiedene Möglichkeiten entstehen: Durch den Plaque-TF (Abb. 8, a), durch den *blood borne TF* (Abb. 8, f), oder durch das intrinsische Gerinnungssystem (Abb. 8, e). Andererseits könnten durch kollagene Plaque-Strukturen aktivierte Thrombozyten zur Katalyse der Gerinnungskaskade beitragen, z.B. durch die Exposition von PS auf deren Oberfläche (Abb.8, d).

Zur Klärung dieser Fragen sollte *in vitro* unter statischen und unter arteriellen Flussbedingungen ein Modell etabliert werden, das die klinische Situation *in vivo* mit der plötzlichen, gleichzeitigen Exposition thrombogener Substanzen des lipidreichen Plaque-Kerns und der fibrösen Kappe so gut wie möglich nachahmt. Hierzu sollte ein System gefunden werden, in dem *in vitro* sowohl die Plaque-stimulierte Gerinnungskaskade, als auch die Thrombozytenaktivierung und deren Interaktionen untersucht werden können.

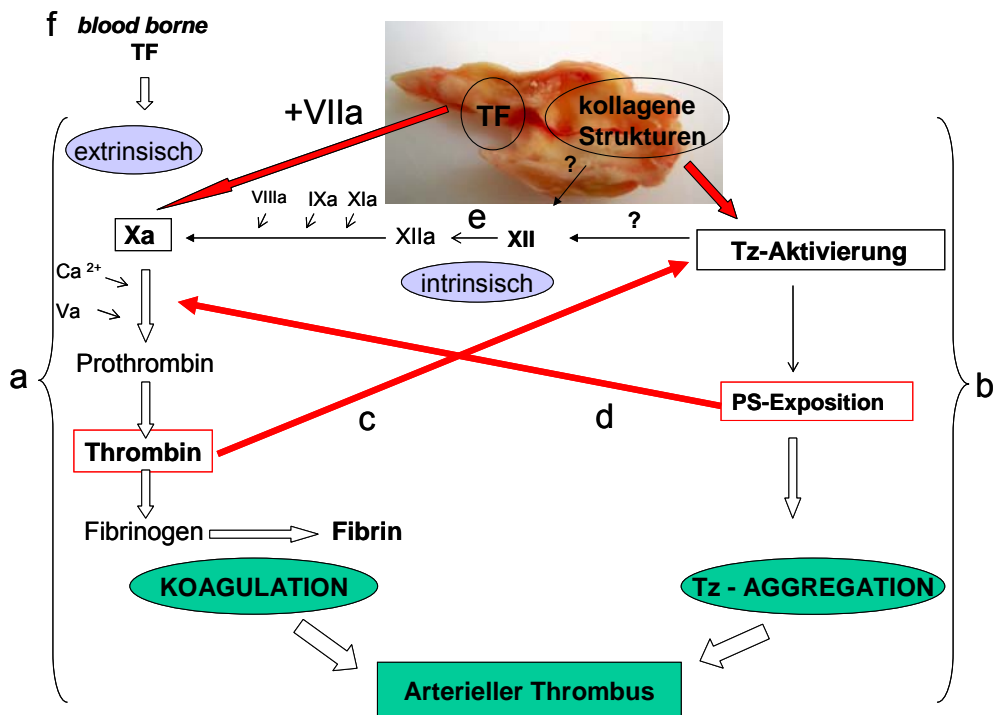


Abbildung 8: Untersuchung der Mechanismen der arteriellen Thrombusbildung durch die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques.

a Aktivierung der Blutgerinnung durch Plaque-TF. b Aktivierung von Thrombozyten durch kollagene Plaque-Strukturen. c sekundäre Aktivierung von Thrombozyten durch Thrombin. d Katalyse der Blutgerinnung durch PS-Exposition. Tz = Thrombozyten, TF = *Tissue factor*, PS = Phosphatidylserin.

4 Material und Methode

4.1 Material

4.1.1 Verwendete Chemikalien, Enzyme und Hemmsubstanzen

Albumin, bovin, > 97% fettsäurefrei	A-7511; Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Corn Trypsin Inhibitor	Calbiochem, Haemochrom Diagnostica, Essen, Dtl.
Fluorogenic Substrate Z-GGR-AMC	Bachem, Voisins-le-Bretonneux, Fr.
Formaldehyd-Lösung (37% w/v)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Humanes alpha-thrombin	EFS-Alsace, Strassbourg, Fr.
Gel/mount	Biomedica Corp., Ca, USA;
Hepes	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Hirudin	Pharmion, Celgene Cooperation, Dtl.
Kollagen	Horm, Nycomed Arzneimittel, Dtl.
Kollagenase Typ VII	aus Clostridium histolyticum; C-0773; Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Dtl.)
Mepacrin(Quinacrin Dihydrochlorid)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
niedermolekulares Heparin	LMWH, Clexane 40, Sanofi-Aventis dt. GmbH
Natriumcitrat-Dihydrat 3,13%	Eifelfango, Dtl.
Refludan®	Lepirudin oder rekombinantes Hirudin; Pharmion Ltd. Marburg, Deutschland)
Rekombiplastin	Instrumentation Laboratory, MA, USA
Rekombinantes GPVI, GPVI-Fc	Dimere extrazelluläre Domäne des GPVI-Rezeptors, fusioniert mit humaner Immunglobulin Fc-Domäne (Massberg et al., 2004)
Thromboplus Zählösung	Sarstedt, Dtl.
Trinatriumcitrat	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Tween 20	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Dtl.)
Zenon™ Alexa Fluor®488/546/647	Molecular Probes™ (Eugene, OR, USA)
Ziegen Serum	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Dtl.)

Zitronensäure, Monohydrat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Dtl)
Zitronensäure, Trinatriumsalz	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Dtl.)

Antikörper

Primärantikörper:

Anti GPVI (10B12)	anti-GPVI blockierende "single chain Fv antibody fragments (scFvs)", 10B12; (O'Connor et al., 2006)
Anti GPVI (5C4)	Fab-Fragmente eines monoklonalen anti-GPVI blockierenden Ratten IgG1 (Massberg et al., 2004)
Anti Kollagen Typ I	polyklonales anti-Kollagen Typ I Kaninchen IgG, Rockland (Gilbertsville, PA, USA)
Anti Kollagen Typ III	polyklonales anti-Kollagen Typ III Kaninchen IgG, Rockland (Gilbertsville, PA, USA)
Anti <i>Tissue factor</i>	4502, American Diagnostica

Sekundärantikörper:

Anti-Kaninchen IgG	aus Ziege, Alexa Fluor®488 gebunden (Molecular Probes™, Eugene, OR, USA) aus Ziege, HRP gebunden; Amersham Biosciences (Ismaning, Deutschland)
--------------------	--

IgG Isotypenkontrollen

Mäuse IgG1	MOPC-21; Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kaninchen IgG	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ratten IgG1	Cymbus Biotechnology Ltd. (Hampshire, NF, USA)
2D4	anti-HLA Kontrollantikörper für 10B12

4.1.2 Puffer und Lösungen

CaCl₂ Lösung

CaCl ₂	100mM
HEPES	10mM
pH	7,4

MgCl₂ Lösung

MgCl ₂	10mM
HEPES	10mM
pH	7,4

TESCA Puffer

TES	50mM
CaCl ₂	0,36mM
pH	7,4

Dialysepuffer

EDTA	1mM
Chloramphenicol	0,05%
pH	7,4

Working Puffer

HEPES	20mM
NaCl	0,14M
MgCl ₂	0,6mM
Albumin	5g/L
pH	7,35

Fluoreszenz Puffer

HEPES	20mM
Albumin	60mg/ml
CaCl ₂	12mM
Thrombin Substrate Z-Gly-Gly-Arg-AMC	2,5mM
pH	7,35

4.1.3 Geräte und Software

DVD-Rekorder	Panasonic, LQ-MD 800
Elektrolyt Analysator CRT-8	Nova biomedical GmbH, Rödermark, Dtl.
Lumineszenz-Aggregometer	Chronolog, Havertown, PA, USA
Neugebauer-Zählkammer	Paul-Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda, Königshofen, Dtl.)
S-VHS Videorekorder	Panasonic NV-HS930, Japan
ThermoLabsystems Ascent reader	Fluoreskan Ascent Labsystems, type 374, Helsinki, Finland
Thrombinoscope software	Synapse, Utrecht, Niederlande
Thrombelastograph	Rotem [®] -System, Pentapharm GmbH, München, Dtl.
Matrox Inspector software package (Version 8.0)	Matrox Electronic Systems Ltd., Kanada
Mikroskope	Axioscope 2 plus, Carl Zeiss, Jena, Dtl. Lichtmikroskop D 65323; Leitz (Wetzlar, Deutschland) Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM 510Meta; Zeiss (Jena, Deutschland)
Saugpumpe	Harvard Apparatus Inc., Boston, MA
Schwarz-weiß-CCD-Kamera	AVT-BC 71, AVT Horn, Aalen, Germany)
Farb-CCD-Kamera	Sony Exwave HAD, DSP, 3CCD, Color video camera, AVT Horn, Aalen, Germany
Zentrifugen	Biofuge pico, Omnifuge 2.ORS, Megafuge 1.ORS; Heraeus Sepatech (Osterode, Deutschland)

4.2 Methode

4.2.1 Gewinnung und Verarbeitung des Plaquematerials

Atherosklerotisches Plaque-Material wurde chirurgisch mit der Methode der Thrombendarterektomie (TEA) aus Patienten an einem Stück entnommen (Abb. 9). Dabei wurde streng darauf geachtet, dass keine gesunde media und adventitia mit herausgenommen wurden. Die Einverständniserklärung der Patienten, sowie die Genehmigung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München lagen jeweils vor.



Abbildung 9: Fotographie eines Plaque-Stücks nach Entnahme aus A. carotis interna durch TEA.

Zur Weiterverarbeitung der Plaques wurde auf zwei verschiedene Arten verfahren: Zu Beginn der Studie herrschten bei der Aufbereitungsmethode A der Plaques keine streng sterilen Bedingungen. So wurden die Plaques nach Entnahme in ein 10ml Plastikgefäß gegeben und bei 4°C gelagert. Erst am darauf folgenden Tag wurden sie mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Zur unsterilen Aufbereitung wurde die Gewebeproben langsam auf Eis aufgetaut, gewogen, mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend mit Glaspotter und Pistill in Dialysepuffer homogenisiert. Im Verlauf der Dissertationsarbeit wurden die Bedingungen zur Weiterverarbeitung bei der Aufbereitungsmethode B durch wesentliche Punkte verändert: 1) Die entnommenen Plaque-Stücke wurden noch im Operationssaal unmittelbar nach Entnahme mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. 2) Bei der Aufbereitung wurde auf streng sterile Bedingungen geachtet, indem ein steriles Skalpell zur Zerkleinerung, sowie sterile Glaspotter

und Pistille verwendet wurden. 3) Auf- und Abtau-Zyklen des Plaque-Gewebes, sowie der Plaque-Homogenate wurden vermieden:

Aufbereitungsmethode A	Aufbereitungsmethode B
Zwischenlagerung bei 4°C, Schockfrierung in flüssigem N ₂ und Lagerung bei -80°C am Tag nach Entnahme	Schockfrierung in flüssigem N ₂ und Lagerung bei -80°C sofort nach Entnahme
Unsterile Bedingungen bei Zerkleinerung und Homogenisierung Auf- und Abtauzyklen	Streng sterile Bedingungen bei Zerkleinerung und Homogenisierung Keine Auf- und Abtauzyklen

Die Endkonzentration des Plaque-Materials betrug bei beiden Aufbereitungsmethoden 50mg/ml oder 100mg/ml Feuchtgewicht. Bis zur Verwendung wurden die Homogenate zu je 1000µl bei -80°C aufbewahrt.

Die Experimente im Aggregometer (5.1) und im Rotem® (5.3) wurden sowohl mit Plaques der Aufbereitungsmethode A, als auch der Aufbereitungsmethode B durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Die Experimente im Thrombogram (5.2) und unter arteriellen Flussbedingungen (5.4) wurden ausschließlich mit Plaques der Aufbereitungsmethode B durchgeführt. Die Darstellung von TF in Plaque-Schnitten, bzw. Plaque-Homogenaten mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz erfolgte in Plaques der Aufbereitungsmethode A.

4.2.2 Blutentnahme und Antikoagulation

Das venöse Blut stammte aus cubitalen Venen von gesunden Probanden, die eine Medikamenten-Einnahme während der letzten zwei Wochen bzw. Dauermedikation verneinten. Die Einverständniserklärung der Spender nach dem Protokoll von Helsinki lag jeweils vor. Zur Blutentnahme wurde eine 19 G Butterfly-Nadel verwendet. Die ersten 2-3 ml Blut wurden verworfen und der Rest in je 50ml Plastikspritzen aufgezogen. Als Antikoagulantien wurde in den meisten Fällen 3,8%-ige Natriumcitrat-Lösung im Verhältnis 1:10 verwendet. In wenigen Experimenten wurde niedermolekulares Heparin (0,4 U) in Kombination mit CTI (32µg/ml) zur Antikoagulation verwendet. Die Antikoagulantien wirken unterschiedlich: Citrat komplexiert reversibel Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen, was durch eine anschließende Zugabe dieser Ionen rückgängig gemacht werden kann. Niedermolekulares Heparin bindet und aktiviert dadurch das körpereigene Glykoprotein Antithrombin III. Dieser

Komplex bindet sich irreversibel an aktivierte Gerinnungsfaktoren, bevorzugt an FXa und bewirkt so deren Inaktivierung. Daraus resultiert eine starke Reduktion der Bildung von Thrombin durch aktivierte Gerinnungsfaktoren. Es wurde eine sehr niedrige Konzentration (0,4 U) verwendet, um eine spontane Gerinnung durch Kontaktaktivierung innerhalb von 3 Stunden nach Blutabnahme zu verhindern, aber eine Aktivierung der Blutgerinnung durch rekombinanten TF und atherosklerotisches Plaque-Material zuzulassen.

Im Falle der Thrombogram-Messungen wurde ebenfalls mit einer 3,8%-igen Natriumcitrat-Lösung antikoaguliert. Hierbei wurde jedoch eine spezielle Technik der Blutentnahme angewandt: Das Blut wurde mit einer dickeren (1,2mm) Nadel (nicht Butterfly) entnommen. Die ersten 2-3 ml wurden ebenfalls verworfen und man ließ das Blut dann direkt in ein offenes Plastik-Gefäß laufen. Dadurch sollte eine eventuelle Thrombinbildung schon während der Blutentnahme vermieden werden. Bei jedem Experiment wurden die Messungen innerhalb der ersten vier Stunden nach Blutabnahme erhoben.

4.2.3 Gewinnung von plättchenreichem und plättchenarmen Plasma

Zur Herstellung von PRP für Aggregometer und Thrombelastographie Versuche wurde das Citrat-Blut 20 min bei 180 x g bei 24°C zentrifugiert. Das nun von Erythrozyten und Leukozyten getrennte Plasma wurde vorsichtig abpipettiert. Um Plättchenarmes Plasma zu generieren, wurde das PRP 10 min bei 1000 x g bei 24°C zentrifugiert und das Plasma vom Thrombozytenüberstand durch Pipettierung getrennt. Die Anzahl der Thrombozyten betrug stets zwischen 300.000 und 400.000 pro µl Plasma. Dies wurde mit Hilfe einer Thromboplus Zählösung (Neugebauer-Zählkammer) bestimmt.

Für Messungen mit dem Thrombogram wurde PRP durch 15-minütige Zentrifugation von antikoaguliertem Citrat-Blut bei 250g bei 25°C hergestellt und vom Überstand abpipettiert. Im Anschluss daran wurde die Thrombozytenzahl des PRP bestimmt. Weiterhin wurde plättchenfreies Plasma (PFP) aus dem gewonnenen PRP hergestellt. Dazu wurde das PRP zuerst 5 min bei 4°C mit 6000g und anschließend noch einmal für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Danach konnten in diesem Plasma keine Thrombozyten mehr gemessen werden. Ein Teil dieses PFP wurde verwendet, um die Thrombozytenzahl im PRP auf 300.000/µl bzw. 150.000/µl einzustellen.

4.2.4 Recalcifizierung von Citrat-PPP, -PRP und -Blut

Die physiologische Konzentrationen im menschlichen Plasma für CaCl_2 und MgCl_2 betragen 1,2 mM und 0,5-0,7 mM. Nach Antikoagulation des Blutes mit 3,8%-iger Natriumcitrat-Lösung im Verhältnis 1:10 wird ein großer Anteil dieser divalenten Kationen reversibel komplexiert, um eine Blutgerinnung zu verhindern. Um festzustellen, wie groß die benötigten Mengen an CaCl_2 und MgCl_2 waren, die zum Citrat-Plasma dazugegeben werden mussten, um die physiologischen Konzentrationen wiederherzustellen, verwendeten wir den Elektrolyt Analysator CRT-8. Mit Hilfe dieses Gerätes konnte im Citrat-PPP die Konzentrationen von Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , sowie der pH Wert gemessen werden. Nach der Zugabe von 12 mM CaCl_2 , sowie 0,1mM MgCl_2 konnten durchschnittlich folgende Werte erzielt werden: für CaCl_2 $1,23 \pm 0,08$ mmol/L und für MgCl_2 $0,51 \pm 0,23$ mmol/L. Der pH lag bei 7,4 und die Konzentration von Kalium und Natrium blieben unbeeinflusst. Somit wurden für die Experimente im Aggregometer (5.1), im Thrombogram (5.2), sowie im Rotem® Thrombelastograph (5.3) 12mM CaCl_2 und 0,1mM MgCl_2 zum PPP, PRP oder Citratblut gegeben.

Für die Versuche in der Flusskammer wurden die benötigten Mengen an CaCl_2 und MgCl_2 thrombelastographisch ermittelt (siehe 5.4.2.1).

4.2.5 Hemmung der Kontaktaktivierung mittels Corn Trypsin Inhibitor

Bei *in vitro* Versuchen kann nach Einstellung physiologischer CaCl_2 - und MgCl_2 -Konzentrationen im PPP, PRP oder Vollblut das intrinsische Gerinnungssystem durch Kontaktaktivierung in Gang gesetzt werden. Hierbei wird der FXII durch negativ geladene Oberflächen aktiviert. Um diesen Vorgang selektiv zu unterbinden, verwendeten wir *Corn Trypsin Inhibitor* (CTI) in einer Konzentration von 32 $\mu\text{g/ml}$. Es wurde 2 min vor Zugabe der Agonisten zum PPP, PRP oder Vollblut zugegeben.

4.2.6 Stimulation mit Plaque- Kollagen- und TF im PPP, PRP und Blut

4.2.6.1 Messung von Aggregation und Gerinnungszeit des PRP im Aggregometer

Mit Hilfe eines Zweikanal-Aggregometers wurden turbidimetrisch der thrombozytäre Gestaltwandel (*shape change*), die Zeitspanne, bis dieser eintrat (*lag time*) und die unmittelbar darauf folgende Thrombozytenaggregation im PRP bestimmt. Im Falle einer CaCl_2 und MgCl_2 Zugabe konnte auch die Zeitdauer bis zur Gerinnungsbildung (*clot, clotting time*) gemessen werden.

Das Prinzip der Messung beruht auf einem durch das PRP durchtretenden Lichtstrahl, der auf eine Photozelle auftrifft. Dabei wird die Lichttransmission der Probe bestimmt. Ein angeschlossener optischer Schreiber dokumentiert zunächst die Basaloszillation, die dadurch entsteht, dass die Suspension diskoider Thrombozyten kontinuierlich durch einen Magnetührstab gerührt wird. Nach Zugabe eines Thrombozyten-Agonisten nimmt die Lichttransmission im Rahmen des thrombozytären Gestaltwandels zunächst ab. Bei der darauf folgenden Aggregatbildung sinkt die Dichte des PRP aufgrund der Abnahme der einzelnen korpuskulären Teilchen in der Suspension, was zu einer Zunahme der Lichttransmission führt. Die eintretende Koagulation führt durch die Koagelbildung am Magnetührstab zu dessen Blockade, sowie zu einer weiteren, plötzlich massiven Zunahme der Lichttransmission. Dies äußerte sich optisch in einer quer zur Aggregationskurve verlaufenden Linie.

Eine Aggregometer-Küvette enthielt PRP (346µl) das zunächst für 1 Minute bei 37°C inkubiert wurde und anschließend kontinuierlich durch einen Magnetstab mit einer Geschwindigkeit von 1100 rpm gerührt wurde, ebenfalls bei 37°C. Bei der Arbeit mit CTI (32µg/ml) wurde das PRP zusätzlich für 2 min gerührt. CaCl₂ (12mM) und MgCl₂ (0,1mM) wurden immer unmittelbar vor Zugabe der jeweiligen Agonisten zugegeben. Als Agonisten dienten homogenisiertes atherosklerotisches Plaque-Material (1,25 mg/ml), fibrilläres Kollagen 2,5 µg/ml, oder rekombinanter TF (0,1ng/ml, 0,5 ng/ml). Zur Analyse der Ergebnisse wurde die Aggregation nach 1,5 min und/oder nach 3 min am maximalen Schreibausschlag in cm gemessen. Die maximale Aggregation stellte sich ab ungefähr 3 Minuten ein, oder, im Falle einer CaCl₂- und MgCl₂- Zugabe, kurz vor dem Eintreten der Gerinnung.

Da die Absolutwerte der thrombozytären Aggregation spenderabhängig stark variierten, wurde bei jedem Experiment durch 2,5 µg/ml Kollagen eine maximale Thrombozytenaggregation zu den oben genannten Zeitpunkten ermittelt. Die Werte wurden zu den einzelnen Plaque- und TF-induzierten Antworten in Verhältnis gesetzt (in % der Kollagen induzierten Agg.% nach 1,5 min und 3 min).

4.2.6.2 Bestimmung der Thrombinbildung im Thrombogram

Die Thrombin Messung im PRP erlaubt eine Beobachtung der Interaktionen zwischen den Thrombozyten und dem Gerinnungssystem (Hemker et al., 2002). Die Bestimmung der Thrombinbildung erfolgte in dem *Microtiter plate fluorometer* (Fluoroskan Ascent, Type 374). Für die Messungen wurde eine Platte verwendet, die 96 Eindellungen (*wells*) enthielt. In jedes *well* wurde 80 µl PRP oder PFP gegeben und 20 µl eines *Working Puffers* (HEPES 20mM, BSA 5g/L, MgCl₂ 0,6mM, ph 7,35), in dem der jeweilige Agonist enthalten war (2,5µg/ml bzw. 10µg/ml Kollagen, 1,48 mg Feuchtgewicht/ml Plaque Homogenat, 0,1ng/ml rekombinanter

TF). Die Thrombinbildung wurde durch die Zugabe von weiteren 20 µl eines Fluoreszenz Puffers (20mmol/L HEPES, 60mg/ml bovines Serum Albumin, CaCl₂ 12mM pH 7,35) gestartet. Dieser enthielt das fluoreszierende Thrombin Substrat Z-Gly-Gly-Arg-AMC.

In jedem *well* wurde alle 30 sec die Fluoreszenz gemessen (Emissionsfilter bei 460nm und Excitationsfilter bei 390nm). In den Messungen mit CTI wurde das PRP mit 32µg/ml CTI zwei Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran wurden je 80µl in die entsprechenden *wells* auf der Messplatte gegeben. Jedes Experiment wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt, d.h. jeder Agonist wurde zusammen mit dem *Working* Puffer in 3 verschiedene *wells* gegeben. Die resultierenden Kurven bildeten somit Mittelwerte aus drei gleichzeitig gelaufenen Experimenten. Um die Konzentrationen des entstehenden Thrombins zu berechnen, wurden die gemessenen Thrombin Mengen mittels Computer (Thrombinoscope software; Synapse, Utrecht, Niederlande) in Beziehung zu einer bekannten Menge an Thrombin gesetzt, die bei jedem Experiment ebenfalls in dreifacher Ausführung zu PFP gegeben und gemessen wurde.

Die Messdauer betrug 120 min. Durch die Kopplung des Fluorometers (=ThermoLabsystems Ascent reader, Labsystems, Helsinki, Finland) an die Thrombinoscope software (Synapse, Utrecht, the Netherlands) erhielt man die charakteristischen Thrombinbildungs-Kurven (Thrombogram). Diese sind durch vier verschiedene Parameter charakterisiert. Die *lag time* entspricht der Zeitspanne, bis messbare Mengen von Thrombin gebildet werden. Da Fibrin erscheint, sobald Spuren von Thrombin gebildet werden, spiegelt die *lag time* auch die Gerinnungszeit (bzw. die im Rotem[®] gemessene clotting time) wider (Hemker, 2002). Die Thrombin-Menge nimmt rasch zu und erreicht schließlich einen Gipfel, welcher durch den Messparameter *peak* wiedergespiegelt wird. Dieser *peak* repräsentiert die maximale Geschwindigkeit der Thrombinbildung und reflektiert die maximale Aktivität der Prothrombinase, die erreicht werden kann (Leon et al., 2003). Die Zeit von Beginn der Messung bis zum Erreichen dieses *peaks* ist die *time to peak (tpeak)*. Schließlich wird noch das Endogene Thrombin Potential (etp) bestimmt, was der Fläche unter der Kurve und damit der Gesamtmenge des generierten aktiven Thrombins entspricht (nMxmin). Das etp ist ein weniger sensibler Parameter als die *peak thrombin*, da es über eine Zeitspanne von 2 Stunden gemessen wird, in der das entstandene Thrombin akkumuliert (Hemker et al., 2000; Leon et al., 2003).

4.2.6.3 Messung der Fibrinbildung mittels Thrombelastographie

Diese Messungen wurden mit Hilfe der Rotations-Thrombelastographie (Rotem[®], Pentapharm, München, Deutschland) durchgeführt. Hierbei können während des Ablaufens

des Gerinnungsprozesses die Geschwindigkeit der Gerinnselformung und die Gerinnselfestigkeit bestimmt werden.

Zunächst wurden die jeweiligen Agonisten (2,5µg/ml bzw. 12,5µg/ml Kollagen, 0,1ng/ml TF oder 1,6 mg/ml homogenisiertes atherosklerotisches Plaque-Material), sowie 12mM CaCl₂, 0,1mM MgCl₂ und 32µg/ml CTI in zylindrischen Einwegküvetten vorgelegt, die auf 37°C vorgewärmt waren. Anschließend wurden die Küvetten mit Citrat-PPP, -PRP, oder -Blut auf 300µl aufgefüllt und der gesamte Inhalt mit einer Pipette kurz durchmischt. Die Messung wurde danach sofort gestartet, indem die Küvetten in das Rotem[®]-Gerät überführt wurden.. Durch das Starten des Geräts begann der in die Probe getauchte Kolben im 4,75° Winkel vor und zurück zu rotieren. In dem schmalen Abstand zwischen dem Kolben und der Küvette (1mm) befand sich PPP, PRP oder Blut. Sobald die Gerinnung aktiviert wurde, entstand Fibrin, welches sich an den Kolben anlagerte. Dadurch wurde die Rotation des Kolbens vermindert, was zu einer Änderung der Amplitude der Rotation führte. Diese Amplitudenänderung, gemessen während einer bestimmten Zeitspanne, wurde als Thrombelastogramm kontinuierlich über die Zeit an einem an das Gerät angeschlossenen Computer abgebildet. Die charakteristischen Parameter, die dabei angegeben und abgebildet werden, sind die *clotting time* (CT, Zeitspanne von Beginn der Messung bis zum Beginn der Gerinnung), die *clot formation time* (CFT, Zeit von Beginn der Gerinnung, bis die auf dem Thrombelastogramm abgebildete Amplitude 20mm beträgt) und die *maximum clot firmness* (MCF, Festigkeit des Koagels) (Schroeder et al., 2001).

4.2.6.4 Hemmung von *Tissue factor* und kollagenen Plaque-Strukturen

Zur Hemmung des sich im Plaque befindlichen TF wurde homogenisiertes atherosklerotisches Plaque-Material mit einem polyklonalen TF-Ak (1µg) für 10 min bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge eines polyklonalen Immunglobulins aus Kaninchen (rabbit IgG, rIgG) verwendet.

In anderen Experimenten wurde Hirudin (100 Units/ml) verwendet, um die TF- induzierte Thrombinbildung zu blockieren. Hierbei wurde das PPP, PRP oder Vollblut 1 Minute lang bei 37°C mit Hirudin inkubiert, bevor CaCl₂, MgCl₂, CTI und die jeweiligen Agonisten hinzu gegeben wurden.

Zur Untersuchung der Rolle von Plaque-Kollagen für die Plaque-induzierte Aggregation und Gerinnung wurden verschiedene Versuchsansätze durchgeführt: 1) Zur Blockade des thrombozytären GPVI Rezeptors wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet: Ratten-GPVI-AK 5C4 (Kontrolle: ratten Immunglobulin, rat IgG) (Massberg et al., 2002) und der Mäuse GPVI- AK 10B12 (Kontrolle: 2D4, anti-HLA Typ A2) (Smethurst et al., 2004). Die

Antikörper wurden in einer Konzentration von 10µg/ml (5C4) bzw. 50µg/ml (2D4) für 5 Minuten bei 37°C mit PRP oder Blut inkubiert. Für die Flussversuche wurden 7,5 ml Blut mit 200µg/ml 10B12 bzw. 2D4 für 15 min bei 37°C inkubiert.

2) Bei der Verwendung von rekombinantem GPVI-Fc wurde homogenisiertes Plaque-Material (10µl von 50mg/ml Feuchtgewicht oder 5µl von 100mg/ml Feuchtgewicht) für 30 Minuten bei Raumtemperatur zusammen mit rekombinantem GPVI-Fc oder dem entsprechenden Fc-Kontrollprotein (je 16µg) inkubiert und das Inkubat im Anschluss daran zum PRP oder Vollblut pipettiert.

3) Um die im Plaque vorhandenen Kollagene Typ I und III durch Antikörper zu hemmen, wurde das Plaque-Material (5 oder 10µl) für 10 min bei 37°C zusammen mit Kollagen Typ I und Kollagen Typ III Antikörpern (je 5-10µg) inkubiert. Als Kontrolle hierfür dienten polyklonales Kaninchen-Immunglobulin (rabbit IgG, 10 oder 20µl).

4) Weiter wurde das gesamte Kollagen im Plaques durch das Enzym Kollagenase verdaut. Zu diesen Zwecken wurde eine Kollagenase mit hohen *Collagen digesting units* (1900/mg) verwendet und in 32ml 50mM TES-Puffer, sowie 0.36mM CaCl₂ in destilliertem Wasser gelöst, pH 7,4 (=TESCA). Bis zur Verwendung wurde das Enzym in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für den Verdau wurden 20µg Kollagen oder 20µl Plaque zusammen mit 0,6µg Kollagenase in 50µl TESCA Puffer (50mM TES, 0,36mM CaCl₂) und 9mM CaCl₂ für 24h bei 37°C im Eppendorf Thermomixer bei starkem Schütteln über Nacht inkubiert. Als Kontroll-Inkubation wurde die entsprechende Plaque Menge mit 12µl TESCA Puffer und 18µl einer 25 mM CaCl₂ Lösung auf analoge Weise inkubiert. Nach der Inkubation wurden für Aggregometer Versuche je 12µl dieses Gemisches zum PRP gegeben, für Versuche im Rotem[®] Thrombelastograph wurden 9µl pipettiert, was einer Plaque-Suspension von 5µl und einer CaCl₂-Konzentration von 3,7mM (final) entsprach. Zur Einstellung des Plasmas auf 12mM CaCl₂ waren folglich nur 8,3mM CaCl₂ notwendig. Die MgCl₂-Konzentration blieb unverändert.

Zur gemeinsamen Inaktivierung von TF und Kollagen, bzw. GPVI wurde ebenfalls auf verschiedene Arten verfahren: 1) Wurde die GPVI-Hemmung mit der TF-Hemmung kombiniert, wurde das Plaque Homogenat wie oben beschrieben mit dem TF-AK oder dem entsprechenden Immunglobulin inkubiert und zu Beginn der jeweiligen Messung zu PRP bzw. Vollblut gegeben, das vorher 5 Minuten bei 37°C mit dem GPVI-AK oder der Kontrolle inkubiert worden war. 2) In anderen Fällen wurde zuerst das Plasma 5 Minuten mit dem GPVI AK inkubiert und anschließend Hirudin (100U/ml) zugegeben, um die TF-induzierte Thrombinbildung zu verhindern. 3) In weiteren Experimenten wurde zuerst über Nacht das in den atherosklerotischen Plaques enthaltene Kollagen mit dem Enzym Kollagenase wie oben

beschrieben verdaut. 12 μ l (Aggregometer) bzw. 9 μ l (Rotem[®]) dieses Plaque-Materials wurden am nächsten Tag 10 Minuten vor der Zugabe zum Plasma mit je 2 μ l TF-AK bei 37°C im Thermoblock bei leichtem Schütteln inkubiert, um den im Plaque enthaltenen TF zu blockieren. Als Kontrolle wurde hierbei entweder die Kollagenase Kontrollinkubation mit TF-AK inkubiert oder mit dem Kaninchen-Immunglobulin (rabbit IgG). 4) Schließlich wurde noch eine Kollagen I- und III- Hemmung mit einer TF-Hemmung kombiniert. Hierfür wurde 5 μ l Plaque Homogenat wie oben beschrieben bei Raumtemperatur mit Antikörpern gegen Kollagen Typ I und III inkubiert. Anschließend wurde zu diesem Gemisch 5 μ l TF-AK gegeben und die Proben für weitere 10 min bei 37°C im Thermoblock bei leichtem Schütteln inkubiert, und im Anschluss zum PRP gegeben.

4.2.7 Plaque-induzierte Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen

4.2.7.1 Beschichtung von Glasdeckplättchen mit Plaque-Homogenaten, fibrillärem Kollagen und TF

Homogenate aus atherosklerotischem Plaque-Material (5mg/ml) wurde mit PBS im Verhältnis 1:20 oder 1:60 verdünnt. Ein Tropfen von 30 μ l enthielt dann 0,15 mg (1:20 Verdünnung) oder 0,05 mg (1:60 Verdünnung) Plaque Feuchtgewicht und wurde in die Mitte eines mit Aceton und Isopropanol vorgereinigten Glasdeckplättchens pipettiert. Die Lösung enthielt außerdem 15 μ M (0,1%) fettsäurefreies Albumin. Bei der Beschichtung der Glasdeckplättchen mit Kollagen wurde fibrilläres Kollagen (Horm-Chemie, Nykomed) in einer Konzentration von 0,005mg/ml ebenfalls in albuminhaltigem PBS (0,1%) gelöst und anschließend zur Beschichtung der Glasdeckplättchen verwendet. Die Glasdeckplättchen wurden auch mit Rekombinantem TF-Protein in lipidreicher Lösung (0,1ng und 0,3 ng), ebenfalls zusammen mit albuminhaltigem PBS (0,1%), beschichtet.

Nach Antrocknung des Tropfens waren sowohl Plaque-Material, als auch Kollagen oder TF stabil auf der Oberfläche befestigt. Im Anschluss daran wurden die beschichteten Glasdeckplättchen mit einer Albuminlösung (0,3%) rehydratisiert und über Nacht bei 4°C gelagert, um unspezifischen Bindungen entgegenzuwirken. Flussexperimente wurden immer innerhalb von 24 Stunden nach Beschichtung der Glasdeckplättchen durchgeführt

4.2.7.2 Hemmung des Plaque-TF und der Kollagen-GPVI-Interaktion

Für die Hemmung des Plaque-TF wurde das Homogenat (1,5 μ l, Feuchtgewicht 100 μ g/ml) für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit TF-AK (1 μ g) oder als Negativkontrolle mit rabbit IgG

(Kaninchen gegen Mensch, 1µg) inkubiert und nach Verdünnung mit Albuminlösung (0,1%) auf das Glasplättchen gegeben.

Zur Blockade der Kollagen-GPVI Interaktion wurde das atherosklerotische Plaque-Homogenat (3µl, Feuchtgewicht 50µg/ml) für 30 min bei Raumtemperatur mit rekombinantem GPVI-Fc (16µg) oder Fc-Kontrollprotein (16µg) inkubiert, anschließend mit Albuminlösung (0,1%) verdünnt und auf Glasdeckplättchen pipettiert.

Zur GPVI-Hemmung wurden je 7,5µl Citratblut mit 200µg/ml GPVI-AK (10B12), oder gleicher Menge Kontrollprotein (2D4) für 15 min bei 37°C inkubiert.

4.2.7.3 Flusskammern

Wir arbeiteten mit zwei unterschiedlichen Flusskammer-Systemen, die sich in der Bohrung des Zulauf-Kanals für das Blut unterschieden (siehe unten). Bei beiden Kammern diente ein rechteckiger Plexiglaskörper als Boden der Flusskammer. Auf dessen Oberseite wurde eine 125 µm dicke Silikonmembran aufgebracht, die die Länge (31mm), die Breite (3mm) und die Höhe (0,125mm) der Flusskammer und damit des mit Blut durchströmten Gebiets vorgab. Die beschichteten Glasdeckplättchen (siehe 4.2.7.1) bildeten jeweils die Deckplatte der Flusskammer. Durch Verschraubung des Plexiglaskörpers mit einer Metallplatte, wurden die einzelnen Bestandteile der Flusskammer zusammengehalten.

Bei beiden Kammern wurden die Zu- und Ablaufschläuche aus Polyethylen für das Blut durch runde Bohrungen in den Seitenwänden des Plexiglaskörpers mit diesem verbunden. Das Blut wurde immer aus einem 50ml Polypropylen-Vorratsbehälter mittels einer Pumpe (Harvard Apparatus Inc., Boston, MA) durch die Flusskammer gesaugt. Die Volumenströme wurden bei jedem Experiment so eingestellt, dass in der Flusskammer eine Wandscherrate von 1500/s erzeugt wurde.

Bei den Versuchen mit heparinisiertem Blut (siehe 5.4.1) waren die Bohrungen für den Zu- und Ablauf des Blutes in den Seitenwänden des Plexiglaskörpers durch je eine rechtwinklig verlaufende Bohrung (Zu- und Ablauf-Kanal, 5mm Durchmesser) mit der Flusskammer verbunden. Dadurch wurde das Blut über einen rechten Winkel durch den Plexiglaskörper in die Flusskammer ein- und ausgeleitet.

Für die Experimente mit recalcifiziertem Citrat-Blut (siehe 5.4.2) wurde eine neue Flusskammer konstruiert, um eine Voraktivierung des Blutes vor dem Einlauf in die Flusskammer zu minimieren. Hierfür verlief die Bohrung des Zulauf-Kanals zur Flusskammer nicht rechtwinklig, sondern schräg (Anstiegswinkel 60°). Außerdem betrug der Durchmesser

dieser schrägen Bohrung lediglich 0,5 mm. Zusätzlich wurden sehr dünne Polyethylen-Zulaufschläuche verwendet, die nach jedem Experiment erneuert wurden.

4.2.7.4 Messungen mit heparinisierem oder recalcifiziertem Citrat-Blut

Das Blut für die Flussversuche mit heparinisierem Blut (siehe 5.4.1) wurde kurz vor Versuchbeginn Blut aus der Cubitalvene eines gesunden Probanden mit einer 50 ml Spritze abgenommen, die CTI (32µg/ml) und LMWH (0,4 Einheiten/ml Blut) enthielt. Mit 0,4 Einheiten niedermolekularem Heparin wurde eine Menge gewählt, bei der eine spontane Blutgerinnung innerhalb der ersten drei Stunden nach Blutabnahme verhindert wurde, aber eine Aktivierung der Gerinnungskaskade durch atherosklerotisches Plaque-Material nach wie vor möglich war. Zusätzlich wurde CTI verwendet, um eine Thrombinbildung durch die Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems zu verhindern.

Bei den Versuchen mit recalcifiziertem Citrat-Blut wurden jeweils 50 ml Blut, ebenfalls aus einer Cubitalvene abgenommen und mit Natriumcitrat (3,8%, 1:10) antikoaguliert. Für jedes Flussexperiment von 15 Minuten Dauer, wurden 7,5 ml Blut benötigt. Diese Menge wurde zur Inhibition der Kontaktaktivierung zusammen mit CTI (32µg/ml) in ein Vorrats-Gefäß aus Polypropylen gegeben. Vor Beginn jeder Messung wurde der Fluoreszenzfarbstoff Mepacrin (10µM) dem Blut beigemischt, um die Thrombozyten zu markieren. Außerdem wurde unmittelbar vor der Perfusion zur Aufhebung der Citratwirkung CaCl_2 (8mM) und MgCl_2 (0,1mM) zu den 7,5 ml Blut zugegeben und kurz durchmischt.

4.2.7.5 Echtzeit-Darstellung der Thrombusbildung mittels Videomikroskopie

Die Perfusionskammer war auf dem Tisch eines Mikroskops (Axioscope 2 plus, Carl Zeiss, Germany) so montiert, dass während der Durchströmung eine gleichzeitige Videodokumentation und Beobachtung der thrombozytären Adhäsion, Aggregation und die Fibrinbildung durchgeführt werden konnte.

Die Thrombozytenadhäsion und Aggregation wurde bei den Versuchen mit heparinisierem Blut mittels Hellfeldmikroskopie dargestellt. Bei den Versuchen mit recalcifiziertem Citrat-Blut ermöglichte die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffs Mepacrin, dass die Thrombozytenadhäsion und -aggregation mittels Fluoreszenzmikroskopie oder der Kombination aus Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie gesehen werden konnte. Die Darstellung der feinen Fibrinstrukturen erfolgte stets mittels Hellfeld. Mit Hilfe der Reflektionsinterferenzkontrastmikroskopie konnte insbesondere die zusätzliche Darstellung des immobilisierten Plaque-Materials auf den Glasdeckplättchen, sowie von „spread platelets“ und Fibrinfasern auf dem Plaque am Boden der Thrombozytenaggregate dargestellt werden. Gearbeitet wurde mit einem 40x oder einem

60x Immersions-Objektiv und einer optischen Nachvergrößerung von 1,0. Für die Darstellung von Fibrin wurde die optische Nachvergrößerung auf 1,6x erhöht.

Bei den Experimenten mit heparinisiertem Blut wurde die Ablagerung der Thrombozyten mit einer Pulnix CCD Kamera (Aquisitionsrate: 25 Bildern/sec) aufgenommen und mit einem S-VHS Videorekorder (Panasonic NV-HS930, Japan) aufgezeichnet.

Die Aufnahmen bei den Experimenten mit recalcifiziertem Citrat-Blut erfolgte mittels einer schwarz-weiß-CCD-Kamera (AVT-BC 71, AVT Horn, Aalen, Germany) oder einer Farb-CCD-Kamera (Sony Exwave HAD, DSP, 3CCD, Color video camera, AVT Horn, Aalen, Germany) (Aquisitionsrate: jeweils 25 Bilder/sec). Aufgezeichnet wurden die Aufnahmen mit Hilfe eines DVD-Rekorders (Panasonic, LQ-MD 800).

4.2.7.6 Bildanalyse und Auswertung

Die Analyse und die Auswertung der aufgenommenen Bilder erfolgte mit Hilfe des off-line Programms Matrox Inspector software package (Version 8.0, Matrox Electronic Systems Ltd., Kanada).

In den Versuchen mit heparinisiertem Blut wurden während der ersten 5 Minuten eines jeden Flussexperiments jeweils 10 verschiedene Gesichtsfelder der mit Plaque beschichteten und Blut beströmten Oberfläche aufgenommen. Es wurden jeweils etwa fünf verschiedene Bilder zum Zeitpunkt $t = 3\text{min}$ und $t = 5\text{min}$ ausgewertet, und dabei die Anzahl der Aggregate und die durchschnittliche Aggregatfläche zu den genannten Zeitpunkten quantitativ ermittelt. Für die graphische Darstellung der Werte wurde in jedem einzelnen Gesichtsfeld die Thrombozyten-Aggregatfläche gemessen und mit der Anzahl der Thrombozyten-Aggregate in diesem Gesichtsfeld multipliziert (Thrombozyten-Aggregatfläche x Anzahl Aggregate).

Bei den Experimenten mit recalcifiziertem Citrat-Blut wurden je 10 verschiedene Gesichtsfelder in zwei verschiedenen Bildebenen während der ersten 5 min aufgenommen und ausgewertet. Die Auswertung der Aggregation erfolgte, indem in jedem Gesichtsfeld sowohl die mit Plaque beschichteten Areale (durch geringere Fluoreszenz auf dem Boden der Flusskammer), als auch die Fläche der darauf abgelagerten thrombozytären Aggregate (stärkere Fluoreszenz oberhalb der Plaque-Fläche) gemessen. Der Quotient zwischen Aggregat-Fläche und Plaque-Fläche wurde berechnet (%Tz-Aggregat pro Plaque-Fläche). Die Fibrinbildung wurde durch den Zeitpunkt des ersten Auftretens von Fibrinfasern gemessen.

4.2.8 Nachweis von TF im Plaque Homogenat mittels Immunfluoreszenz

Zum Nachweis von Plaque-TF mittels Immunfluoreszenz wurden Plaque-Homogenate (5mg/ml Feuchtgewicht) in Albumin (fettsäurefrei, 0,1%) auf Glasplättchen einer *Labtech*-Kammer aufgetragen und vollständig angetrocknet. Anschließend wurden die Homogenate zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen für 20 min mit Ziegenerum (5%) blockiert und danach dreimal je fünf Minuten mit PBS gewaschen. Als primärer Antikörper wurde TF-AK (Nr. 4509, American Diagnostica) oder eine entsprechende Konzentration Kaninchen IgG 1:100 in Albumin (fettsäurefrei, 0,3%) zusammen mit Tween 20 in PBS gelöst (pH 7,4). Diese Lösung wurde auf die Plaque-Homogenate in den *Labtech*-Kammern aufgetragen, so dass diese vollständig mit Flüssigkeit bedeckt waren und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Plaque-Homogenate nach drei Waschschritten für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtschutz mit dem sekundären anti Kaninchen IgG (1:200 in PBS; Molecular Probes™, Eugene, OR, USA) inkubiert, welches an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor®488 gekoppelt war. Nach erneuten Waschvorgängen wurden die Präparate durch eine zehninütige Inkubation mit 0,16% Formaldehyd-haltigem PHEM-Puffer fixiert und mit Gel/Mount eingedeckt. Die Untersuchung der Präparate erfolgte mit Hilfe des konfokalen Laser Scanning Fluoreszenzmikroskops SDM 510Meta (Zeiss, Jena, Deutschland).

4.2.9 Nachweis von TF in Plaqueschnitten mittels Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Lokalisation von TF-positiven Strukturen in Plaque Schnitten, wurden die atherosklerotischen Plaques nach Entnahme durch TEA mit einer 4%igen Formaldehyd-Lösung (pH=7,0) fixiert und in Paraffin eingebettet. Längs- und Querschnitte des Paraffinblocks (3µm) wurden mit Hilfe eines Weichschnittmikrotoms hergestellt und über Nacht bei 48°C auf Objektträgern ausgehärtet. Anschließend wurden diese deparaffinisiert und in einem Citrat Puffer (pH 6,0) für 20 min in der Mikrowelle erhitzt. Durch die fünfminütige Inkubation der Schnitte mit 3%igem H₂O₂ wurde die endogene Peroxidase inhibiert. Nach dreimaligem fünfminütigem Waschen der Schnitte mit PBS wurden die Plaque Schnitte in einer feuchten Kammer mit dem primären monoklonalen Antikörper (TF-AK 1:50 in 1% BSA in PBS, American Diagnostica, 4509) oder mit der gleichen Konzentration Kaninchen IgG für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschriff wurden die Schnitte mit biotinyliertem anti Kaninchen IgG (1:200 in PBS; ABC Elite Kit, Vektor Laboratories; Burlingame, CA, USA) inkubiert. Die Braunfärbung der TF-positiven Strukturen in den Plaque Schnitten erfolgte mit Hilfe der Streptavidin-Horseradish Peroxidase Technik (DakoChem Mate Detection kit; Dako, Hamburg, Deutschland). durch die Zugabe von DAB (0,1% 3'3'-Diaminobenzidin). Die Gegenfärbung der Zellkerne in blau mit Hematoxylin

erfolgte zur Identifizierung der verschiedenen Zelltypen anhand ihrer Form und Größe (Brandl et al., 1997).

4.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Excel 2003 (Microsoft). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardabweichung (MW \pm SA) oder in einem Fall als Mittelwerte und *standard error of the mean* (MW \pm SEM) angegeben (siehe 5.4.2.5). Die Ermittlung des Signifikanzniveaus erfolgte mittels *paired and unpaired student-t-test*.

5 Ergebnisse

5.1 Rolle der Plaque-, TF- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation und Gerinnung: Messungen im plättchenreichen Plasma im Aggregometer

5.1.1 Rolle der CaCl_2 - und MgCl_2 - Zugabe

Die Verwendung von Citrat als Antikoagulans bewirkt die Komplexbildung zweiwertiger Ionen im Plasma, wodurch keine Gerinnung mehr stattfinden kann. Zur Wiederherstellung der physiologischen CaCl_2 und MgCl_2 Konzentrationen in dem mit Citrat antikoagulierem Plasma wurden die divalenten Kationen CaCl_2 und MgCl_2 unmittelbar vor Zugabe des Agonisten zum Plasma gegeben. Mit Hilfe eines Elektrolytanalysators wurden zuvor die benötigten CaCl_2 - und MgCl_2 -Konzentrationen im PPP titriert. Bei der Verwendung von 12 mM CaCl_2 und 0,1mM MgCl_2 ergaben sich für CaCl_2 physiologische Werte von $1,23 \pm 0,08$ mmol/L und für MgCl_2 physiologische Werte von $0,51 \pm 0,23$ mmol/L (MW \pm SA, n= 5). Der pH Wert im Plasma war nach Ionenzugabe unverändert bei 7,4.

Die Zugabe von CaCl_2 und MgCl_2 zu PRP ergab nach 15 ± 4 Minuten eine Spontangerinnung mit vorausgehendem thrombozytärem Formwandel (Abnahme der Lichttransmission) und Thrombozytenaggregation (Zunahme der Lichttransmission; Abb. 10 A, MW \pm SA, n=4). Dies wurde auf die bekanntermaßen *in vitro* stattfindende Kontaktaktivierung zurückgeführt, die unter CaCl_2 und MgCl_2 Zugabe bei negativ geladenen Oberflächen durch die Aktivierung des FXII des intrinsischen Gerinnungssystems gestartet wird. Diese Oberflächenaktivierung konnte durch die spezifische Hemmung des FXII des intrinsischen Gerinnungssystems mittels CTI blockiert werden (Abb. 9 B, MW \pm SA, n= 8).

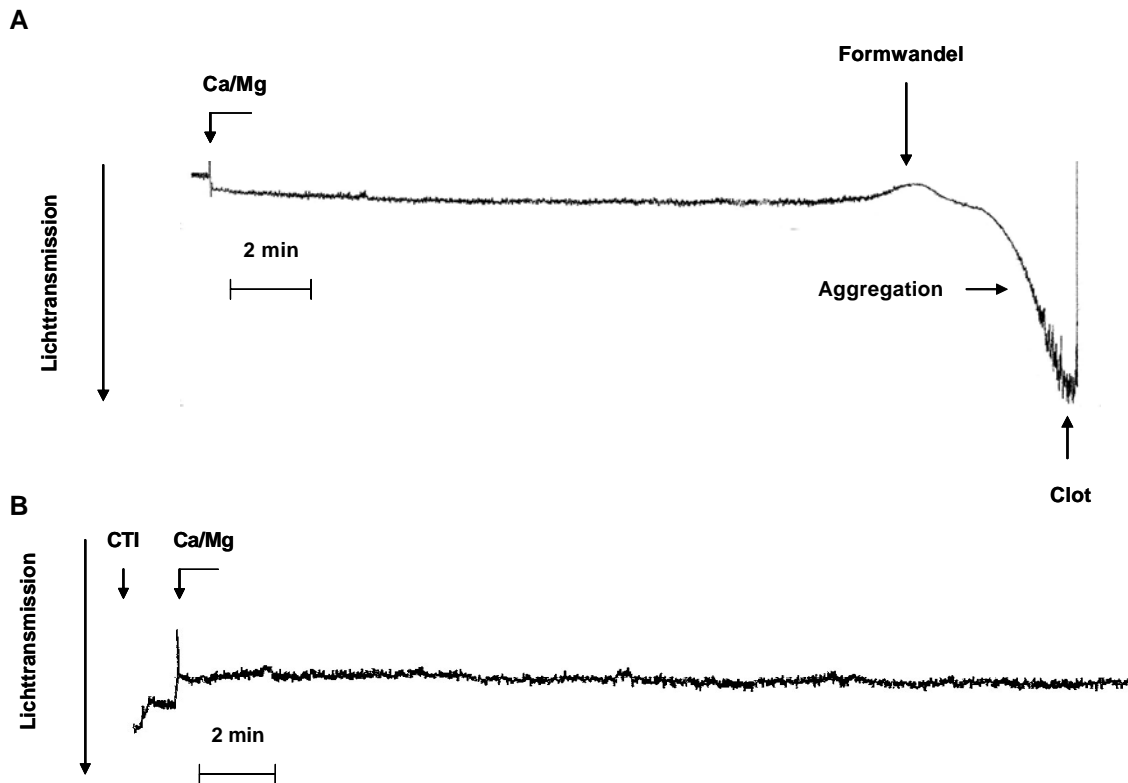


Abbildung 10: Aggregationskurven. Auswirkungen der Zugabe der divalenten Kationen (CaCl_2 und MgCl_2) zum gerührten PRP.

A Induktion einer späten Spontangerinnung durch die Zugabe von CaCl_2 (12mM) und MgCl_2 (0,1mM) zum PRP (300 000 Tz/ μl). Die Kurve ist repräsentativ für n=5 Experimente. Der Formwandel der Thrombozyten ist durch die Abnahme der Lichttransmission, die Thrombozytenaggregation durch die Zunahme der Lichttransmission im Aggregometer sichtbar. Die Gerinnung (clot) wurde durch einen abrupten Abbruch der Aggregationskurve in Form eines senkrechten Strichs ersichtlich. **B** Keine Spontangerinnung bei Zugabe von CTI. PRP wurde zwei Minuten unter Rühren mit CTI (32 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Danach wurden CaCl_2 (12mM) und MgCl_2 (0,1mM) dazu gegeben. Die Kurve ist repräsentativ für n=8 Experimente.

Es wurden sowohl Plaques der Aufbereitungsmethode A und B verwendet (siehe Material und Methode). Die Ergebnisse dieser Plaques unterschieden sich im Aggregometer nicht voneinander, weswegen die Ergebnisse zusammengefasst wurden. Sowohl Plaque (5 μl , 1,25 mg/ml Feuchtgewicht), als auch Kollagen (2,5 $\mu\text{g/ml}$) induzierten nach einer kurzen Zeitspanne (*lag time*) von wenigen Sekunden eine Thrombozytenaggregation. Kinetik und Ausmaß der thrombozytären Aktivierung durch atherosklerotisches Plaque-Material und Kollagen ähnelten einander sehr stark (Abb.11 A1, B1). Die Zugabe der divalenten Kationen hatte keinen Einfluss auf die Kinetik der Plaque- bzw. Kollagen-induzierte Aggregation (Abb.11 A2,B2). Jedoch wurde durch die Ionenzugabe die Plaque- und Kollagen-abhängige Gerinnung ermöglicht, wobei sich ein Gerinnsel um den Magnetrührstab bildete. Dies war auf dem Papier dadurch zu erkennen, dass die Aggregationskurve abrupt senkrecht nach oben verlief (clot, Abb.11 A2).

Die Gerinnungszeiten nach Kollagen-Zugabe waren $5,9 \pm 1,1$ min (MW \pm SA, n=6). Atherosklerotisches Plaque-Material verursachte etwas früher ($4,7 \pm 0,9$ min, MW \pm SA, n=6) die Gerinnelbildung, was jedoch nicht signifikant kürzer war, als die Kollagen-induzierte Zeit bis zur Gerinnung ($p=0,638$).

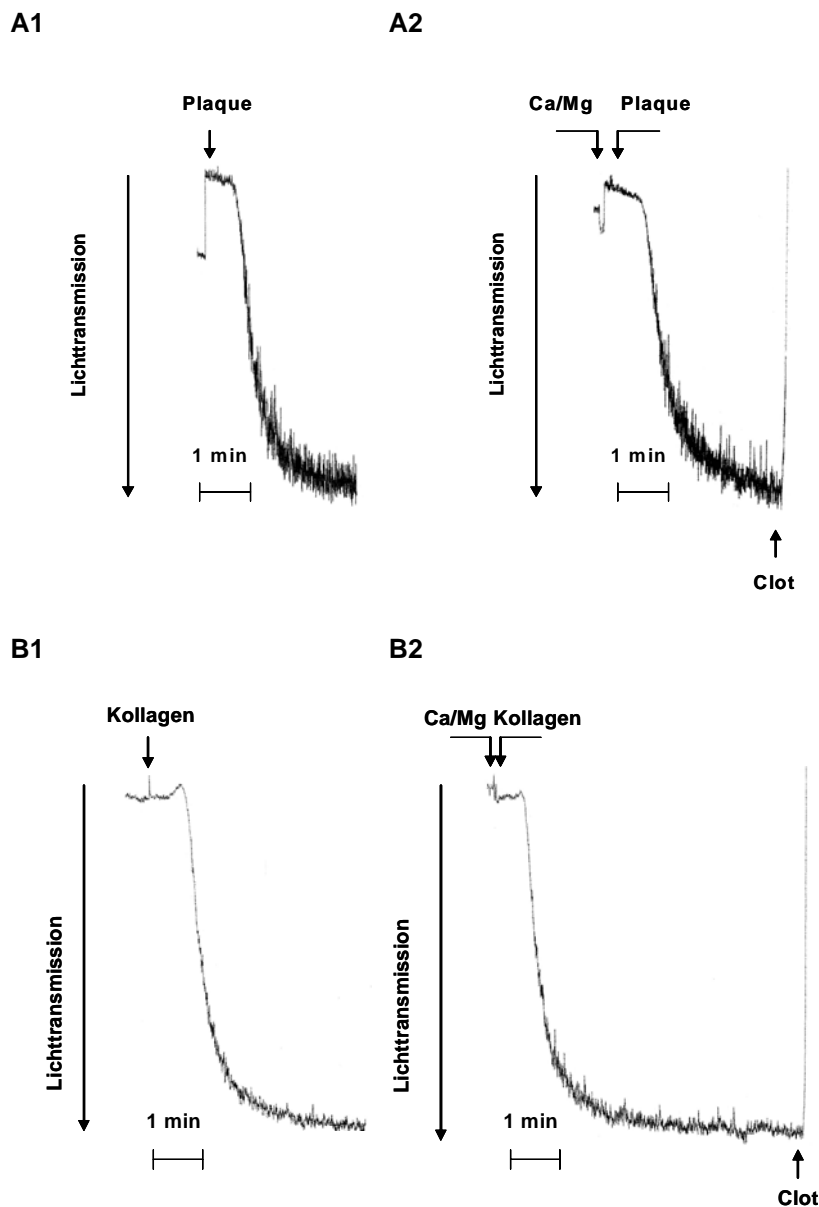
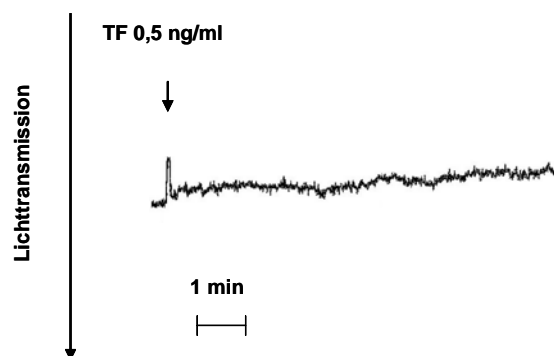


Abbildung 11: Einfluss der Zugabe der divalenten Kationen auf die Plaque- und Kollagen-induzierte Aggregation und Gerinnelbildung im PRP.

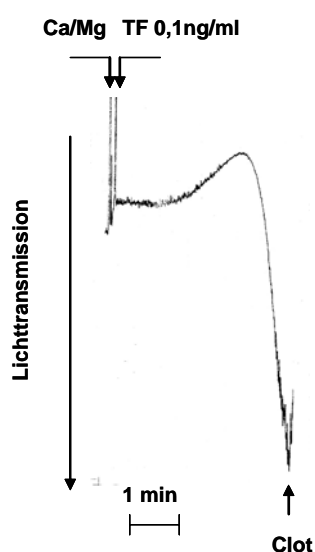
A1 Plaque-induzierte Aggregation. Zu Beginn jeder Messung wurde atherosklerotisches Plaque-Material (1,25mg/ml Feuchtgewicht) dazugegeben. **A2** Plaque-induzierte Aggregation und Gerinnung (clot) nach Zugabe von CaCl_2 (12mM) und MgCl_2 (0,1mM). **B1** Kollagen-induzierte Aggregation. Zugabe von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ fibrilläres Kollagens. **B2** Kollagen induzierte Aggregation und Gerinnung (clot) nach Zugabe der divalenten Kationen. Die Kurven sind repräsentativ für n=6 Experimente.

TF erzeugte ohne Ionenzugabe weder einen Gestaltwandel, noch Aggregation oder Gerinnung (Abb.12 A). Erst nach Zugabe von CaCl_2 und MgCl_2 zeigte sich eine TF- induzierte Thrombozytenaggregation, die jedoch weniger ausgeprägt war, als die Kollagen- und Plaque-induzierte Aggregation und sogleich in eine Gerinnung überging (Abb.12). Die TF-induzierten Gerinnungszeiten waren umso kürzer, je höher dessen Konzentration war: Für 0,05 ng/ml TF $6,3 \pm 1,4$ min (nicht dargestellt), für 0,1ng/ml TF $3,2 \pm 0,5$ min (Abb. 12 B) und für 0,5 ng/ml TF $1,5 \pm 0,6$ min (Abb. 12 C).

A



B



C

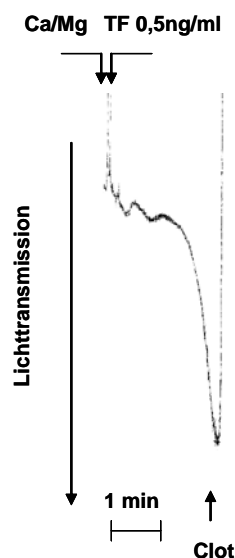


Abbildung 12: Einfluss der Zugabe der divalenten Kationen auf die TF-induzierte Aggregation im PRP.

A Keine TF-induzierte Aggregation oder Gerinnung in Abwesenheit der divalenten Kationen über einen Zeitraum von 10 min. **B** TF (0,1ng/ml) erzeugt Thrombozytenaggregation und plasmatische Gerinnung in Anwesenheit der divalenten Kationen CaCl_2 (12mM) und MgCl_2 (0,1mM). **C** Höhere TF-Konzentrationen (0,5ng/ml) beschleunigte die Zeitspanne bis zur Thrombozytenaggregation und bis zur plasmatischen Gerinnung. Die Kurven sind repräsentativ für n=3 Experimente.

5.1.2 Einfluss der Blockade des Faktors XII des Gerinnungssystems

Nach den oben gezeigten Beobachtungen stellte sich die Frage, ob die Plaque-, Kollagen- und TF-induzierte Gerinnung auf eine Aktivierung des intrinsischen oder des extrinsischen Systems der Koagulation zurückzuführen war. Um dies zu klären, wurde CTI zur Hemmung des Faktors XII der intrinsischen Gerinnungskaskade verwendet. Ausgewertet wurde der Einfluss von CTI auf die Plaque- Kollagen- und TF-induzierte Thrombozytenaggregation und auf die Gerinnungszeit. Nach Blockade des intrinsischen Gerinnungssystems war sowohl in An-, als auch in Abwesenheit der divalenten Kationen die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation geringgradig reduziert, jedoch nicht signifikant. Auch die Plaque-induzierte Gerinnungszeit war nicht signifikant verändert (Tab.1).

Tabelle 1: Einfluss von CTI auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation und Gerinnung in An- und Abwesenheit von divalenten Kationen.

Aggregationswerte sind in % der dreiminütigen und maximalen Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit Plaque alleine (5µl, 1,25 mg/ml Feuchtgewicht) angegeben. CTI (32µg/ml) wurde 2 min vor Zugabe der divalenten Kationen (CaCl₂ 12mM und MgCl₂ 0,1mM) und dem Plaque zum PRP gegeben und unter Rühren bei 37°C inkubiert. 100% Aggregation = Lichttransmission ohne CTI. MW ± SA, n=6.

Stimulus	Agg % 3 min	Agg % max	Gerinnungszeit [min]
Plaque	100	100	-
Plaque + CTI	92 ± 7	87 ± 17	-
Plaque + Ca +Mg	100	100	4,3 ± 2,1
Plaque + Ca + Mg + CTI	95 ± 10	97 ± 8	4,7 ± 2,5

Die TF-induzierte Gerinnungszeit und Thrombozytenaggregation wurde ebenso nicht signifikant durch die Blockade des intrinsischen Gerinnungssystems beeinflusst (Tab.2).

Tabelle 2: Einfluss von CTI auf die TF induzierte Aggregation und Gerinnungszeit nach CaCl₂ und MgCl₂ Zugabe.

Aggregationswerte sind in % der maximalen Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit TF (0,1 ng/ml) nach CaCl₂/MgCl₂ -Zugabe ohne CTI angegeben. MW ± SA, n=3.

Stimulus	Agg % max	Gerinnungszeit [min]
TF + Ca/Mg	100	3,3 ± 0,5
TF + Ca/Mg + CTI	112 ± 31	3,3 ± 0,5

Folglich spielte im Falle der TF- und Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation und Gerinnung die Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems *in vitro* keine Rolle.

Wenn Kollagen als Stimulus verwendet wurde, reduzierte sich die Thrombozytenaggregation lediglich bei CaCl_2 - und MgCl_2 -Zugabe geringfügig um 8%, während die Gerinnungszeit hoch signifikant ca. 2,8-fach verlängert wurde (Tab.3, $***p < 0,005$) in Anwesenheit von CTI.

Tabelle 3: Einfluss von CTI auf die Kollagen- induzierte Aggregation und Gerinnungszeit mit und ohne CaCl_2 und MgCl_2 Zugabe.

Aggregationswerte sind in % der dreiminütigen und maximalen Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit Kollagen alleine (2,5 $\mu\text{g/ml}$) angegeben. Die Kollagen Menge (2,5 $\mu\text{g/ml}$) entspricht der Menge an Kollagen, die eine maximale thrombozytäre Aktivierung hervorruft. MW \pm SA, n=6. * $p < 0,001$, ** $p = 0,009$, *** $p < 0,005$ im Vergleich zu Kollagen + Ca/Mg ohne CTI.

Stimulus	Agg % 3 min	Agg % max	Gerinnungszeit [min]
Kollagen	100	100	-
Kollagen + CTI	98 \pm 3	98 \pm 3	-
Kollagen + Ca/Mg	100	100	5,9 \pm 1,1
Kollagen + Ca/Mg + CTI	92 \pm 4*	92 \pm 6**	16,3 \pm 5,3***

Die graphische Darstellung der Gerinnungszeiten aller Versuche in Anwesenheit von CaCl_2 und MgCl_2 fasst den Einfluss von CTI auf die Plaque-, TF-, und Kollagen-induzierte Gerinnungszeit zusammen (Abb.13). Die Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems durch FXII spielte keine Rolle bei der der Plaque- und TF- induzierten Gerinnung, jedoch bei der durch Kollagen.

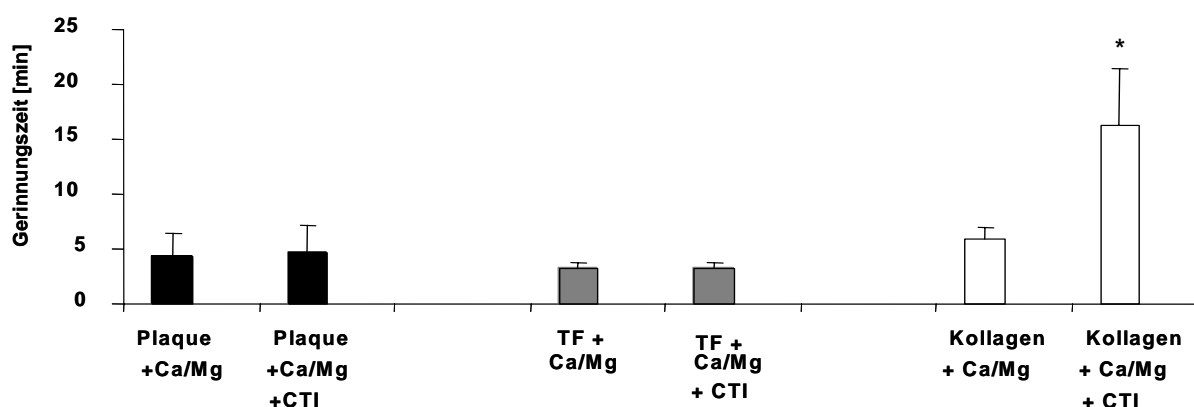


Abbildung 13: Einfluss der Blockade des FXII mittels CTI auf die Plaque-, TF-, und Kollagen-induzierte Gerinnungszeit im Aggregometer nach Zugabe von CaCl_2 und MgCl_2 .

PRP wurde vor Zugabe der divalenten Kationen und der Agonisten für 2 min bei 37°C mit oder ohne CTI inkubiert und mit dem Magnetrührstab gerührt. Anschließend wurden CaCl_2 und MgCl_2 , sowie Plaque (5 μl) zugegeben. Die Werte sind als MW \pm SA dargestellt, n=6. * $p < 0,005$ im Vergleich zu Kollagen + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.

5.1.3 Einfluss der Thrombin-Hemmung mittels Hirudin

Um festzustellen, wie sich eine Thrombin-Hemmung in Anwesenheit von CaCl_2 und MgCl_2 auf die Plaque- Kollagen- und TF-induzierte Aggregation und Gerinnung auswirkte, wurde PRP jeweils 2 min vor Zugabe des jeweiligen Agonisten mit 100U/ml Hirudin bei 37°C inkubiert. Hirudin bewirkt eine direkte Hemmung von Thrombin, unmittelbar, nachdem dieses entsteht (Lüllmann et al., 2003). Die durch Plaque-, TF- und Kollagen-induzierte Gerinnung wurde durch direkte Thrombin-Hemmung mittels Hirudin in allen drei Fällen auf >10 min verzögert (Tab 4). Nach Stimulation mit atherosklerotischem Plaque-Material bewirkte Hirudin interessanterweise eine statistisch signifikante Reduktion der Aggregation nach 3 min um durchschnittlich 15% (Tab.4, MW \pm SA, n=4, *p<0,005) und eine Reduktion der maximalen Aggregation um durchschnittlich 13 % (MW \pm SA, n=4, **p=0,013).

Tabelle 4: Einfluss der Thrombin-Hemmung mittels Hirudin auf die Plaque-, Kollagen-, und TF- induzierte Aggregation und Gerinnung in Anwesenheit von CaCl_2 und MgCl_2 ohne CTI.

Aggregationswerte sind in % der dreiminütigen und maximalen Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit Plaque (5 μ l, 1,25 mg/ml Feuchtgewicht) angegeben MW \pm SD; Plaque (5 μ l, 1,25mg/ml Feuchtgewicht): n= 4, Kollagen (2,5 μ g/ml): n=2, TF (0,1ng/ml): n=2. * p<0,005, ** p=0,013 im Vergleich zu Plaque ohne Hirudin.

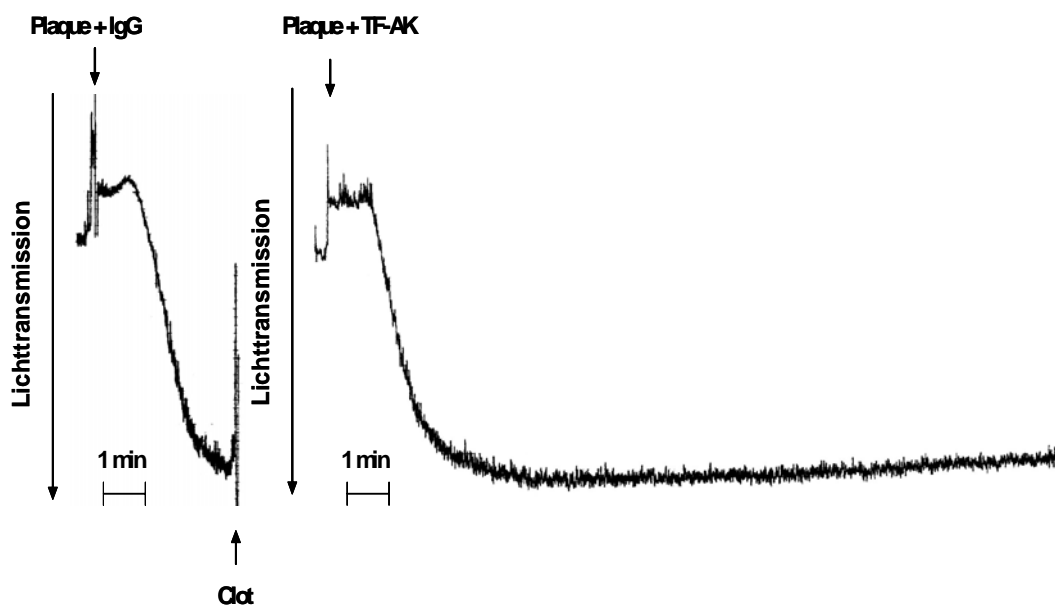
Stimulus	Agg % 3 min	Agg % max	Gerinnungszeit in min
Plaque	100	100	6,5 \pm 3
Plaque + Hirudin	85 \pm 4*	87 \pm 17**	>10
Kollagen	100	100	7 5,2
Kollagen + Hirudin	100 93	97 94	>10 >10
TF	-	100	1
TF + Hirudin	-	0	>10

Bei Kollagen-Zugabe zeigte sich hinsichtlich der Aggregation kein Einfluss von Hirudin. Die TF- induzierte Aggregation wurde vollständig inhibiert.

5.1.4 Einfluss der TF- Blockade im Plaque

Wir untersuchten, inwieweit sich die Blockade des sich im Plaque befindlichen TF auf die thrombozytäre Aggregation und auf die Gerinnungszeit auswirkte. Wir inkubierten das atherosklerotische Plaque-Homogenat für 10 min mit einem polyklonalen Antikörper gegen TF oder mit entsprechender Konzentration Kaninchen-Immunglobulin G (rabbit IgG). Die Menge des verwendeten TF-AK (1 μ g) war ausreichend, um die Gerinnungsaktivierung von TF (0,1-0,5ng/ml PRP) zu hemmen (Kurven nicht gezeigt). Aus der Abbildung 14 und Tabelle 5 wird deutlich, dass die Thrombozytenaggregation unbeeinflusst blieb, die Gerinnungszeit jedoch deutlich von $5,7 \pm 1,6$ min auf $10 \pm 1,6$ min herausgezögert wurde (MW \pm SA, n=4, *p<0,003). Folglich schien TF keine Rolle für die Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation zu spielen, jedoch maßgeblich für die Plaque-induzierte Gerinnung verantwortlich zu sein.

A



B

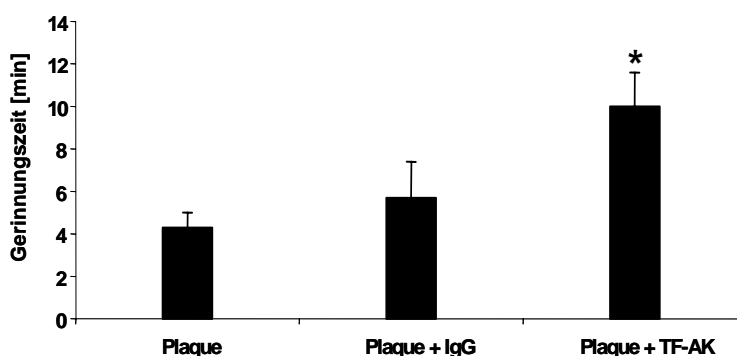


Abbildung 14: Einfluss von TF-AK auf die Plaque-induzierte Gerinnungszeit in Anwesenheit von divalenten Kationen.

Plaque-Homogenate (5µl, 1,25mg/ml Feuchtgewicht) wurden 10 min bei 37°C mit TFAK (1µl) bzw. rabbit IgG (1µl) inkubiert und anschließend unmittelbar nach CaCl₂ (12mM) und MgCl₂ (0,1mM) Zugabe zum PRP gegeben. MW ± SA, n=4. * p<0,005 im Vergleich zu Plaque mit IgG Isotypenkontrolle aus Kaninchen (IgG). **A** Aggregationskurven repräsentativ für n=4 Experimente (4 Plaques, 4 Blutspender). Die Zugabe der divalenten Kationen ist nicht gekennzeichnet. **B** Graphische Darstellung: Einfluss von TF-AK bzw. IgG Isotypenkontrolle aus Kaninchen (rabbit IgG) auf die Plaque-induzierte Gerinnungszeit im Aggregometer.

Tabelle 5: Einfluss von TF-AK auf die Plaque-induzierte Aggregation und Gerinnungszeit in Anwesenheit von divalenten Kationen ohne CTI.

Aggregationswerte sind in % der dreiminütigen und maximalen Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit Plaque alleine (5µl, 1,25 mg/ml Feuchtgewicht) angegeben. MW ± SA, n=4, *p<0,003 im Vergleich zu Plaque mit IgG Isotypenkontrolle aus Kaninchen (rabbit IgG).

Stimulus	Agg % 3 min	Agg % max	Gerinnungszeit [min]
Plaque	100	100	4,3 ± 0,7
Plaque + rabbit IgG	90 ± 14	93 ± 10	5,7 ± 1,6
Plaque + TF-AK	92 ± 6	92 ± 10	10 ± 1,6*

Auch in Anwesenheit von CTI zögerte die Blockade des TF im Plaque die Gerinnungszeit statistisch signifikant auf über 10 min hinaus. Die Thrombozytenaggregation war ebenfalls nicht beeinflusst (Tab.6). Die verbesserte Hemmung der Plaque-induzierten Gerinnung durch TF-Antikörper in Anwesenheit von CTI ist wahrscheinlich dadurch zu begründen, dass durch die Verwendung von CTI zusätzlich auch die intrinsische Gerinnung blockiert wurde.

Tabelle 6: Einfluss von TF-AK auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation und Gerinnung in Anwesenheit von CTI und divalenten Kationen.

Aggregationswerte sind in % der dreiminütigen und maximalen Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit Plaque (5µl, 1,25 mg/ml Feuchtgewicht) in Anwesenheit von CaCl₂/MgCl₂ und CTI angegeben. MW ± SA, n=4, *p<0,001 im Vergleich zur Kontrolle mit IgG Isotypenkontrolle aus Kaninchen (Plaque + rabbit IgG).

Stimulus	Agg % 3 min	Agg % max	Gerinnungszeit [min]
Plaque + CTI	100	100	4,7± 1,4
Plaque + rabbit IgG + CTI	93± 9	92 ± 5	5,0 ± 1,7
Plaque + TF-AK + CTI	96± 23	87± 10	>10*

5.1.5 Rolle von kollagenen Strukturen im Plaque und GPVI-Aktivierung

5.1.5.1 GPVI Hemmung

Entsprechend der aktuellen Literatur ist das GPVI auf der Oberfläche von Thrombozyten einer der wichtigsten Rezeptoren zur Vermittlung der Kollagen-induzierten thrombozytären Aggregation und Thrombus-Bildung (Nieswandt and Watson, 2003). Auch wir konnten in früheren Arbeiten zeigen, dass kollagene Strukturen in atherosklerotischem Plaque-Material durch die Aktivierung von GPVI zur thrombozytären Aggregation führen und die Thrombus-Bildung stimulieren (Penz et al., 2005). Unter Antikoagulations-Bedingungen mit Citrat war die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation durch Blockierung des GPVI-Rezeptors mit Antikörpern (10B12, n=3; 5C4, n=4) und GPVI-Fc (n=2) vollständig gehemmt.

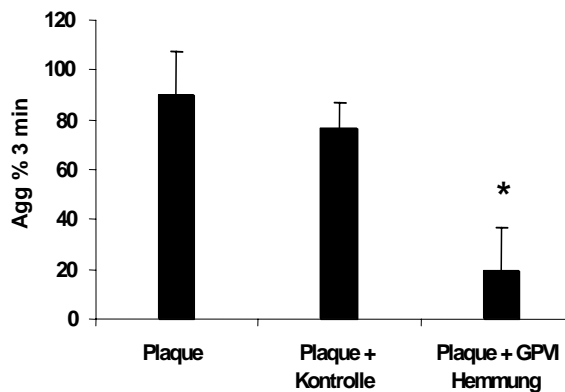
Im Gegensatz zu Antikoagulations-Bedingungen konnte in Anwesenheit von CaCl₂ und MgCl₂ nach Plaque-Zugabe die Thrombozytenaggregation weder durch GPVI-AK, noch durch Plaque-Vorbehandlung mit GPVI-Fc vollständig inhibiert werden (Tab.7, Abb.15). Die Experimente wurden als GPVI Hemmung zusammengefasst, da sich die GPVI-AK und das GPVI-Fc in ihrer Wirkung nicht unterschieden. Die frühe Aggregation nach 3 min wurde im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen statistisch signifikant von 76% ± 11% auf 19% ± 19% vermindert (MW ± SA, n=4, p=0,021). Die maximale Aggregation kurz vor Gerinnung blieb jedoch nahezu unbeeinflusst (Abb. 15 A,B). Die durch das Plaque-Homogenat initiierte Zeit bis zur Gerinnung wurde durch die GPVI-Hemmung interessanterweise statistisch signifikant um 1,3 min verlängert (Tab.7).

Tabelle 7: Einfluss von GPVI Hemmung auf die thrombozytäre Aggregation und Gerinnungszeit in Anwesenheit von divalenten Kationen ohne CTI.

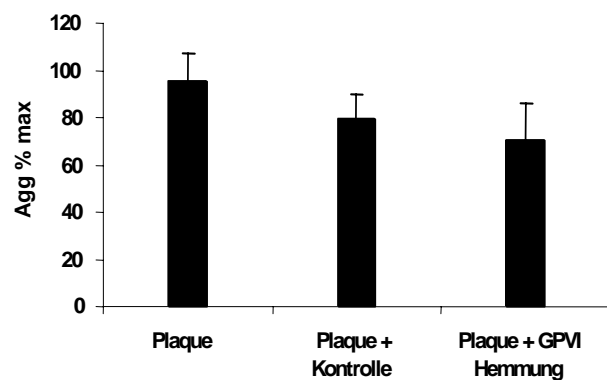
Aggregations- und Gerinnungsdaten der Plaque-induzierten Tz-Aggregation in % der Aggregation nach Kollagen-Zugabe (2,5µg/ml). Die Experimente wurden mit GPVI-AK (5C4 10µg/ml PRP, n=2; 10B12, 50µg/ml, n=1) und GPVI-Fc (16µg), n=2) durchgeführt und als GPVI-Hemmung zusammengefasst (siehe Material und Methode 4.3.7). Als Kontrolle wurden die IgG Isotypenkontrolle aus Ratte (10µg/ml PRP), 2D4 (50µg/ml, anti-HLA Kontrollantikörper) und Fc-Kontrollprotein (16µg) verwendet und hier ebenfalls zusammengefasst. MW ± SA, n=4, *p=0,021, **p<0,003 im Vergleich zu Plaque+Kontrolle.

Stimulus	Agg %3 min	Agg % max	Gerinnungszeit [min]
Plaque + Ca/Mg	90 ± 17	95 ± 12	3,8 ± 0,5
Plaque + Kontrolle +Ca/Mg	76 ± 11	79 ± 11	4,7 ± 2,2
Plaque + GPVI-Hemmung +Ca/Mg	19 ± 18*	69 ± 19	6,9 ± 2,8**

A



B



C

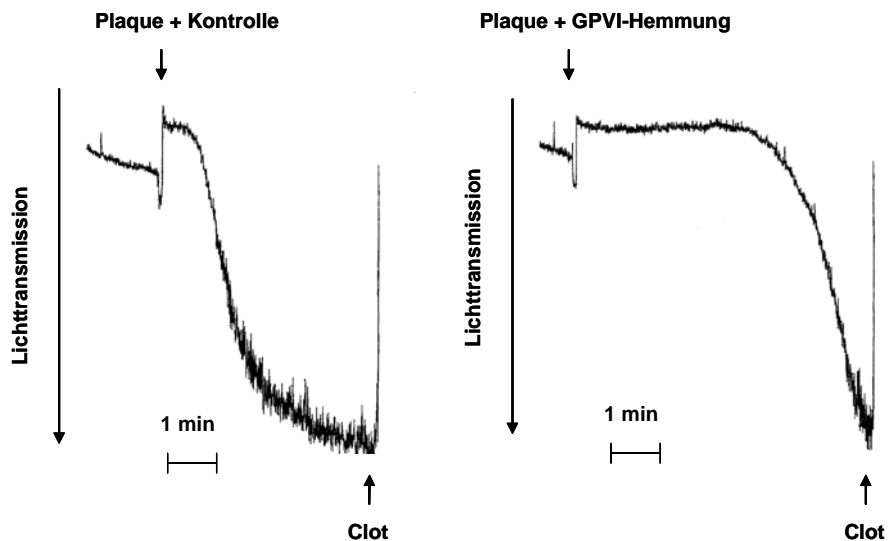


Abbildung 15: Einfluss von GPVI Hemmung auf die thrombozytäre Aggregation und Gerinnungszeit in Anwesenheit von divalenten Kationen ohne CTI.

Die Experimente wurden mit GPVI-AK (5C4, 10B12) und GPVI-Fc durchgeführt und als GPVI-Hemmung bezeichnet (GPVI-FC n=1, GPVI-AK 5C4 n=2, GPVI-AK 10B12 n=1). Plaque+Kontrolle fasst die Experimente mit den entsprechenden Kontroll-AK zusammen (siehe Material und Methode 4.3.7). **A** Graphische Darstellung des Einflusses der GPVI-Hemmung auf die Plaque-induzierten Tz-Aggregation nach 3 min und **B** auf die maximale Aggregation. Werte in % der Aggregation nach Inkubation mit Kollagen (2,5µg/ml). MW \pm SA, n=4 *p=0,021. **C** Aggregationskurven repräsentativ für n=4 Experimente. **Links:** Als Kontrolle die Aggregationskurve nach 5-minütiger Inkubation des PRP mit IgG Isootypenkontrolle aus Ratte (10µg/ml) vor Plaque-Zugabe. **Rechts:** Dem Plasma wurde auf analoge Weise der GPVI-AK 5C4 (10µg/ml) vor Plaque-Zugabe beigefügt. Plaque-Homogenat (5µl, 1,25mg/ml Feuchtgewicht) wurde unmittelbar nach der Zugabe von CaCl₂ (12mM) und MgCl₂ (0,1mM) zugegeben.

Bei der Durchführung der gleichen Experimente in Anwesenheit von CTI konnten ähnliche Effekte der GPVI-Hemmung festgestellt werden. Die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation zeigte eine Verminderung nach 3 min von 81 ± 31 % auf 28 ± 30 % und eine Verminderung der maximalen Tz-Aggregation von $92\% \pm 20$ % auf $55\% \pm 7$ %, jedoch nicht signifikant.

Tabelle 8: Einfluss von GPVI-AK auf die Plaque-induzierte Aggregation und Gerinnung in Anwesenheit von CTI.

Plaque-induzierte Aggregationswerte in % der dreiminütigen und maximalen Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit Kollagen (2,5µg/ml) in Anwesenheit von CaCl₂/MgCl₂ und CTI angegeben. Zur GPVI-Hemmung wurden das PRP 5 min unter rühren mit GPVI-AK (5C4 (10µg/ml), n=1; 10B12 (50µg/ml), n=2) oder entsprechenden Kontroll-AK (IgG aus Ratte (10µg/ml), 2D4 (50µg/ml, Anti HLA Typ2a AK) inkubiert. MW \pm SA, n=3.

Stimulus	Agg % 3 min	Agg % max	Gerinnungszeit [min]
Kollagen + Ca + Mg + CTI	100	100	>15
Plaque + Ca + Mg + CTI	103 ± 13	106 ± 11	$5,2 \pm 0,2$
Plaque + Kontrolle + Ca+Mg + CTI	81 ± 31	92 ± 20	$5,6 \pm 2$
Plaque + GPVI-Hemmung + Ca + Mg+ CTI	28 ± 30	55 ± 7	$6,9 \pm 3,4$

5.1.5.2 Vorbehandlung der Plaques mit Kollagenase und Kollagen I- und III-Antikörpern

Aufgrund der unvollständigen Hemmbarkeit der Plaque-induzierten Aggregation und Gerinnung durch GPVI-Hemmung im recalcifizierten Citrat PRP, versuchten wir, das sich im Plaque-Material befindliche Kollagen durch das Enzym Kollagenase zu degradieren. Es wurden zwei verschiedenen Plaques (A, B) an zwei verschiedenen Blutspendern getestet (Tab.9). Die Aggregation nach 3 min wurde vollständig inhibiert. Die maximale Aggregation wurde, ebenso wie nach GPVI-Hemmung (siehe 5.1.5.1), nur gering vermindert. Die Gerinnungszeit wurde von 6 min auf 8,5 min (Plaque A) bzw. von 4 min auf 5,8 min (Plaque B) verlängert.

Tabelle 9: Auswirkung der Vorbehandlung der Plaques mit Kollagenase auf die Plaque-induzierte Aggregation und Gerinnungszeit in Anwesenheit von CaCl_2 und MgCl_2 ohne CTI.

Plaque-induzierte Aggregation nach 3 min und maximale Aggregation in % der dreiminütigen und maximalen Aggregation nach Inkubation mit Kollagen (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A,B: Plaque-Homogenat (0,02ml) von zwei verschiedenen Patienten (Patient A, Patient B) wurden mit Kollagenase (0,6 μg) in TESCA Puffer inkubiert und nach CaCl_2 und MgCl_2 Zugabe zum PRP (zwei verschiedene Blutspender) gegeben. Kontroll- Inkubationen wurden mit TESCA Puffer vorbehandelten Plaques durchgeführt (siehe Material und Methoden 4.3.7).

Experiment	Stimulus	Agg % 3 min	Agg % max	Gerinnungszeit [min]
A	Plaque + TESCA	78	91	6,0
B	Plaque + TESCA	101	107	4,0
A	Plaque + Kollagenase	0	56	8,5
B	Plaque + Kollagenase	6	91	5,8

Des Weiteren wurden mit Kollagenase oder Kontrollpuffer (TESCA) vorbehandelte Plaques in Anwesenheit von CTI im PRP getestet (Abb.16). Die Hemmung des Faktors XII hatte nur eine geringe, jedoch nicht signifikante Auswirkung auf die Plaque-induzierte Aggregation nach Kollagenase-Behandlung (Tab.10). Die Zeit bis zur Gerinnung konnte statistisch signifikant von $3,5 \pm 2,7$ min auf $5,1 \pm 3,0$ min verlängert werden $\text{MW} \pm \text{SA}$, $n=4$, $p=0,014$).

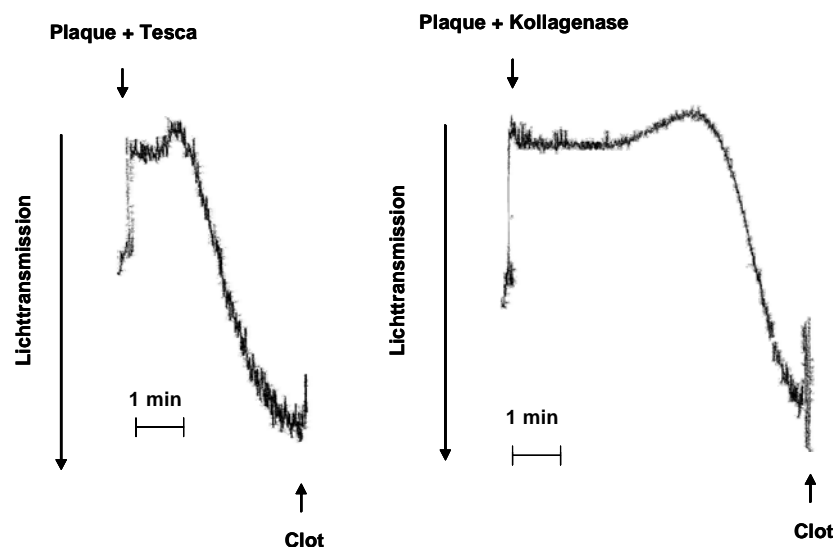


Abbildung 16: Plaque Vorbehandlung mit Kollagenase oder Kontrollpuffer.

Die Aggregationskurven sind repräsentativ für n=4 Experimente in Anwesenheit von CaCl_2 , MgCl_2 und CTI. CTI (32 $\mu\text{g/ml}$) wurde vor jeder Messung zum PRP gegeben und 2 min bei 37°C gerührt. Anschließend wurden CaCl_2 (12mM), MgCl_2 (0,1mM) und das mit TESCA oder Kollagenase inkubierte Plaque-Homogenat zugegeben. **Links:** Als Kontrolle die Aggregationskurve nach Plaque + Tesca Zugabe. **Rechts:** Plaque + Kollagenase-Zugabe.

Tabelle 10: Auswirkungen der Vorbehandlung der Plaques mit Kollagenase auf die Plaque-induzierte Aggregation und Gerinnungszeit in Anwesenheit von CaCl_2 / MgCl_2 und CTI.

Plaque-induzierte Aggregation nach 3 min und maximale Aggregation in % der dreiminütigen und maximalen Aggregation nach Inkubation mit Kollagen (2,5 $\mu\text{g/ml}$) in Anwesenheit von CaCl_2 , MgCl_2 und CTI. CTI (32 $\mu\text{g/ml}$) wurde vor jeder Messung zum PRP gegeben und 2 min bei 37°C gerührt. Anschließend wurden CaCl_2 (12mM), MgCl_2 (0,1mM) und das mit TESCA oder Kollagenase inkubierte Plaque-Homogenat zugegeben. MW \pm SA, n=4 (4 verschiedene Plaques, 4 verschiedene Blutspender), *p=0,014 im Vergleich zur Kontrolle mit TESCA.

Stimulus	Agg % 3 min	Agg % max	Gerinnungszeit [min]
Plaque + TESCA + CTI	110 \pm 13	104 \pm 5	3,5 \pm 2,7
Plaque + Kollagenase + CTI	0 \pm 0	78 \pm 18	5,1 \pm 3,0*

Da vor allem Kollagene Typ I und III für die Plaque-induzierte Aggregation verantwortlich zu sein scheinen (Katsuda and Kaji, 2003; Moroi and Jung, 2004; Penz et al., 2005), ergab sich die Frage, ob sich mit Antikörpern gegen Kollagen Typ I und III derselbe Effekt erreichen ließe, wie mit der Kollagenase Behandlung der Plaques. Wir blockierten die Kollagene Typ I und III im Plaque-Material mit entsprechenden Antikörpern und testeten die vorbehandelten Plaques in Anwesenheit von CTI (Abb.17). Die Resultate waren vergleichbar mit denen der mit Kollagenase behandelten Plaques. Die Aggregation nach 3 min wurde statistisch

signifikant von $75 \pm 21\%$ auf $12 \pm 12\%$ reduziert (MW \pm SA, n=3, p=0,019) und die maximale Aggregation wurde von 94 ± 5 auf $64 \pm 15 \%$ gesenkt (Tab.11). Die Gerinnungszeit wurde durch die Kollagen Typ I und III Blockade im Gegensatz zur Kollagenase Behandlung und Messung in Anwesenheit von CTI gering beeinflusst.

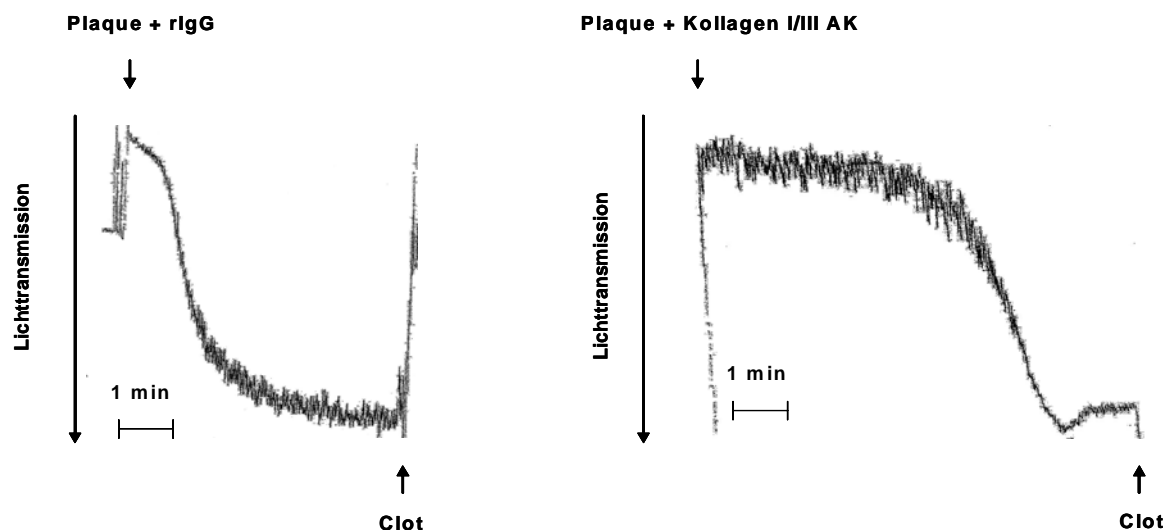


Abbildung 17: Vorbehandlung der Plaques mit Kollagen I- und III-Antikörpern in Anwesenheit von CaCl_2 , MgCl_2 und CTI.

Die Aggregationskurven sind repräsentativ für n=3 Experimente. **Links:** Als Kontrolle wurde Plaque Homogenat (10 μ l) mit IgG Isotypenkontrolle aus Hase (rIgG, 20 μ g) für 10 min bei 37°C inkubiert und unmittelbar nach der Zugabe von CaCl_2 (12mM), MgCl_2 (0,1mM) und CTI (32 μ g/ml) zum geführten PRP gegeben. **Rechts:** Plaque-Homogenat (10 μ l) wurde mit je 10 μ l Ak gegen Kollagene Typ I und Typ III (Kollagen I/III AK) für 10 min bei 37°C inkubiert und ebenso nach der Zugabe von CaCl_2 (12mM), MgCl_2 (0,1mM) und CTI (32 μ g/ml) zum geführten PRP gegeben.

Tabelle 11: Auswirkungen der Vorbehandlung der Plaques mit Kollagen I- und III Antikörpern auf die Plaque-induzierte Aggregation in Anwesenheit von CaCl_2 / MgCl_2 und CTI.

Plaque-induzierte Aggregation nach 3 min und maximale Aggregation in % der Aggregation nach Stimulation mit Kollagen (2,5 μ g/ml). Plaque (5 μ l) wurde für 10 min bei 37°C mit Kollagen I/III AK (je 5 μ g) inkubiert. MW \pm SA, n= 3, *p= 0,019 im Vergleich zur Kontrolle mit rabbit IgG (10 μ g).

Stimulus	Agg % 3 min	Agg % max	Gerinnungszeit [min]
Plaque	97 ± 16	104 ± 13	$5,2 \pm 0,8$
Plaque + Kontrolle	75 ± 21	94 ± 5	$5,3 \pm 0,3$
Plaque + Kollagen I/III AK	$12 \pm 12^*$	64 ± 15	$6,2 \pm 0,5$

5.1.6 Kombinierte Hemmung der Kollagen- und TF-Komponente in atherosklerotischen Plaques

5.1.6.1 Vorbehandlung der Plaques mit Kollagenase und TF-AK

Schließlich wollten wir feststellen, ob die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation und Gerinnung wirklich nur durch die beiden Plaque-Komponenten TF und Kollagen verursacht wird. Beide Plaque Komponenten wurden inaktiviert. Hierzu degradierten wir zuerst über Nacht das gesamte Plaque-Kollagen mit Hilfe des Enzyms Kollagenase. Anschließend hemmten wir den TF mit TF-Ak in den mit Kollagenase vorbehandelten Plaques. Um eine Kontaktaktivierung aufgrund der CaCl_2 und MgCl_2 Zugabe zu verhindern, wurden alle diesbezüglichen Versuche in Anwesenheit von CTI durchgeführt. Zu beobachten war tatsächlich eine vollständige Inaktivierung der Plaques. Es konnte weder Aggregation, noch Gerinnung mehr stattfinden (Abb. 18).

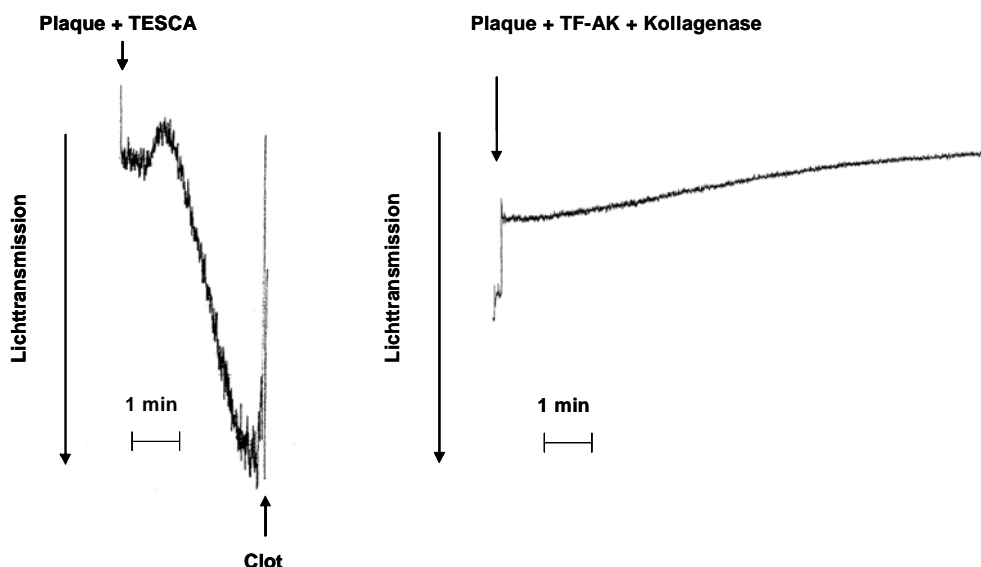


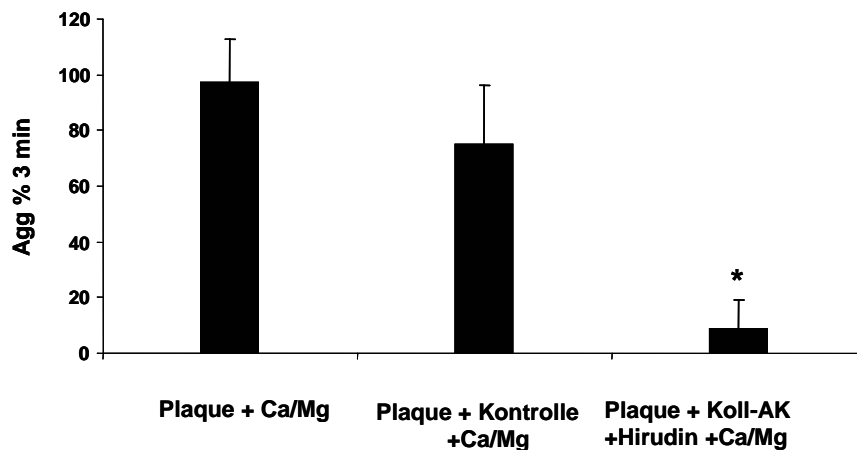
Abbildung 18: Auswirkung der Vorbehandlung der Plaques mit Kollagenase und TF-AK auf Plaque-induzierte Aggregation und Gerinnungszeit in Anwesenheit von CaCl_2 / MgCl_2 und CTI.

Plaque-Homogenat (0,02ml) wurde über Nacht mit Kollagenase (0,6 μg) in 50 μl TESCA Puffer (50mM TES, 0,36mM CaCl_2) und additionellen 9mM CaCl_2 über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 12 μl dieses Inkubats mit TF-AK (2 μg) für 10 min bei 37°C inkubiert. Kontroll- Inkubationen wurden TESCA Puffer und IgG Isotypenkontrolle aus Kaninchen (2 μg) durchgeführt. MW \pm SA, n=3 (3 verschiedene Plaques und 3 verschiedene Blutspender).

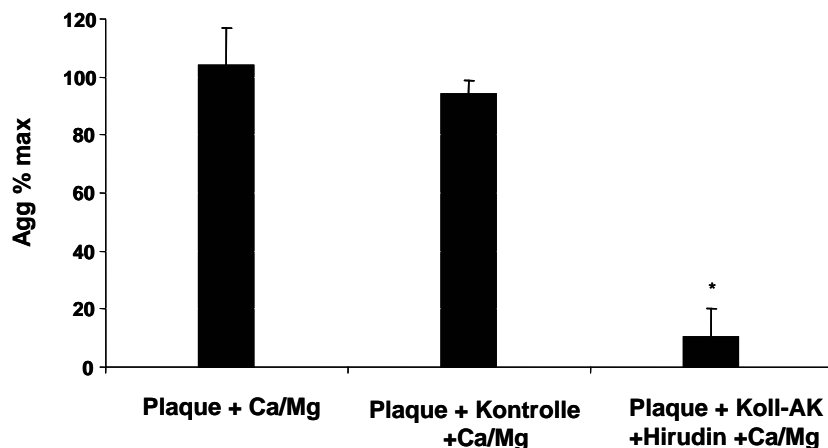
5.1.6.2 Hemmung von Kollagen I und III und Thrombin

Eine ebenso nahezu vollständige Hemmung der Aggregation, sowie eine komplette Inhibition der Gerinnung konnte durch die Verwendung von Anti Kollagen Typ I und III Antikörpern zusammen mit Hirudin erreicht werden. Die Plaques wurden Kollagen- Antikörpern vorbehandelt. Hirudin (100 U/ml) wurde vor Zugabe des Plaque-Materials zur Thrombin-Hemmung zum PRP gegeben. Die resultierenden Werte waren den erzielten Ergebnissen durch den kombinierten Kollagen-Verdau mit der TF-Blockade (siehe 5.1.6.1) sehr ähnlich. Die Aggregation nach 3 min konnte von 75 ± 21 % auf 9 ± 10 % reduziert werden, die maximale Aggregation verminderte sich von 94 ± 5 % auf 10 ± 10 % (Abb.19 A,B). Eine Gerinnung fand innerhalb einer Messdauer von 15 Minuten nicht mehr statt (Abb.19 C).

A



B



C

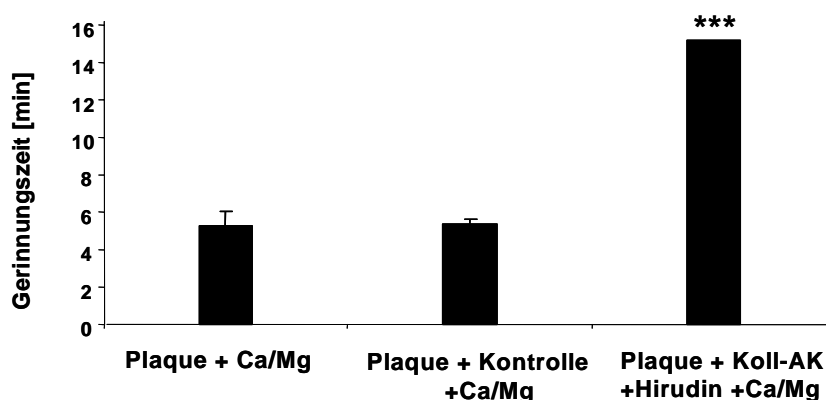


Abbildung 19: Auswirkungen der kombinierten Hemmung von Kollagen I und III im Plaque-Homogenat und von Thrombin auf die Plaque-induzierte Aggregation und Gerinnung in Anwesenheit von CTI.

Plaque-Homogenate (5 μ l, 1,25 mg/ml Feuchtgewicht) wurden mit Kollagen I und III AK (Koll AK, je 5 μ l) oder Kontrolle (rabbit IgG 10 μ l) 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Thrombin Hemmung wurde das PRP (400 μ l) vor Zugabe des Plaques mit Hirudin (100 U/ml) 1 min bei 37°C unter rühren inkubiert. CTI wurde 2 min vor Zugabe der Agonisten zum PRP gegeben. MW \pm SD, n= 3. **A** Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation nach 3 min in % der Aggregation nach 3 min Inkubation mit Kollagen (2,5 μ g/ml). *p<0,05. **B** Plaque-induzierte maximale Aggregation in % der maximalen Aggregation nach Stimulation mit Kollagen (2,5 μ g/ml). **p<0,005. **C** Hemmbarkeit der Plaque-induzierten Gerinnung durch Kollagen Typ I/III -AK zusammen mit Hirudin. ***p<0,0001.

5.1.6.3 Hemmung von GPVI und Thrombin

Zuletzt wollten wir herausfinden, wie groß der Einfluss einer GPVI-Hemmung zusammen mit einer Hemmung von Thrombin auf die Plaque-induzierte Aggregation und Gerinnung war. Dazu wurden die Plaques mit GPVI-Fc Fusionsprotein vorbehandelt. Die Aggregations-Hemmung fiel ähnlich wie nach Kollagen-Verdau bzw. nach Kollagen Typ I und III Blockade aus, war jedoch etwas geringer (Tab.12). Die Aggregation nach 3 min konnte von 83 ± 22 % auf 15 ± 9 % vermindert werden. Die maximale Aggregation sank von 87 ± 23 % lediglich auf 32 ± 8 % (MW \pm Sa, n=3). Eine Gerinnungszeit war innerhalb von 15 min nicht nachweisbar.

Tabelle 12: Einfluss der Hemmung von GPVI und Thrombin auf die thrombozytäre Aggregation und Gerinnungszeit in Anwesenheit von CaCl_2 / MgCl_2 und CTI.

Plaque-induzierte Aggregation nach 3 min und maximale Aggregation in % der Aggregation nach Stimulation mit Kollagen (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Plaque-Homogenat (5 μl , 1,25mg/ml Feuchtgewicht) wurde 30 min bei Raumtemperatur mit GPVI-Fc (16 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder Kontrolle (Fc-Kontrolle, 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Zur Hemmung von Thrombin wurde das PRP vor Zugabe des Plaques 1 min mit Hirudin (100U/ml) bei 37°C unter rühren inkubiert. MW \pm SA, n= 3 (3 verschiedene Plaques, 3 verschiedene Blutspender).

Stimulus	Agg % 3 min	Agg % max	Gerinnungszeit [min]
Plaque	103 \pm 13	107 \pm 11	5,2 \pm 0,7
Plaque + Fc-Kontrolle	83 \pm 22	87 \pm 23	5,5 \pm 2
Plaque +GPVI-Fc + Hirudin	15 \pm 9	32 \pm 8	>15

5.2 TF- Kollagen- und Plaque-induzierte Thrombinbildung: Messungen mit der Thrombogram Methode im PRP und PFP

5.2.1 Kinetik der Thrombinbildung im PRP und PFP

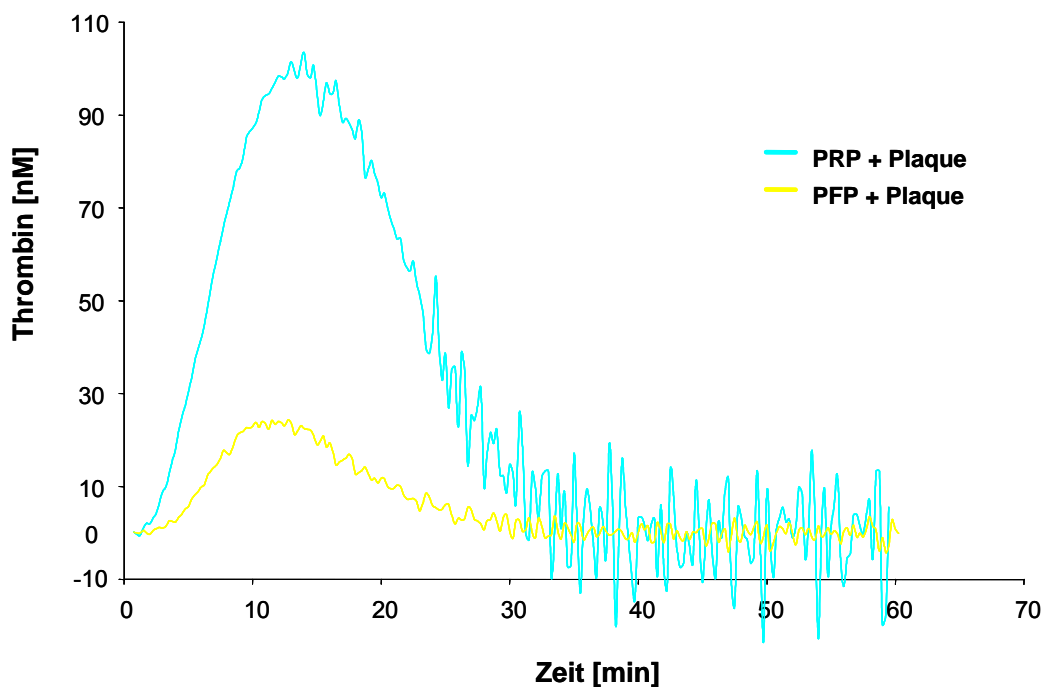


Abbildung 20: Plaque-induzierte Thrombinbildung im PRP und PFP.

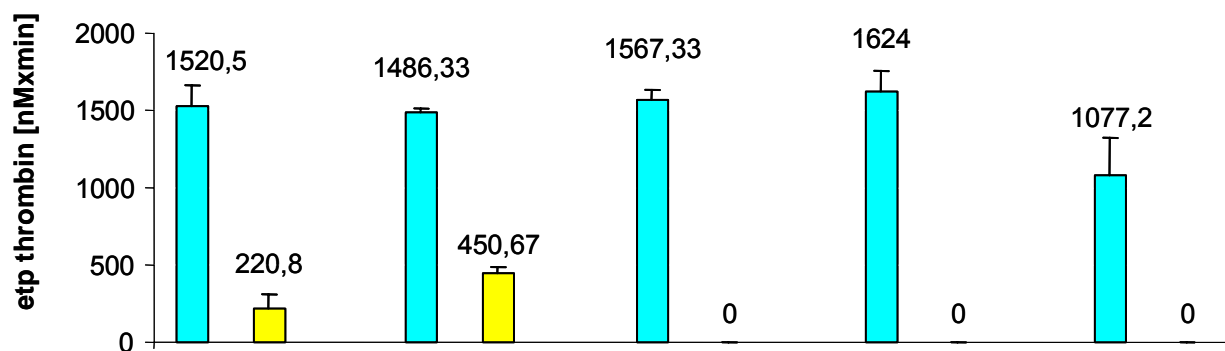
Die Thrombinbildung wurde automatisch mit fluoreszent ZGGR-AMC Substrat gemessen, wie in Material und Methoden beschrieben. Gezeigt werden repräsentative Kurven der Fluoreszenz-Akkumulation. MW \pm SA, n=6 (6 verschiedene Plaques getestet an drei verschiedenen Blutspendern in je dreifacher Ausführung).

Die Thrombinbildung wurde in plättchenfreiem Plasma (PFP) und in plättchenreichem Plasma (PRP) nach Zugabe von CaCl_2 und MgCl_2 bestimmt, wie bei den Messungen der Fibrinbildung im Rotem[®] (siehe Abschnitt 5.3), jedoch in Abwesenheit von CTI. Abbildung 20 zeigt die Kurven der Thrombinbildung im PRP und PFP nach Zugabe von Plaque Homogenat und ist repräsentativ für n=6 Experimente. Für diese Experimente wurden ausschließlich Plaques verwendet, die unmittelbar nach Thrombendarrektomie mit flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden und bis zur Homogenisierung bei -80°C aufbewahrt wurden (Aufbereitungsmethode B, siehe Material und Methoden).

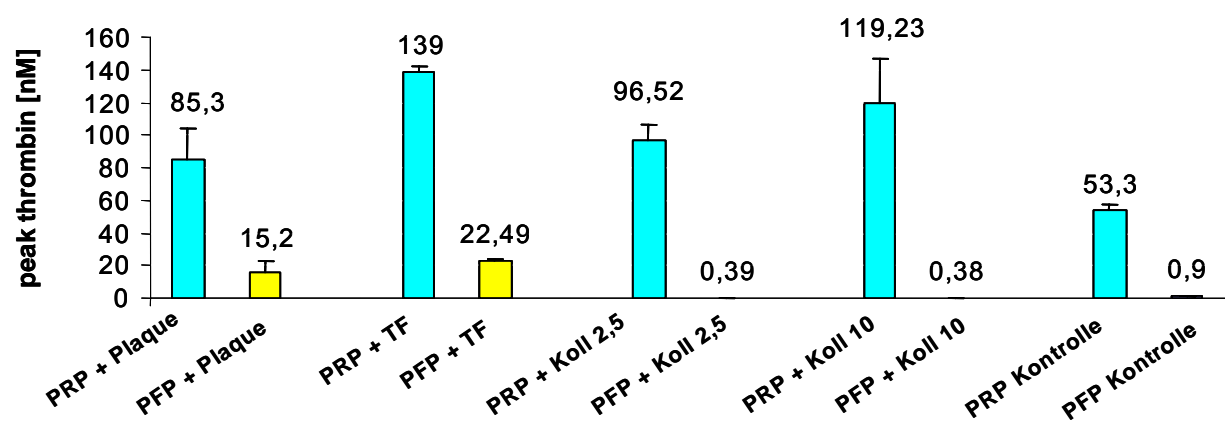
Die Gesamtmenge Thrombin die während der zweistündigen Messung gebildet wird (endogenes Thrombin Potential, etp), entspricht der Fläche unter der Kurve. Das etp war im

PFP mit $220,8 \pm 88$ nMxmin viel geringer als im PRP mit 1520 ± 141 nMxmin (MW \pm SA). Der Thrombin Gipfel (*peak thrombin*) repräsentiert die maximale Geschwindigkeit der Thrombinbildung. Auch dieser war mit $15,2 \pm 7$ nM im PFP viel niedriger als im PRP mit $85,3 \pm 15,2$ nM (MW \pm SA). Die Parameter *lag time* und *time to peak (t_{peak})* spiegeln die Kinetik der Thrombinbildung wieder. Diese unterschieden sich bei der Plaque-induzierten Thrombinbildung nicht statistisch signifikant im PRP im Vergleich zum PFP. Die *lag time* war etwas länger im PRP ($4,9 \pm 2$ min) als im PFP ($6,1 \pm 1$ min). Die *time to peak*-Werte waren mit $15,2 \pm 3$ min im PRP und $14,5 \pm 2$ min im PFP nahezu gleich (MW \pm SA). Die gleichen Experimente wurden mit TF und Kollagen durchgeführt und sind zusammen mit den Ergebnissen nach Plaque-Zugabe in den nachfolgenden Balkendiagrammen in Abbildung 21 A-D zusammengefasst. Als Kontrolle wurde die Thrombinbildung im PRP und PFP nach Zugabe von Pufferlösung ohne Agonisten gemessen (Abb.21 A-D, Kontrolle PRP bzw. Kontrolle PFP).

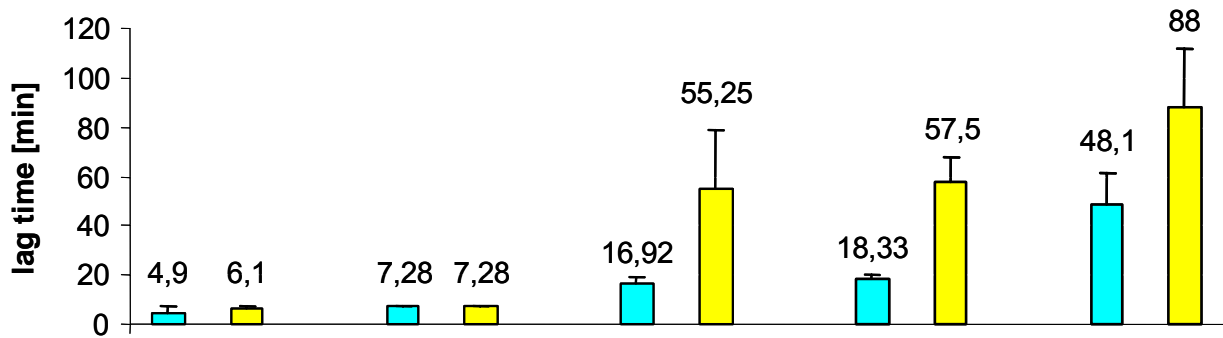
A



B



C



D

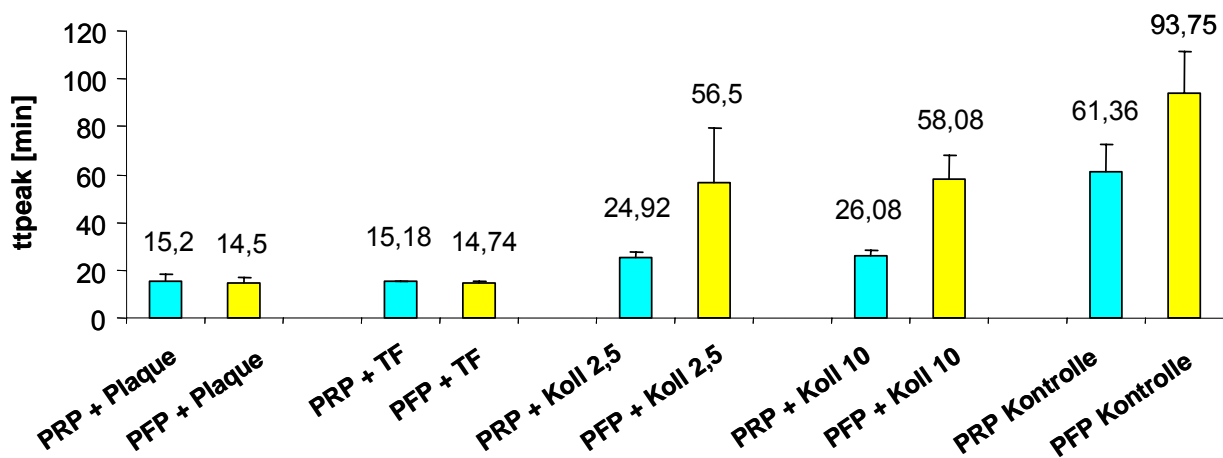


Abbildung 21: Vergleich der Plaque-, TF- und Kollagen- induzierten Thrombinbildung im PRP und PPP.

Plaque Homogenat (1,5 μ l), TF (0,1ng/ml) oder Kollagen (2,5 μ g/ml bzw. 10 μ g/ml) wurde in 20 μ l Puffer überführt und zu 80 μ l PRP (blaue Balken) bzw. PFP (gelbe Balken) gegeben. Die Thrombinbildung wurde durch die Zugabe von 20 μ l eines CaCl₂-haltigen Puffers (CaCl₂ 12mM, f.c.), der auch einen Fluoreszenz-Indikator zur Thrombin-Messung enthielt (Z-Gly-Gly-Arg-AMC) gestartet. MW \pm SA. Plaque: n= 6 (6 verschiedene Plaques wurden in jeweils dreifacher Ausführung im PRP/PFP eines Blutspenders gemessen), *Tissue factor* (TF 0,1ng/ml): n=1 (Messungen im PRP/PPP eines Blutspenders in dreifacher Ausführung) Kollagen 2,5 μ g/ml oder 10 μ g/ml: n=1 (Messung im PRP/PPP eines Blutspenders in dreifacher Ausführung). Als Kontrolle wurden ausschließlich die Pufferlösungen (20 μ l working buffer, 20 μ l fluo buffer) zu 80 μ l PRP (Tz-Zahl 150000/ μ l) oder PPP gegeben. **A** etp: endogenes Thrombin Potential: Fläche unter der Kurve, entspricht der Gesamtmenge Thrombin, die während der gesamten Messzeit (2h) gebildet wird. **B** lag time: Zeitspanne bis zum Beginn der Thrombinbildung. **C** tpeak: time to peak: Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit der Thrombinbildung. **D** peak thrombin: maximale gebildete Menge Thrombin.

Es zeigte sich, dass nach Zugabe von TF ebenfalls eine deutlich geringere Gesamtmenge Thrombin im PFP entstand (etp, 450,67 \pm 31 nMxmin) als im PRP (etp, 1486,33 \pm 31 nMxmin, Abb.21 A). Die peak thrombin-Werte betragen im PRP 139 \pm 2,87 nM und im PFP lediglich 22,49 \pm 1,86 nM (Abb.21 B). Die lag time war im PRP mit 7,28 \pm 3,4 min genauso schnell wie

im PFP, (Abb.21 C). Die *tpeak*-Werte waren im PRP mit $15,18 \pm 2$ min gleich schnell wie im PFP mit $14,74 \pm 3$ min (Abb.21 D).

Kollagen wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, $2,5\mu\text{g/ml}$ und $10\mu\text{g/ml}$. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die gemessenen Parameter im PRP und PFP. Im PFP wurde erwartungsgemäß keine messbare Menge Thrombin (*etp*, *peak*, Abb.21 A,B) gebildet. Erst nach sehr langer Zeit (*lag time*: $55,25 \pm 23,7$ min bei Koll $2,5\mu\text{g/ml}$ und $57,5 \pm 10,2$ min bei Koll $10\mu\text{g/ml}$) wurde im PFP ein Beginn der Thrombinbildung registriert (Abb.21 C). Der *tpeak*-Werte lagen ebenfalls im Bereich von 55,25 bzw. 57,5 min. Diese Werte entsprachen ungefähr den mit der Pufferlösung gemessenen Werten. Im PRP betrug das endogene Thrombin Potential, *etp*, $1567,33 \pm 71$ nMxmin (Koll $2,5\mu\text{g/ml}$) bzw. 1624 ± 136 nMxmin ($10\mu\text{g/ml}$) und die *peak thrombin*-Werte betragen $96,52 \pm 10,1$ nM bzw. $119,23 \pm 27,34$ nM, was ungefähr den mit Plaque im PRP gemessenen Parametern betrug. Die *lag time* war im Vergleich zur Plaque- und TF-induzierten Thrombinbildung im PRP nach der Zugabe beider Kollagen-Konzentrationen mit $16,92 \pm 2,38$ min bzw. $18,33 \pm 2$ min signifikant verlängert (Abb.21 C, $p=0,014$ für Kollagen $2,5\mu\text{g/ml}$ im Vergleich zu Plaque ($n=3$); $p=0,015$ für Kollagen $10\mu\text{g/ml}$ im Vergleich zu Plaque ($n=3$). Das Gleiche wurde beobachtet für die *tpeak*-Werte mit $24,92 \pm 2,75$ min (Koll $2,5\mu\text{g/ml}$) bzw. $26,08 \pm 1,94$ min ($10\mu\text{g/ml}$) im PRP nach Kollagen Zugabe (Abb.21 D). Somit fiel auf, dass sich die Plaque- und TF-induzierte Thrombinbildung im PRP und PFP stark ähnelten, bis auf die *peak*-Werte, die interessanterweise nach TF-Zugabe zum PRP deutlich höher lagen, als nach Plaque-Zugabe. Bei beiden Agonisten konnte kein signifikanter Unterschied im PFP und PRP bezüglich der Kinetik der Thrombinbildung (*lag time*, *tpeak*) festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte bei Kollagen-Zugabe nur im PRP eine Thrombinbildung registriert werden. Hier waren die Werte *etp* und *peak thrombin* zwar mit den entsprechenden Plaque-Werten vergleichbar, die Parameter der Kinetik der Thrombinbildung (*lag time*, *tpeak*) im PRP unterschieden sich bei Kollagen und Plaque jedoch signifikant voneinander. Folglich schien TF für die Kinetik der Plaque-induzierten Thrombinbildung verantwortlich zu sein.

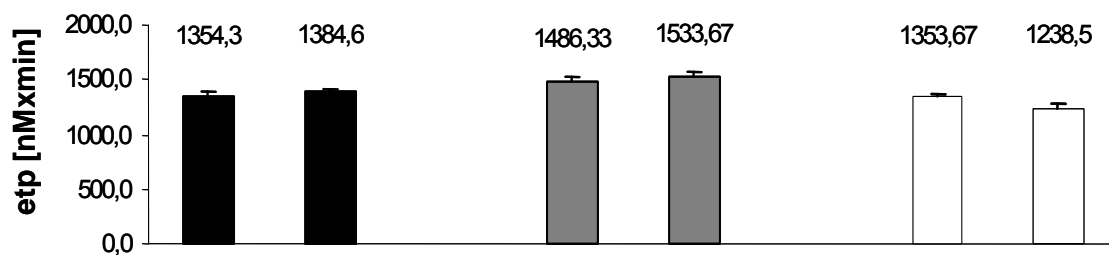
5.2.2 Einfluss verschiedener Thrombozytenkonzentrationen

Thrombogram-Messungen werden normalerweise mit einer Thrombozytenkonzentration von $150000/\mu\text{l}$ PRP durchgeführt (Hemker, 2002). Da die Experimente im Aggregometer (5.1) und in Rotem[®] (5.3) mit einer Thrombozytenkonzentration von $300000/\mu\text{l}$ durchgeführt wurden, verglichen wir die Plaque-TF- und Kollagen-induzierte Thrombinbildung im PRP mit 150000 Tz/ μl und 300000 Tz/ μl . Die folgende Graphik zeigt, dass das endogene Thrombin Potential (*etp*) weder bei Plaque-, noch bei TF-, oder Kollagen-Zugabe durch die verschiedenen Thrombozytenkonzentrationen beeinflusst wurde (Abb.22 A). Die *peak thrombin*-Werte

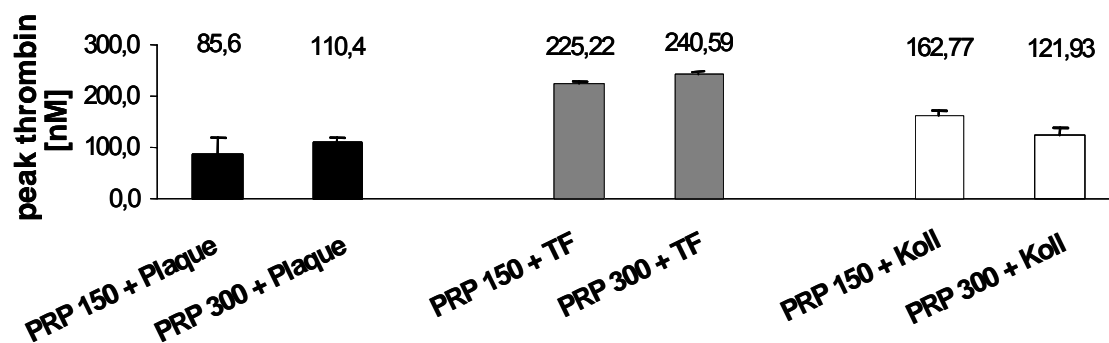
konnten durch den Einfluss der höheren Thrombozytenzahlen bei Plaque von $85,6 \pm 3,4\text{nM}$ auf $110,4 \pm 6,9\text{nM}$ und bei TF von $225,22 \pm 2,87\text{nM}$ auf $240,59 \pm 1,72\text{nM}$ nur leicht erhöht werden (MW \pm SA). Bei Kollagen-Zugabe zu PRP mit 300000 Tz/ μl sank der *peak thrombin* wider Erwarten geringfügig von $162,77 \pm 8,03\text{nM}$ auf $121,93 \pm 15,82\text{nM}$ (MW \pm SA, Abb.22 B).

Bei Betrachtung der Parameter der Kinetik der Thrombinbildung (*lag time*, *t_{peak}*, Abb.22 C,D) fiel auf, dass sich eine Erhöhung der Thrombozytenzahl auf 300000/ μl nur bei Kollagen-Zugabe, nicht jedoch bei Plaque- und TF-Zugabe bemerkbar machte. Bei den niedrigen Thrombozytenkonzentrationen begann die Kollagen-induzierte Thrombinbildung (*lag time*) bereits nach $11,7 \pm 0,52$ min, bei den höheren Thrombozytenzahlen verlängerte sich die *lag time* auf $14,2 \pm 0,18$ min. Auch die Kollagen-induzierten *t_{peak}*-Werte waren bei höheren Thrombozytenzahlen auf $21 \pm 0,71$ min verlängert, im Vergleich zu $15,2 \pm 0,52$ min bei niedrigen Thrombozytenzahlen.

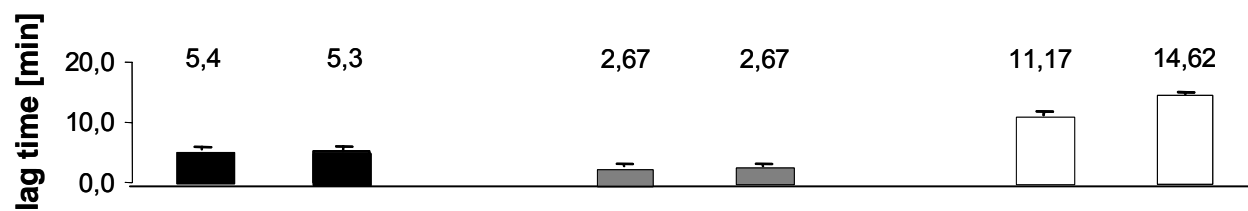
A



B



C



D

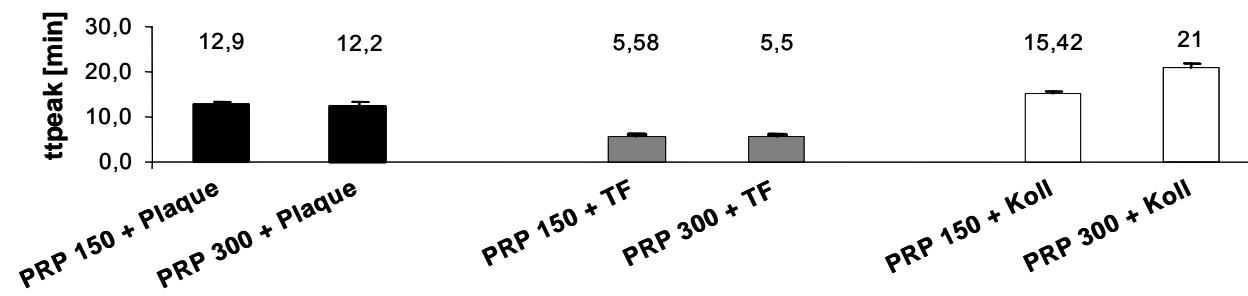


Abbildung 22: Vergleich der Plaque-, TF- und Kollagen- induzierten Thrombinbildung im PRP bei verschiedenen Thrombozytenkonzentrationen.

PRP 150: Tz 150000/ μ l; PRP 300: Tz Zahl 300 000/ μ l. Die Anzahl der Plättchen wurde mit PFP adjustiert, das vom selben PRP durch zweifache Zentrifugation bei 1000 x g, 4°C für 10 min hergestellt wurde. Die Experimente wurden in Anwesenheit von CaCl_2 (12mM) und MgCl_2 (0,1mM) durchgeführt. MW \pm SA. Plaque: n= 3 (3 verschiedene Plaques, drei verschiedene Blutspender, jede Messung in dreifacher Ausführung). *Tissue factor* (TF, 0,1ng/ml): n=1 (ein Blutspender, Messungen in dreifacher Ausführung), Coll (Kollagen, 2,5 μ g/ml: n=1 (ein Blutspender, Messungen in dreifacher Ausführung). **A** etp: endogenes Thrombin Potential: Fläche unter der Kurve, entspricht der Gesamtmenge Thrombin, die während der gesamten Messzeit (2h) gebildet wird. **B** peak thrombin: maximale gebildete Menge Thrombin **C** lag time: Zeitspanne bis zum Beginn der Thrombinbildung. **D** tpeak: time to peak: Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit der Thrombinbildung.

Da eine Veränderung der Thrombozytenzahl die Plaque- und TF-induzierte Thrombinbildung kaum beeinflusste und die Kollagen-induzierten Thrombinbildung zwar leicht verändert war, jedoch nicht signifikant, führten wir alle folgenden Experimente im Thrombogram mit der Thrombozytenzahl 300000/ μ l im PRP durch.

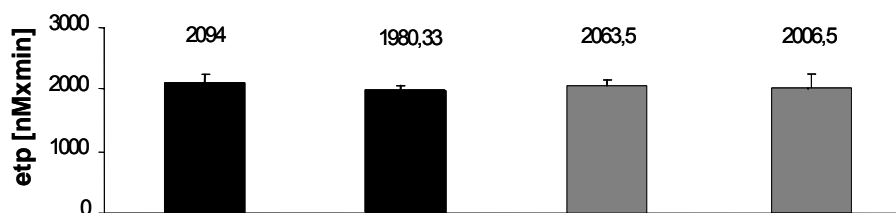
5.2.3 Einfluss von CTI

Der Einfluss der Hemmung des Faktors XII der intrinsischen Gerinnungskaskade mittels CTI auf die Plaque-, Kollagen- und TF-induzierte Aggregation und Gerinnung wurde wie in 5.1.2 beschrieben im Aggregometer untersucht. Dabei wurde gefunden, dass eine CTI-Zugabe nur die Kollagen-induzierte Gerinnung, nicht jedoch die Plaque- oder TF- induzierte Gerinnung herauszögerte und sich bei keinem der Agonisten auf die Aggregation auswirkte. Somit war für uns nun von großem Interesse, welche Wirkung CTI auf die Kollagen- und Plaque-induzierte Thrombinbildung hatte.

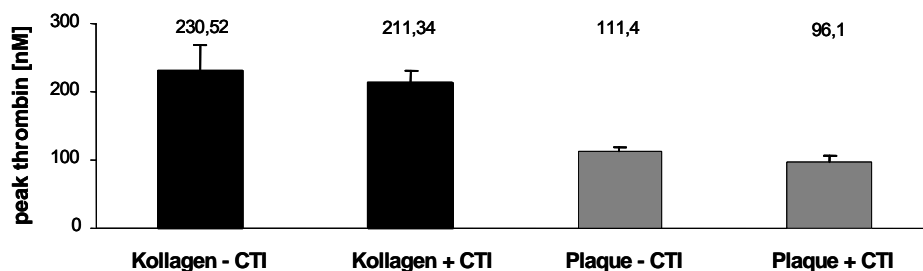
Es zeigte sich, dass das endogene Thrombin Potential (etp) sowohl bei Plaque-, als auch bei Kollagen-Zugabe etwas reduziert wurde (Bei Kollagen Zugabe von $2094 \pm 158,23$ auf $1980,33 \pm 94,08$ nMxmin, bei Plaque von $2063,5 \pm 83,7$ nMxmin auf $2006,5 \pm 8,7$ nMxmin, Abb.23 A). Die *peak thrombin*-Werte (Abb.23 B) blieben bei beiden Agonisten unbeeinflusst durch die Hemmung des FXII.

Bei der Auswertung der Parameter der Kinetik der Thrombinbildung (*lag time*, *time to peak*, Abb.23 C,D) fiel auf, dass das intrinsische System und der Faktor XII nur bei der Kollagen-induzierten Thrombinbildung eine Rolle zu spielen schienen, da sich nur hier bei CTI Zugabe die entsprechenden Parameter veränderten. Die *lag time* verzögerte sich von $17,1 \pm 2,88$ min auf $26,44 \pm 4,44$ min und die *tpeak* verlängerte sich von $22,67 \pm 3,18$ min auf $32,22 \pm 4,25$ min (MW \pm SA, n=3).

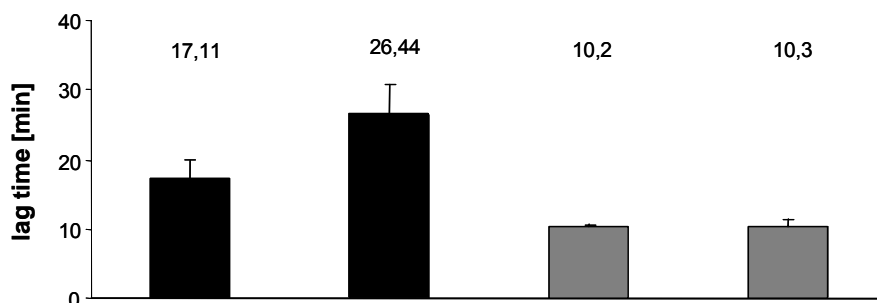
A



B



C



D

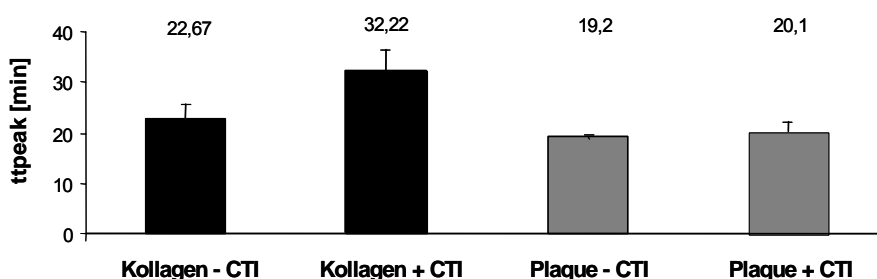


Abbildung 23: Einfluss der Hemmung der intrinsischen Gerinnung durch Blockade des F XII mittels CTI auf die Kollagen- und Plaque- induzierte Thrombinbildung.

80µl PRP (Tz-Zahl: 300000/µl) wurde vor Zugabe der jeweiligen Agonisten mit 32µg/ml CTI für 2 Minuten bei 37°C inkubiert. MW ± SA. Plaque (1,5µl): n= 2 (zwei verschiedene Plaques, ein Blutspender, Messungen in dreifacher Ausführung), Kollagen (2,5µg/ml): n=1 (ein Blutspender, Messungen in dreifacher Ausführung). **A** etp: endogenes Thrombin Potential: Summe der Thrombin-Konzentrationen, die während der gesamten Messzeit (2h) gebildet werden. **B** peak thrombin: maximale gebildete Menge Thrombin. **C** lag time: Zeitspanne bis zum Beginn der Thrombinbildung. **D** tpeak: time to peak: Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit der Thrombinbildung.

5.2.4 Rolle von TF und kollagenen Strukturen im Plaque

Es wurde verglichen, welche Rolle Plaque-TF und Plaque-Kollagen bei der Plaque-induzierten Thrombinbildung spielen. Wie bereits oben beschrieben, wurde hierfür entweder die TF-Komponente im Plaque mittels TF-AK gehemmt, oder die Kollagen-Komponente im Plaque mittels Kollagenase abgebaut und anschließend die Thrombinbildung im PRP bestimmt (Abb.24). Das Plaque-Material wurde ebenso mit den entsprechenden Kontrollen (rabbit IgG für TF-AK und Tesca Puffer für Kollagenase) inkubiert und zusätzlich direkt zugegeben (Plaque). Es zeigte sich, dass die Hemmung des Plaque-TF, aber nicht der Plaque-Kollagen-Abbau die Kinetik der Plaque-induzierten Thrombinbildung deutlich verzögerte.

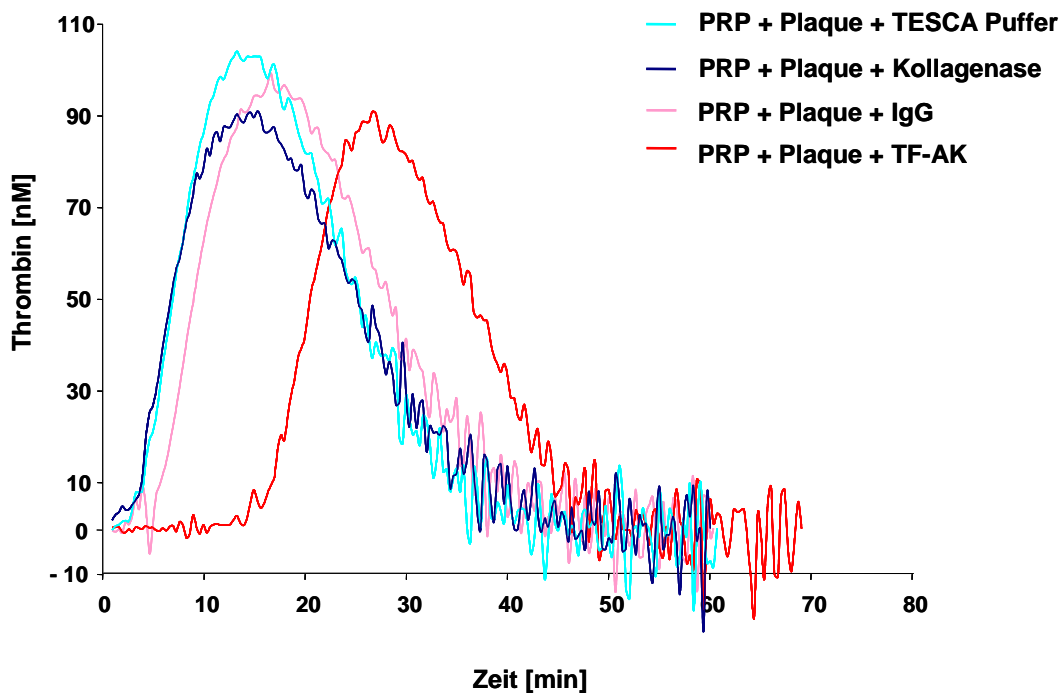


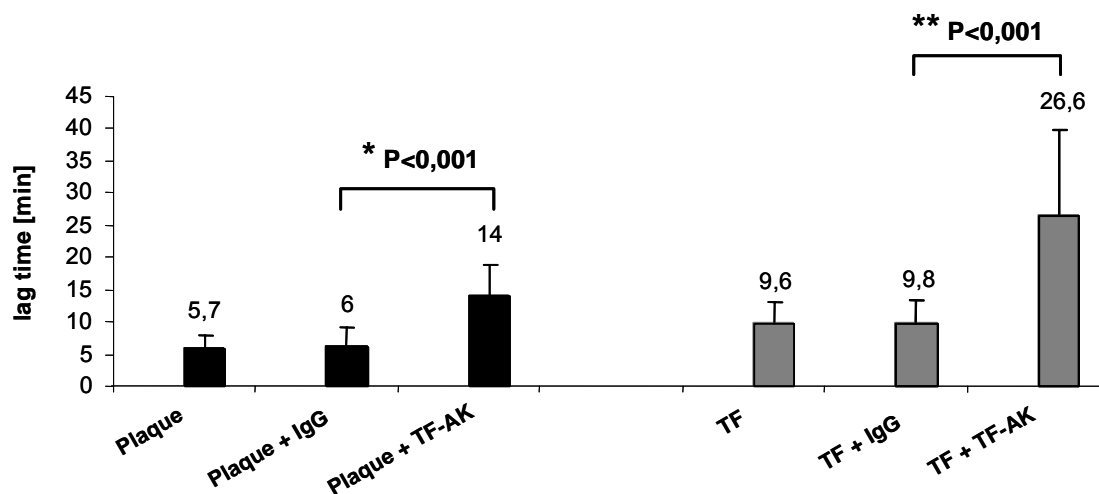
Abbildung 24: Einfluss von TF-AK und Kollagenase auf die Plaque-induzierte Thrombinbildung im PRP.

Zur Hemmung von TF wurde Plaque (1,5 μ l) mit TF-AK (1 μ g) bzw. rabbit IgG (1 μ g) für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend zum PRP gegeben. Für den Kollagen-Verdau wurde Plaque (1,5 μ l) über Nacht bei 37°C mit dem Enzym Kollagenase oder Tesca Puffer als Kontrolle inkubiert und anschließend zum PRP gegeben.

Der TF-AK bzw. die Kollagenase-Behandlung zu gewährleisten, wurden parallel zu jeder Messung auch rekombinantes TF Protein (TF) mit TF-AK oder entsprechender Kontrolle (rabbit IgG), sowie Kollagen mit Kollagenase oder entsprechender Kontrolle (Tesca) behandelt und anschließend die Thrombinbildung gemessen. Sehr interessant war die Auswertung der Parameter der Kinetik der Thrombinbildung. Die *lag time* wurde durch die Blockade des Plaque-TF signifikant von 6 ± 3 min (Plaque + IgG) auf 14 ± 5 min (Plaque + TF-AK) herausgezögert (Abb.25 A, n=6, *p<0,001). Die Auswirkungen waren etwas schwächer, als bei der zum Vergleich durchgeführten Inkubation von rekombinantem TF-Protein mit TF-AK (TF + IgG, TF + TF-AK, n=3, **p<0,001).

Die Hemmung der Plaque-Kollagen- induzierten Thrombinbildung hatte im Gegensatz dazu keinen signifikanten Einfluss auf die *lag time* der Thrombinbildung nach Plaque Zugabe (Abb. 25 B, n=6). Der Verdau fibrillären Kollagens durch Kollagenase zeigte hingegen eine hochsignifikante Verlängerung der *lag time* von $20,5 \pm 2,1$ min (Kollagen + Tesca, n=3) auf $38,4 \pm 11,1$ min (Kollagen + Kollagenase, n=3, ***p<0,001).

A



B

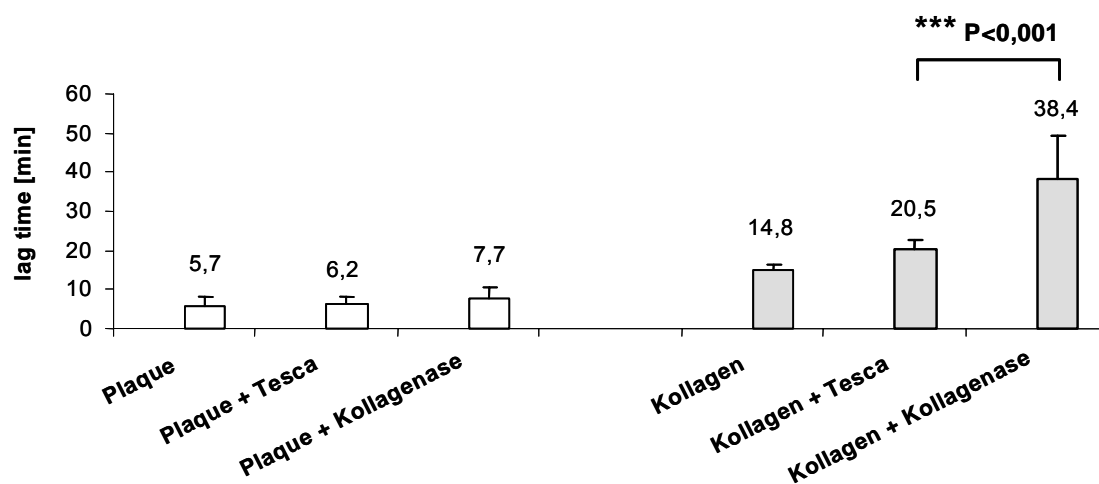


Abbildung 25: Einfluss von TF-AK und Kollagenase auf die Plaque-induzierte Thrombinbildung im PRP.

Plaque n=6 (6 verschiedene Plaques getestet an 3 verschiedenen Blutspendern, jede Messung in dreifacher Ausführung). (Tz-Zahl: 300000/ μ l). MW \pm SA. TF (Rekombiplastin, 0,1ng/ml) und Kollagen (fibrilläres Horn Kollagen 2,5 μ g/ml) und Plaque (1,5 μ l) wurden zum PRP gegeben (je n=3: 3 Blutspender, Messungen in dreifacher Ausführung). Zur Hemmung von TF bzw. Plaque-TF wurden TF (0,1ng/ml) bzw. Plaque (1,5 μ l) mit TF-AK (1 μ g) bzw. rabbit IgG (1 μ g) für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend zum PRP gegeben. Für den Kollagen-Verdau, bzw. Plaque-Kollagen-Verdau wurde Kollagen (2,5 μ g/ml) bzw. Plaque (1,5 μ l) über Nacht bei 37°C mit dem Enzym Kollagenase oder Tesca Puffer als Kontrolle inkubiert und anschließend zum PRP gegeben.

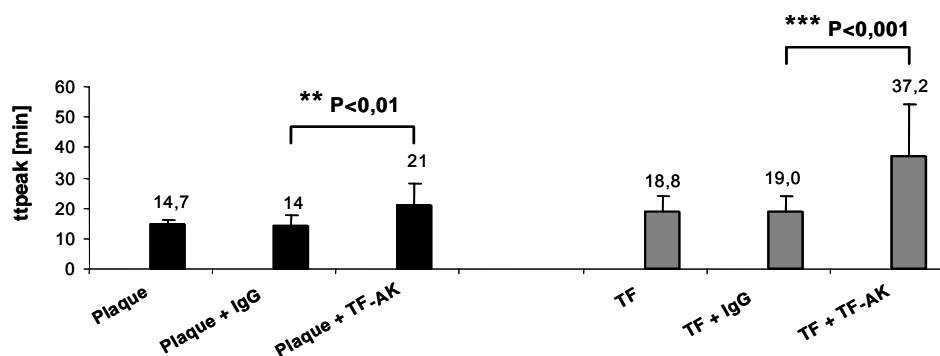
A Plaque-TF und TF-Blockade durch TF- AK. **B** Plaque-Kollagen und Kollagen-Abbau mittels Kollagenase.

Auch die *tpeak*-Werte waren nach Plaque-TF-Blockade signifikant verlängert auf 21 ± 7 min im Vergleich zur Kontrolle mit rabbit IgG 14 ± 4 min (Abb. 26 A). Die Hemmung von rekombinantem TF durch TF-AK ergab ebenfalls signifikant verlängerte *tpeak*-Werte.

Durch den Plaque- Kollagen-Abbau wurden die *tpeak*-Zeiten zwar signifikant, jedoch nur um 2 min von 14 ± 3 auf $16,4 \pm 5$ min verzögert (Abb.26 B, $n=6$, $p=0,026$). Somit war dies der einzige Parameter der Plaque-induzierten Thrombinbildung, der durch den Kollagen-Abbau beeinflusst werden konnte. Im Vergleich dazu bewirkte ein Kollagen-Verdau fibrillären Kollagens eine viel ausgeprägtere Verlängerung der Kollagen-induzierten *tpeak*-Zeiten von $26,3 \pm 2,4$ min $50,2 \pm 11,8$ min ($n=3$, $***p<0,001$).

Des Weiteren fiel auf, dass die *tpeak*-Zeiten bei Hemmung des rekombinanten TF Proteins viel stärker verlängert werden konnten, als bei Hemmung des Plaque-TF durch Anti TF-AK (Abb. 26 A).

A



B

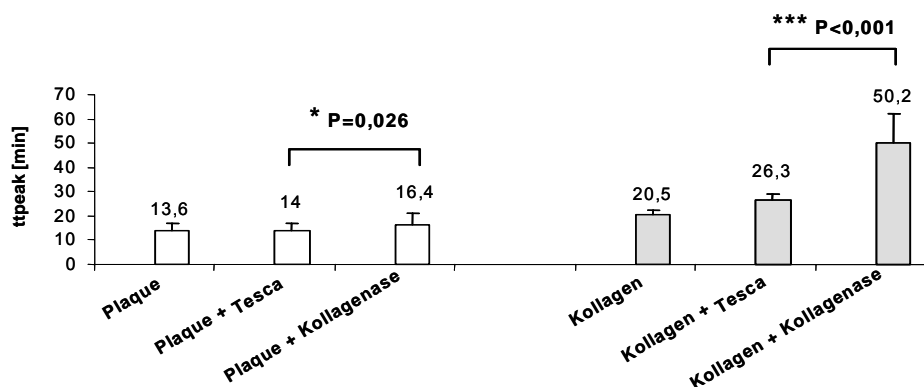


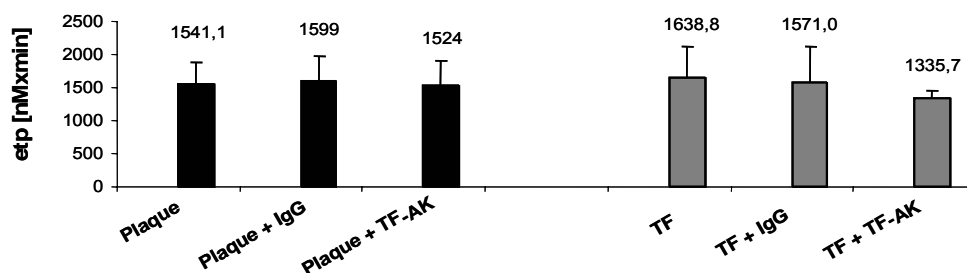
Abbildung 26: Einfluss von TF und kollagenen Strukturen auf die Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit der Thrombinbildung (*tpeak*) nach Plaque-Zugabe zum im PRP.

Plaque $n=6$ (6 verschiedene Plaques getestet an 3 verschiedenen Blutspendern, jede Messung in dreifacher Ausführung). (Tz-Zahl: 300000/ μ l). MW \pm SA. TF (0,1ng/ml) und Kollagen (2,5 μ g/ml) je $n=3$ (3 Blutspender, Messungen in dreifacher Ausführung. **A** Plaque-TF und TF-Blockade durch TF- AK. **B** Plaque-Kollagen und Kollagen-Abbau mittels Kollagenase.

Die Abbildungen 27 A und B zeigen, dass weder die Blockade des TF im Plaque, noch der Abbau des Kollagens im Plaque einen Einfluss auf das endogene Thrombin Potential (etp) nach Plaque-Zugabe hatten. Hier konnte jedoch auch bei Hemmung von rekombinatem TF

Protein mit TFAK und bei Verdau von fibrillärem Kollagen mit Kollagenase kein signifikanter Effekt gemessen werden. Das ist wahrscheinlich darauf zurück zu führen, dass nach Zugabe von CaCl_2 und MgCl_2 nach der langen Messzeit des etp von bis zu zwei Stunden unter allen Bedingungen auch nach Zugabe von Puffern zu PRP alles Thrombin, was entstehen kann, gebildet wird (endogenes Thrombin Potential).

A



B

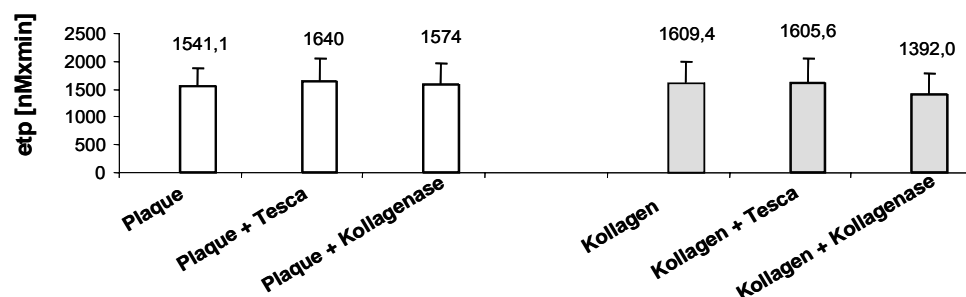


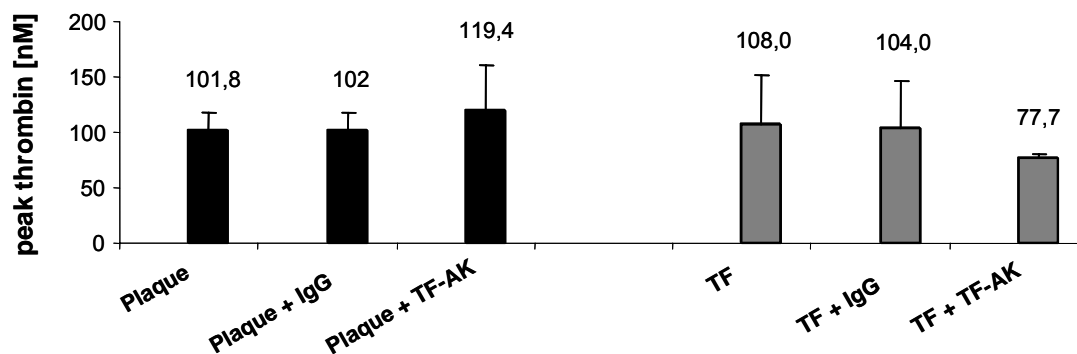
Abbildung 27: Einfluss von TF und kollagenen Strukturen auf das endogene Thrombin Potential (etp) der Plaque-induzierten Thrombinbildung im PRP.

Plaque n=6 (6 verschiedene Plaques getestet an 3 verschiedenen Blutspendern, jede Messung in dreifacher Ausführung). Tz-Zahl: 300000/ μl . MW \pm SA. TF (0,1ng/ml) und Kollagen (2,5 μg /ml) je n=3 (3 Blutspender, Messungen in dreifacher Ausführung). Zur Hemmung von TF wurde Plaque Homogenat (2,5mg/ml) oder TF (Rekombiplastin, 0,1ng/ml) für 10 min bei 37°C mit 1 μl TF-AK oder 1 μg rabbit IgG inkubiert und dann erst zugegeben. Für den Kollagen-Abbau durch Kollagenase wurde Plaque (20 μl) oder Kollagen (20 μg) zusammen mit 0,6 μg Kollagenase in 50 μl Tesca Puffer (50mM TES, 0,36mM CaCl_2) und additionellen 9mM CaCl_2 für 24h bei 37°C im Eppendorf Thermomixer bei starkem Schütteln über Nacht inkubiert. Als Kontroll-Inkubationen wurde die entsprechende Plaque Menge mit 12 μl TESCA Puffer und 18 μl einer 25 mM CaCl_2 Lösung auf analoge Weise inkubiert). **A** Plaque-TF und TF-Blockade durch TF- AK. **B** Plaque-Kollagen und Kollagen-Abbau mittels Kollagenase.

Die *peak thrombin*-Werte (Abb.28 A,B) nach Plaque-Zugabe wurden ebenfalls nicht beeinflusst. Die *peak thrombin*-Werte nach TF- oder Kollagen-Zugabe konnten durch TF-AK

bzw. Kollagenase deutlich reduziert werden, jedoch nicht signifikant (TF + rIgG, TF + TF-AK, Abb. 28 A; Kollagen + Kollagenase, TF + Tesca, Abb.28 B).

A



B

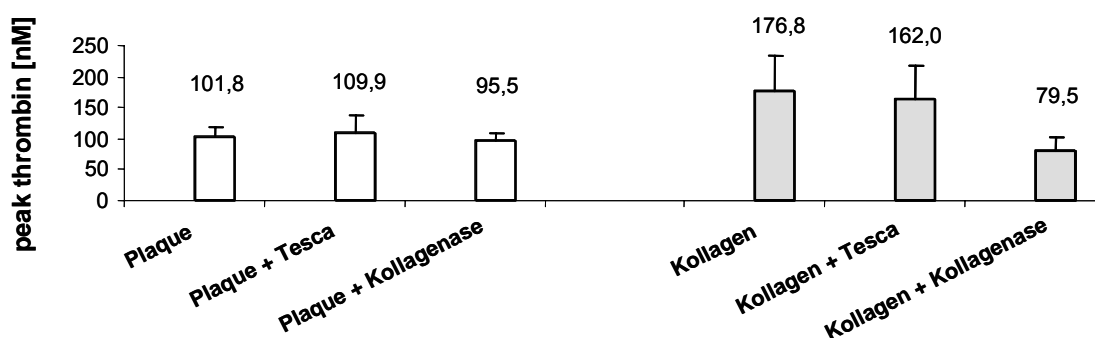


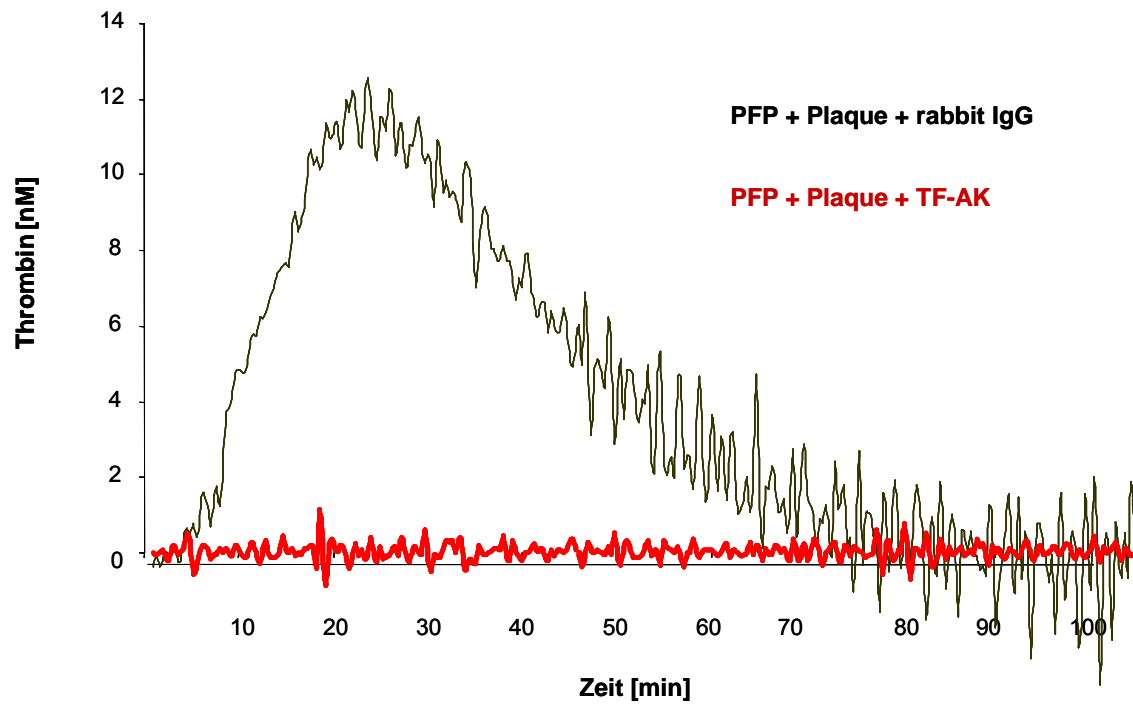
Abbildung 28: Einfluss von TF und kollagenen Strukturen auf die maximal gebildete Menge Thrombin (*peak thrombin*) der Plaque-induzierten Thrombinbildung im PRP.

Plaque n=6 (6 verschiedene Plaques getestet an 3 verschiedenen Blutspendern, jede Messung in dreifacher Ausführung). Tz-Zahl: 300000/μl. MW ± SA TF (0,1ng/ml) und Kollagen (2,5μg/ml) je n=3 (3 Blutspender, Messungen in dreifacher Ausführung). **A** Plaque-TF und TF-Blockade durch TF-AK. **B** Plaque-Kollagen-Abbau und Kollagen-Abbau mittels Kollagenase.

Schließlich wurden die Auswirkungen der TF Hemmung und der Kollagenase Behandlung noch im Plättchenfreien Plasma (PFP) untersucht. Da es im PFP keine Thrombozyten gibt, die durch kollagene Strukturen aktiviert werden könnten, war zu erwarten, dass hier die TF-Blockade im Plaque einen größeren Einfluss auf die Thrombinbildung hat, als im PRP. Die Abbildung 29 A zeigt, dass nach der TF-Hemmung eine nahezu vollständige Reduktion der Plaque-induzierten Thrombinbildung resultierte. Der Kollagen Abbau durch das Enzym

Kollagenase hatte im Gegensatz dazu erwartungsgemäß keinerlei Einfluss auf die Plaque-induzierte Thrombinbildung (Abb.29 B).

A



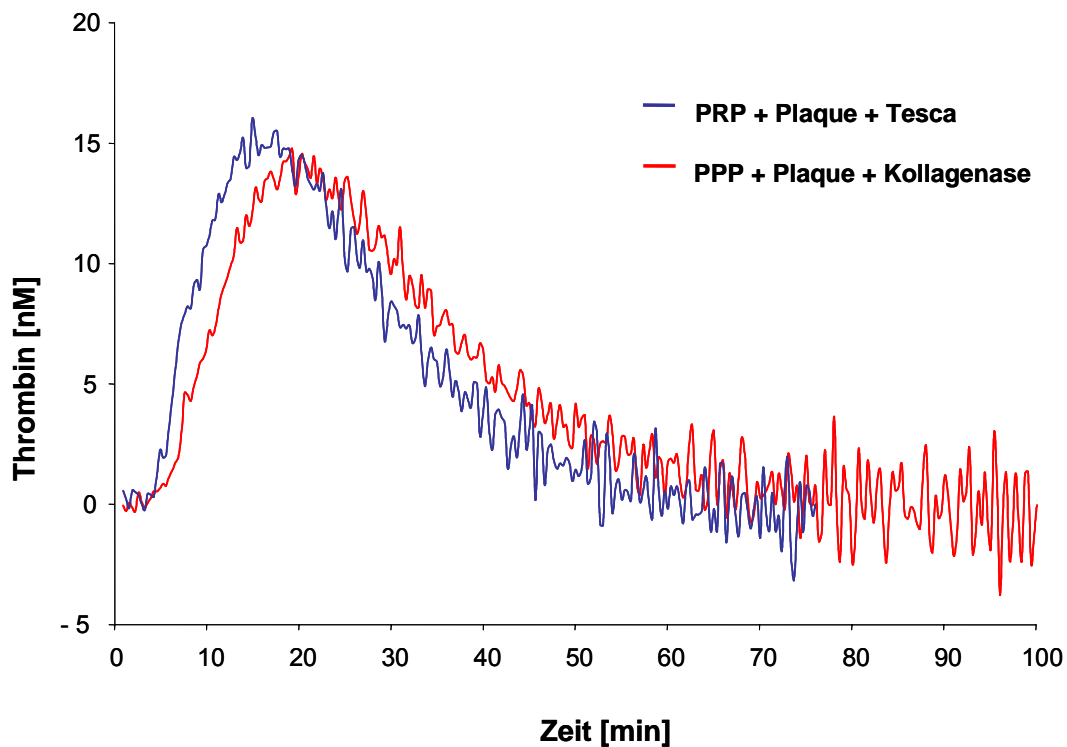
B

Abbildung 29: Einfluss von TF und kollagenen Strukturen im Plaque auf die Thrombinbildung im PFP.

Plaque (1,5 μ l), TF (0,1ng/ml). plaque n= 3 (3 verschiedene Plaques, ein Blutspender) TF n=1 (ein Blutspender, Messungen in dreifacher Ausführung). Zur Hemmung von TF wurde Plaque Homogenat (2,5mg/ml) für 10 min bei 37°C mit 1 μ l TF-AK oder 1 μ g rabbit IgG inkubiert und dann erst zugegeben. Für den Kollagen-Abbau durch Kollagenase wurde Plaque (20 μ l) zusammen mit 0,6 μ g Kollagenase in 50 μ l Tesca Puffer (50mM TES, 0,36mM CaCl₂) und additionellen 9mM CaCl₂ für 24h bei 37°C im Eppendorf Therrmomixer bei starkem Schütteln über Nacht inkubiert. Als Kontroll-Inkubationen wurde die entsprechende Plaque Menge mit 12 μ l TESCA Puffer und 18 μ l einer 25 mM CaCl₂ Lösung auf analoge Weise inkubiert). **A** Plaque + TF-Ak bzw. rabbit IgG. **B** Plaque + Kollagenase bzw. Tesca Puffer.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung als Balkendiagramme zusammengefasst. Alle Parameter der Thrombinbildung konnten bei Plaque-Zugabe durch TF-AK im Vergleich zu den Kontrollen mit rabbit IgG vermindert werden (Abb. 30 A-D). Die Auswirkungen waren etwas schwächer, als bei der zum Vergleich durchgeführten Inkubation von rekombinantem TF-Protein mit TF-AK.

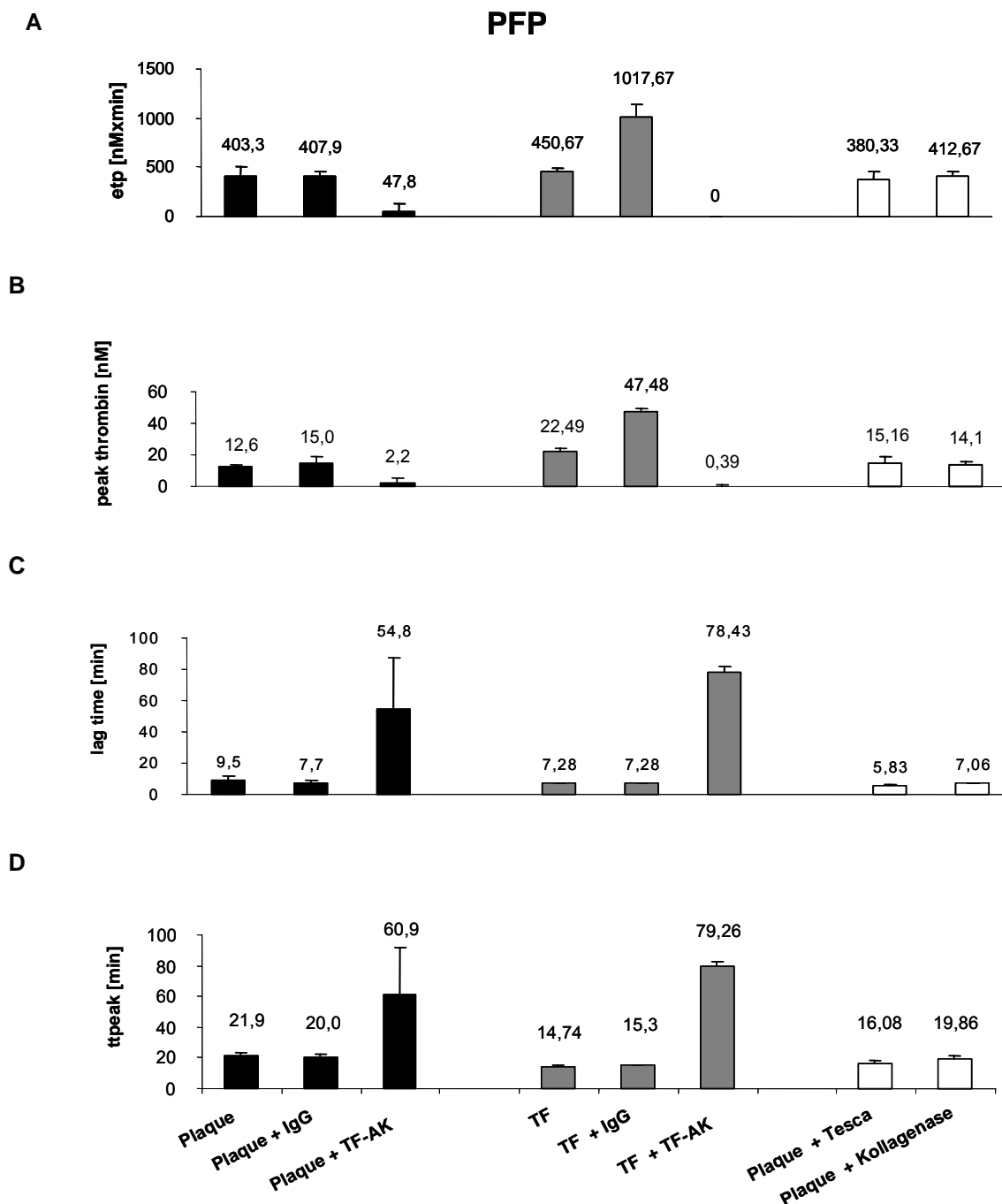


Abbildung 30: Einfluss von TF und kollagenen Strukturen auf die Plaque-induzierte Thrombinbildung im PFP

Plaque + TF-AK oder rabbit IgG n=3 (3 verschiedene Plaques getestet an einem Blutspender, jede Messung in dreifacher Ausführung). MW ± SA. TF (0,1ng/ml) n=1 (1 Blutspender, Messung in dreifacher Ausführung). Plaque + Kollagenase oder Tesca n=1. Zur Hemmung von TF wurde Plaque Homogenat (2,5mg/ml) oder TF (0,1ng/ml) für 10 min bei 37°C mit TF-AK (1µg) zusammen mit 0,6µg Kollagenase in 50µl Tesca Puffer (50mM TES, 0,36mM CaCl₂) und additionellen 9mM CaCl₂ für 24h bei 37°C bei starkem Schütteln über Nacht inkubiert. Als Kontrolle wurde die entsprechende Plaque Menge mit 12µl TESCA Puffer und 18µl einer 25 mM CaCl₂ Lösung auf analoge Weise inkubiert). **A** etp: endogenes Thrombin Potential: Fläche unter der Kurve, entspricht der Gesamtmenge Thrombin, die während der gesamten Messzeit (2h) gebildet wird. **B** peak thrombin: maximale gebildete Menge Thrombin. **C** lag time: Zeitspanne bis zum Beginn der Thrombinbildung. **D** tpeak: time to peak: Zeit bis zur maximalen Geschwindigkeit der Thrombinbildung.

5.3 Rolle der Plaque-, TF- und Kollagen-induzierten Fibrinbildung: Messungen mittels Thrombelastographie

5.3.1 Plaque-, TF- und Kollagen-induzierte Fibrinbildung im PPP, PRP und Blut

Zur Ermittlung der Fibrinbildungszeit verwendeten wir den Rotem[®] Thrombelastographen (siehe auch 4.3.6.3). Wir untersuchten, in welcher Zeit Plaque-Material, TF und Kollagen in Citrat PPP, PRP und Blut die Fibrinbildung (clotting time) induzierte (Abb.31 A). Alle Experimente wurden in Anwesenheit von CaCl_2 und MgCl_2 durchgeführt, um die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren zu ermöglichen. CTI wurde zugegeben, um die Kontaktaktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems zu verhindern. Die Messdauer betrug 25 Minuten. Um zu gewährleisten, dass während dieser Zeit keine Spontangerinnung auf Grund der Ionen-Zugabe stattfand, wurden bei jedem Experiment Kontroll-Messungen durchgeführt. Dabei wurden nur CaCl_2 , MgCl_2 und CTI zu plättchenarmen Plasma (PPP), plättchenreichem Plasma (PRP) oder Blut gegeben. Bis 25 Minuten nach Zugabe konnte hierbei keine Gerinnung registriert werden (nicht gezeigt).

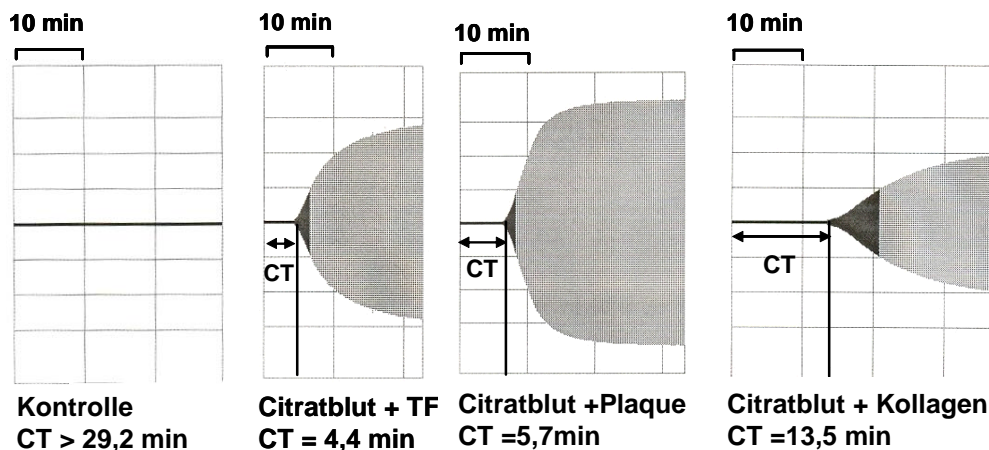
Es wurden 36 Plaques, die nach Thrombendarterektomie (TEA) bis zur Weiterverarbeitung semisteril bei 4°C gelagert wurden (Aufbereitungsmethode A, siehe 4.3.1), an 15 verschiedenen Blutspendern getestet (Abb. 31 B). Die Fibrinbildungszeiten waren im PRP mit $8,2 \pm 3,4$ min statistisch signifikant kürzer als im PPP mit $11,4 \pm 5,0$ min (MW \pm SA, n= 36, $p < 0,0001$). Im Blut lagen die Fibrinbildungszeiten mit $7,8 \pm 1,7$ min im Bereich der Werte im PRP. Außerdem wurden neun weitere Plaques getestet, die unmittelbar nach TEA mit flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden und bis zur Homogenisierung unter streng sterilen Bedingungen bei -80°C aufbewahrt wurden (Aufbereitungsmethode B, siehe 4.3.1). Die unterschiedlichen Verfahren der Plaque-Behandlung nach TEA schienen sich auf die Plaque-induzierten Fibrinbildungszeiten im PPP und PRP auszuwirken. Denn bei diesen Plaques unterschieden sich die Fibrinbildungszeiten im PPP mit $9,2 \pm 4,4$ min und im PRP mit $9,1 \pm 4,1$ min (MW \pm SA, n=9) nicht voneinander.

Von manchen Plaques wurde nur der lipidreiche Kern erhalten. Die Gerinnungsaktivität dieser Homogenate von drei verschiedenen Patienten wurde im Blut getestet. Die Gerinnungszeit betrug durchschnittlich $15,2 \pm 0,4$ min und war damit deutlich langsamer als bei Zugabe von Homogenaten bestehend aus dem gesamten atherosklerotischen Plaque. Durch die Inkubation der lipidreichen Kerne mit einem spezifischen TF-AK konnte diese Fibrinbildung nahezu vollständig inhibiert werden (siehe 5.3.2).

Bei der Zugabe von TF (0,1ng/ml) zu PPP, PRP oder Blut wurde eine Konzentration verwendet, die in dem Bereich lag, welcher entsprechend unseren Untersuchungen mit Western Blot Technik in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen wurde (Ergebnisse nicht gezeigt). Laut Literatur liegt die Konzentration etwas niedriger bei 0,03-0,05ng/mg Plaque Feuchtgewicht (Ardissino et al., 1997; Cortellaro et al., 2002). Wir beobachteten, dass eine Zugabe von TF (0,1ng/ml) zum PPP nach $9,8 \pm 3,9$ min zu einer Fibrinbildung führte. Statistisch signifikant kürzer waren die Gerinnungszeiten im PRP mit $6,4 \pm 1,5$ min und im Blut mit $5,6 \pm 2$ min (Abb. 31 C, MW \pm SA, n=16, p< 0,005).

Weder bei der Zugabe von 2,5 μ g/ml Kollagen, noch bei Zugabe der 5-fachen Konzentration, konnte im PPP bis 25 min nach Zugabe eine Fibrinbildung registriert werden (Abb. 31 D). Im PRP und Blut wurde nach Stimulation mit der niedrigen Konzentration erst sehr spät eine Fibrinbildung gemessen (nach $22 \pm 3,5$ min im PRP und nach $19,6 \pm 4,8$ min im Blut, MW \pm SA, n=13). Diese Werte waren durchschnittlich nur 3 min kürzer, als die Kontrollwerte ohne Agonisten-Zugabe, ausschließlich mit CaCl₂ und MgCl₂. Die hohe Kollagen-Konzentration verursachte eine schnellere Gerinnung: im PRP nach $13,5 \pm 2,2$ min und im Blut nach $16,4 \pm 5,9$ min (MW \pm SA, n=9).

A



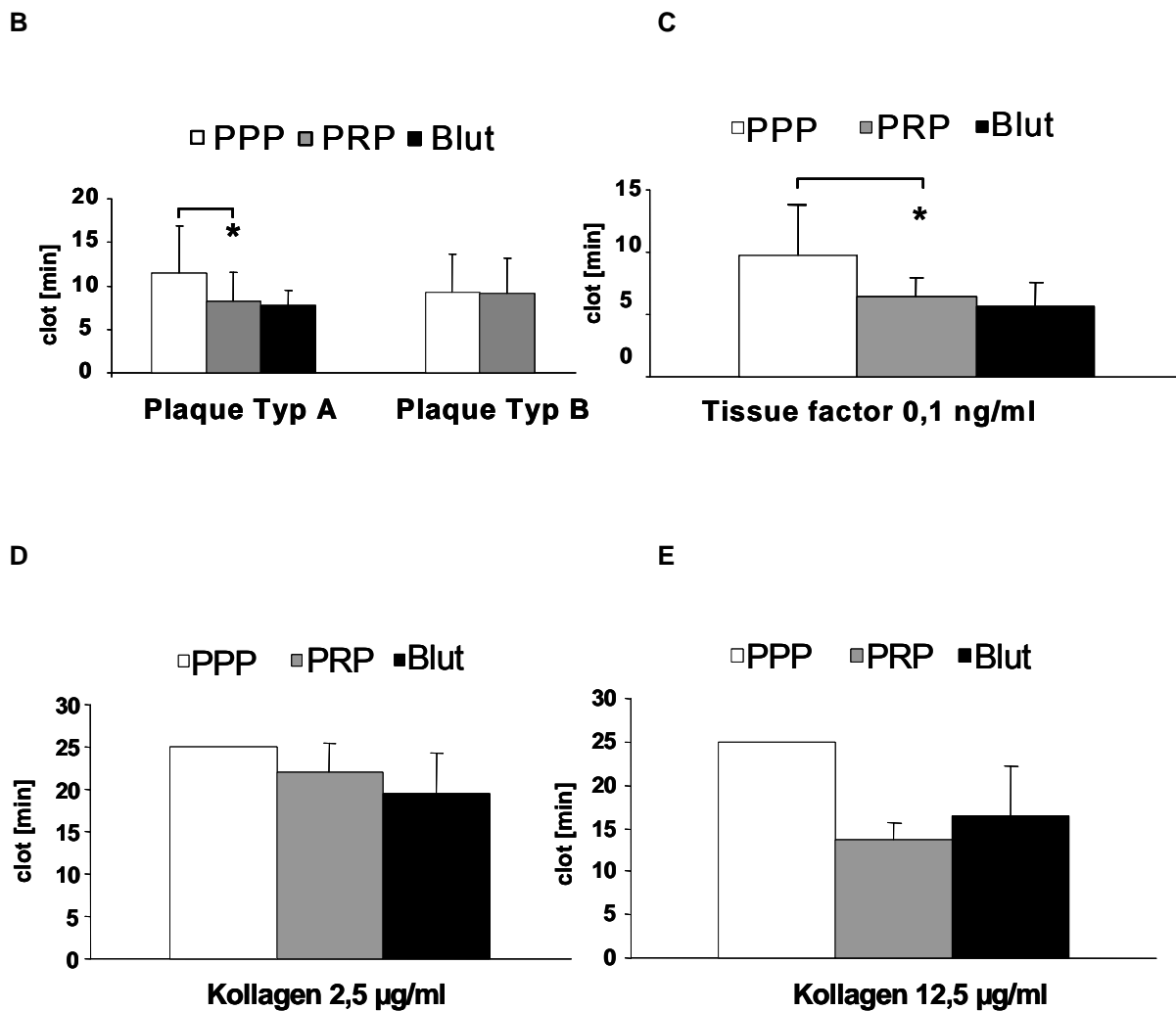


Abbildung 31: Vergleich der Plaque- und TF- und Kollagen-induzierten Fibrinbildung im PPP, PRP und Blut.

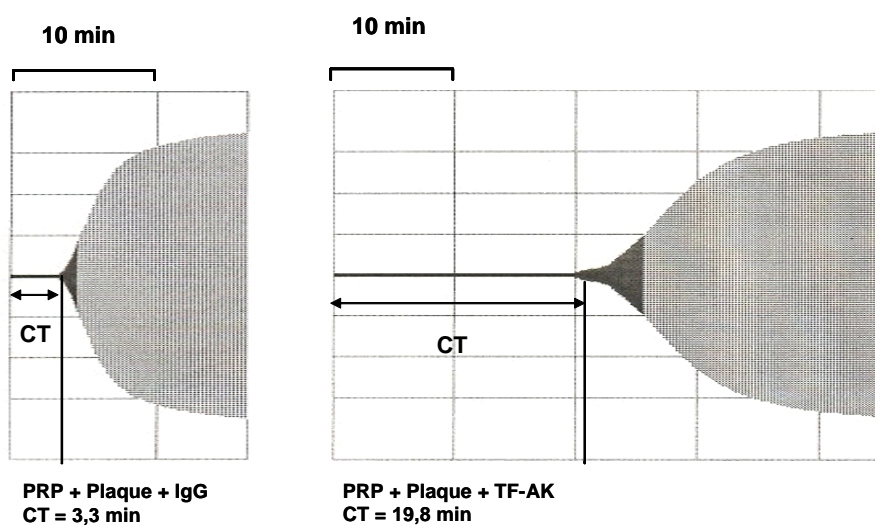
Die Experimente wurden in Anwesenheit von CaCl_2 (12mM), MgCl_2 (0,1mM) und CTI (32µg/ml) durchgeführt. Als Kontrolle wurde bei jeder Messung im PPP, PRP und Blut nur CaCl_2 , MgCl_2 und CTI zugegeben und es konnte bis 25 min keine Fibrinbildung gemessen werden (n=26). **A** Die Fibrinbildungskurven im Citratblut sind bei Plaque repräsentativ für n=36 Experimente; TF (0,1ng/ml) n= 9 Experimente; Kollagen 12µg/ml n= 13 Experimente; CT = Clotting time = Fibrinbildungszeit. **B** Balkendiagramme der Plaque-induzierten Fibrinbildung. MW \pm SA. Plaque Typ A (n=36, Aufbereitungsmethode A) *p<0,0001 im Vergleich zur Fibrinbildungszeit im PPP; Plaque Typ B (n=9, Aufbereitungsmethode B). **C** Balkendiagramme der TF-induzierten Fibrinbildung. MW \pm SA. TF n= 16, *p< 0,005. **D, E** Balkendiagramme der Kollagen-induzierten Fibrinbildung. MW \pm SA. Kollagen 12,5µg/ml n= 9 und Kollagen 2,5 µg/ml n= 13.

5.3.2 Rolle von TF im Plaque

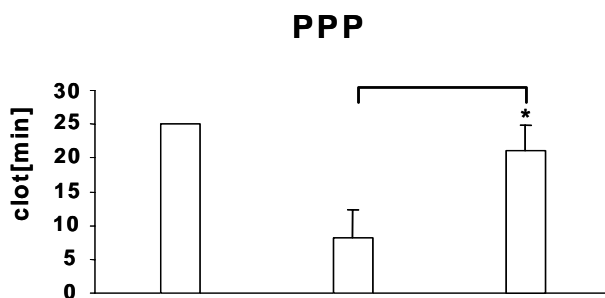
Bereits bei den Untersuchungen im Aggregometer (5.1.4) und im Thrombogram (5.2.4) konnte gezeigt werden, dass der in atherosklerotischem Plaque vorhandene TF maßgeblich für die Plaque-induzierte Gerinnung und für die Kinetik der Plaque-induzierten Thrombinbildung (*lag time, time to peak*) verantwortlich ist. Basierend auf diesen Ergebnissen erwarteten wir, dass der Plaque-TF im Wesentlichen verantwortlich ist für die Verkürzung der Fibrinbildungszeit im Rotem[®].

Die TF induzierte Fibrinbildungszeit (siehe 5.3.1) konnte als Kontrolle für die Funktionalität des TF-AK sowohl im PPP, PRP, als auch im Blut auf > 25 min herausgezögert werden (nicht gezeigt). Es wurden Plaques der Aufbereitungsmethode A und B verwendet (siehe Material und Methode), die sich aber bezüglich der Wirkung von TF-AK nicht unterschieden und deswegen zusammengefasst wurden. Die Blockade des Plaque-TF bewirkte ebenso eine signifikante Verlängerung der Plaque-induzierten Gerinnung in PPP, PRP und Blut. (Abb.32 A-D). Atherosklerotisches Plaque-Homogenat induzierte im PPP nach Inkubation mit dem Kontroll-AK (IgG) nach $8,2 \pm 4,1$ min eine Gerinnung (Abb.32 B). Nach TF-Hemmung trat erst nach $21 \pm 3,9$ min Fibrinbildung ein. Im PRP wurde die Gerinnungszeit von $21 \pm 3,9$ min auf $8,2 \pm 4,1$ min verkürzt (Abb.32 C). Im Blut verursachten mit Kontroll-AK inkubierte Plaques nach $9,0 \pm 3,8$ min eine Fibrinbildung, und die TF-Blockade resultierte in einer Gerinnungszeit von $18,0 \pm 3,2$ min (MW \pm SA, Abb.32 D).

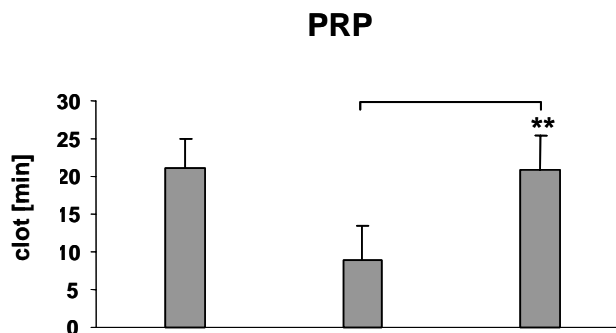
A



B



C



D

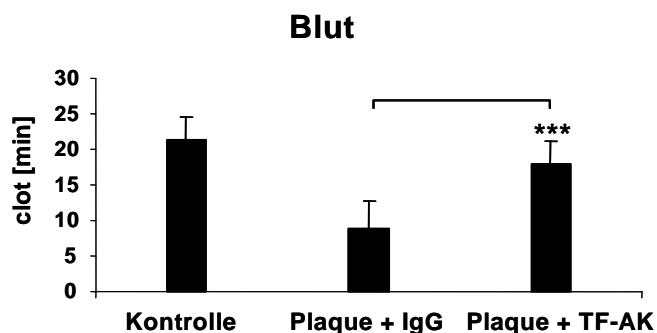


Abbildung 32: Hemmung der Plaque-induzierten Fibrinbildung durch TF-AK in PPP, PRP und Blut.

Plaque-Material (5 μ l) der Aufbereitungsmethode A (n= 15 Plaques) und B (n=6 Plaques) wurde 10min mit TF-AK (1 μ g) oder entsprechendem IgG Kontroll-AK aus Kaninchen (rabbit IgG, 1 μ g) bei 37°C inkubiert und zu PPP, PRP oder Blut gegeben, das vorher 2 min lang bei 37°C mit CTI (32 μ g/ml) inkubiert wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von CaCl₂ (12mM), MgCl₂ (0,1mM) gestartet. Als Kontrolle wurde bei jeder Messung im PPP, PRP und Blut nur CaCl₂, MgCl₂ und CTI zugegeben und es konnte im PPP bis 25 min keine Fibrinbildung gemessen werden (n=15). Im PRP und Blut lagen die Kontrollwerte bei durchschnittlich 21 \pm 3,3 min. **A** Einfluss von TF-AK auf die Plaque-induzierte Fibrinbildung im PRP. Die Fibrinbildungskurven ist repräsentativ für n=10 Experimente. **B** PPP, MW \pm SA, n=9 (9 verschiedene Plaques, 9 verschiedene Blutspender), *p<0,0001 im Vergleich zu Plaque mit IgG. **C** PRP, MW \pm SA, n=10 (10 verschiedene Plaques, 10 verschiedene Blutspender), **p<0,0001 im Vergleich zu Plaque mit IgG. **D** Blut, MW \pm SA, n=12 (12 verschiedene Plaques, 12 verschiedene Spender), ***p<0,0001 im Vergleich zu Plaque mit IgG.

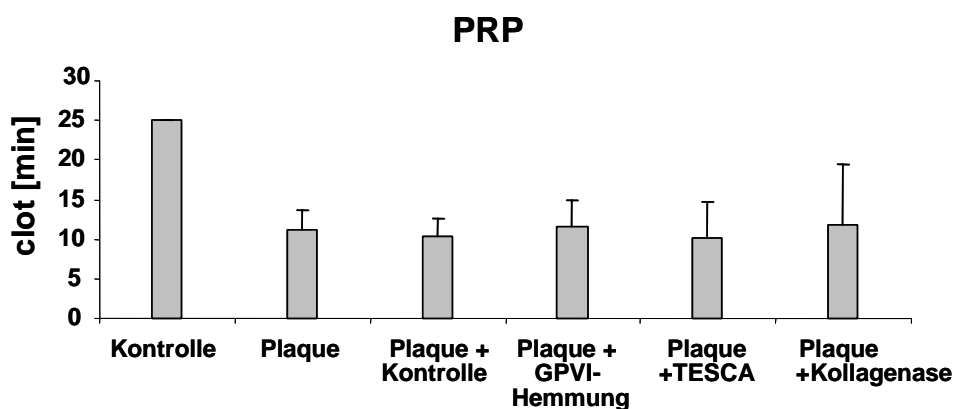
Auch die Gerinnungszeit der Plaque Homogenate, die ausschließlich aus dem lipidreichen Kern eines atherosklerotischen Plaques bestanden (siehe auch 5.3.1), konnte durch die TF-Blockade von $16,1 \pm 3,3$ min (lipidreicher Kern \pm rabbit IgG) auf $21,9 \pm 4,4$ min (lipidreicher Kern + TF-AK) herausgezögert werden.

5.3.3 Rolle von kollagenen Strukturen und GPVI-Aktivierung

Die Auswirkung des Abbaus von Plaque-Kollagen mittels Kollagenase und die Auswirkungen einer GPVI-Hemmung auf die Plaque-induzierte Fibrinbildungszeit im PRP und Vollblut wurden ebenfalls untersucht. Die Untersuchungen wurden nicht im PPP durchgeführt, da in diesem Medium so gut wie keine Thrombozyten vorhanden sind, die durch kollagene Strukturen aktiviert werden könnten. Die Abbildungen 33 A und B verdeutlichen, dass weder ein Kollagen Verdau mittels Kollagenase, noch die Blockade des thrombozytären Kollagen Rezeptors GPVI einen Einfluss auf die Plaque-induzierte Fibrinbildungszeit in PRP und Blut haben.

In einem weiteren Versuch wurden die Kollagene Typ I und III im Plaque mit Antikörpern blockiert (n=1). Diese Hemmung hatte ebenso keinen Effekt auf die Plaque-induzierte Fibrinbildung (nicht dargestellt).

A



B

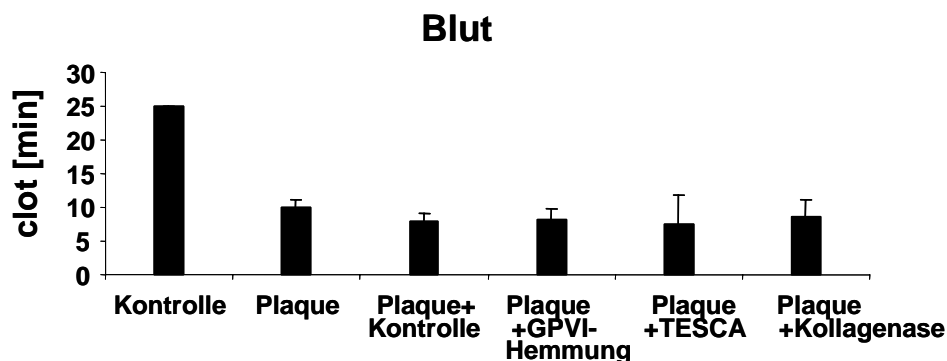


Abbildung 33: Einfluss der GPVI- Blockade und des enzymatischen Kollagen-Abbaus auf die Plaque-induzierte Fibrinbildung.

Als Kontrolle wurde bei jeder Messung im PPP, PRP und Blut nur CaCl_2 , MgCl_2 und CTI zugegeben und es konnte bis 25 min keine Fibrinbildung gemessen werden ($n=15$). Plaque: $5\mu\text{l}$ Plaque Homogenat (Aufbereitungsmethode A, $n=16$ Plaques ; Aufbereitungsmethode B $n=6$ Plaques). Plaque + Kontrolle: Zusammengefasst sind Messungen mit IgG aus Ratte als Kontrolle für den GPVI-AK (5C4) und Messungen mit Fc-Protein ($16\mu\text{g}$) als Kontrolle für das rekombinante GPVI-Fc. GPVI-AK oder Kontroll-AK (IgG aus Ratte) wurden zum PRP oder Blut 5 min vor Plaque-, CaCl_2 - und MgCl_2 -Zugabe gegeben. Das rekombinante GPVI-Fc oder entsprechende Fc-Kontrolle wurde mit dem Plaque für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zum PRP oder Blut gegeben. Für den enzymatischen Kollagen-Abbau wurden verschiedene Plaques über Nacht mit dem Enzym Kollagenase oder Kontrollpuffer (TESCA) im Thermoschüttler inkubiert und am nächsten Tag im PRP und Blut getestet. **A** Messungen im PRP (Tz: $300000/\mu\text{l}$): $\text{MW} \pm \text{SA}$. Plaque + Kontrolle: $n=4$ (4 verschiedene Plaques und 4 verschiedene Blutspender), davon drei Messungen mit GPVI-AK (5C4) und eine Messung mit rekombinantem GPVI-Fc. Mit dem Enzym Kollagenase wurden 16 verschiedene Plaques inkubiert und an 6 verschiedenen Blutspendern getestet. **B** Messungen im Citrat-Blut: $\text{MW} \pm \text{SA}$. Plaque + Kontrolle: $n=5$ (5 verschiedene Plaques und 5 verschiedene Blutspender), davon drei Messungen mit GPVI-AK (5C4) und zwei Messungen mit rekombinantem GPVI-Fc. Mit dem Enzym Kollagenase wurden 15 verschiedene Plaques inkubiert und an 4 verschiedenen Blutspendern getestet.

5.3.4 Versuche im heparinisierten Blut

Eine Antikoagulation mit niedermolekularem Heparin (LMWH) ist aufgrund seiner Vorteile gegenüber dem unfraktionierten Heparin eine in der Klinik häufig angewendete Methode zur Thromboseprophylaxe (Xiao and Theroux, 1998). Deswegen wurden Versuche mit Blut durchgeführt, das mit niedermolekularem Heparin (*low molecular weight heparin, LMWH*) antikoaguliert worden war. Es wurde eine niedrige Konzentration von $0,4$ Units/ml gefunden, die eine spontane Gerinnung innerhalb der ersten drei Stunden nach Blutentnahme verhinderte, aber nach Aktivierung der Gerinnungskaskade eine Thrombin- und Fibrinbildung durch exogenen TF und atherosklerotisches Plaque-Material ermöglichte. Wir verglichen die Gerinnungszeiten nach Plaque-, TF- und Kollagen-Zugabe in Anwesenheit von CTI (Abb.34). Atherosklerotischer Plaque induzierte nach $10,8 \pm 1,3$ min, TF ($0,5$ ng/ml) nach $5 \pm 1,7$ min

und Kollagen (12,5µg/ml) nach $16,6 \pm 1,2$ min die Fibrinbildung (MW \pm SA). In der Kontrolle war bis zu 25 min lang keine Fibrinbildung nachweisbar. Somit waren die Werte für die Plaque- und TF-induzierte Gerinnungszeit insgesamt etwas langsamer als im recalcifizierten Citrat-Blut (5.3.1). Im Citrat-Blut wurde sogar nur 1/5 der hier verwendeten TF-Konzentration eingesetzt (0,1ng/ml). Die Werte bei der durch Kollagen (12,5µg/ml) induzierten Gerinnung waren im Citrat-Blut und im LMWH-Blut nahezu identisch (5.3.1).

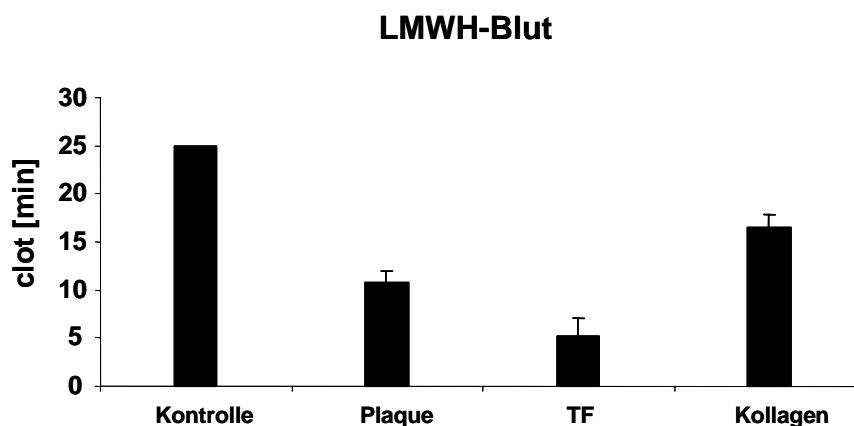


Abbildung 34: Plaque- TF- und Kollagen- induzierte Fibrinbildung in LMWH-Blut.

Als Kontrolle wurde bei jeder Messung nur CaCl_2 (12mM), MgCl_2 (0,1mM) und CTI (32µg/ml) zugegeben und es konnte bis 25 min keine Fibrinbildung gemessen werden (n=4). MW \pm SA, Plaque (5µl, Aufbereitungsmethode A) n=3, TF (0,5ng/ml) n=3, Kollagen (12,5 µg/ml) n=3.

Anschließend wollten wir wissen, ob durch die Hemmung des TF im Plaque-Material auch bei dieser Art der Antikoagulation eine Verzögerung der Plaque-induzierten Gerinnung erreicht werden konnte. In dem folgenden Balkendiagramm (Abb.35) sind die Ergebnisse der Testung zusammengefasst. Wie im Citrat-Blut konnte die TF-induzierte Fibrinbildungszeit auch im Heparin-Blut durch den TF-AK komplett inhibiert werden (>25 min, nicht dargestellt).

Plaque alleine induzierte nach $10,8 \pm 1,3$ min die Fibrinbildung. Die Gerinnungszeit nach Inkubation des Plaque Homogenats mit rabbit IgG als Kontrolle zu TF-AK betrug $13,5 \pm 5,2$ min. Nach der Blockade des Plaque-TF betrug die Gerinnungszeit $21,2 \pm 6,5$ min (MW \pm SA) und war damit um durchschnittlich 7,7 min verlängert. Somit war auch bei dieser Art der Antikoagulation die Fibrinbildungszeit wesentlich von dem Plaque-TF abhängig.

LMWH-Blut

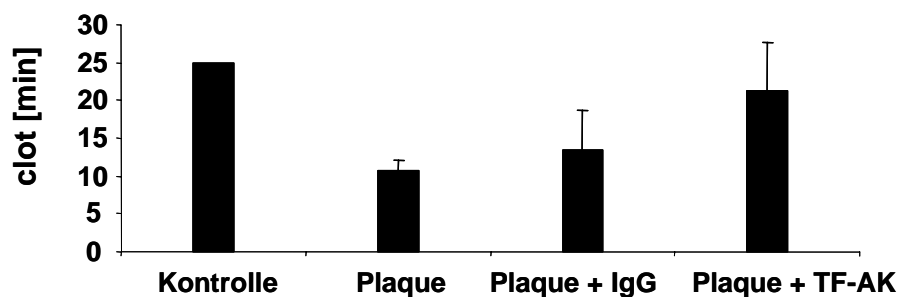


Abbildung 35: Einfluss der Hemmung des Plaque-TF mittels TF-AK auf die Plaque-induzierte Fibrinbildung in LMWH-Blut.

Als Kontrolle wurde bei jeder Messung nur CaCl_2 (12mM), MgCl_2 (0,1mM) und CTI (32 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben und es konnte bis 25 min keine Fibrinbildung gemessen werden (n=4). MW \pm SA. Blut wurde vor Messbeginn mit CTI (32 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt. Plaque (Aufbereitungsmethode A, 5 μl , n=3) wurde mit IgG aus Kaninchen (1 μg) oder TF-AK (1 μg) für 10 min bei 37°C inkubiert (n=3) und anschließend zum LMWH-Blut (0,4Units/ml) gegeben.

5.4 Analyse von Plaque-induzierter Thrombozytenadhäsion, -aggregation und Fibrinbildung in fließendem Blut

5.4.1 Messungen im heparinisiertem Blut: Rolle von GPVI und TF für die thrombozytäre Adhäsion und Aggregation

Zunächst richteten wir unseren Fokus auf die Plaque-induzierte Thrombozytenadhäsion und -aggregation unter arteriellen Strömungsbedingungen. Dabei interessierte uns der Einfluss der Blockade des Plaque-TF und des thrombozytären GPVI Rezeptors. Es wurden Plaques der Aufbereitungsmethode A verwendet (siehe 4.3.1). Für die Flussversuche wurde Blut zunächst mit niedermolekularem Heparin (0,4 Einheiten/ml Blut) und zur Hemmung der intrinsischen Gerinnung mit CTI (32µg/ml) versetzt. Unmittelbar nach Flussbeginn begannen die Thrombozyten ausschließlich an dem Plaque-Material zu adhären und anschließend Aggregate zu bilden. Innerhalb der ersten Minuten nach Strömungsbeginn bildeten sich zahlreiche stabile Aggregate unterschiedlicher Größe, die nicht embolisierten. Als Kontrolle wurden Glasdeckplättchen mit Albumin (5%BSA) beschichtet und zehn Minuten lang mit heparinisiertem Blut überströmt. Es zeigte sich keine Adhäsion oder Aggregation auf dieser Oberfläche.

Wurde Blut über einen Plaque geströmt, der mit Fc-Kontrollprotein vorbehandelt worden war, zeigte sich im Vergleich zum nicht vorbehandelten Plaque 3min nach Strömungsbeginn ein unverändert hohes Adhäsions- und Aggregationsverhalten der Thrombozyten (Abb.36 A). Nach dreiminütigem Blutfluss über die vorbehandelten Plaques von drei Patienten war in zehn verschiedenen Gesichtsfeldern die durchschnittliche Anzahl der Aggregate 30 ± 5 mit einer gesamten Aggregat-Fläche von 5055 ± 1202 (MW \pm SA, n=3). Bei Vorbehandlung der Plaques mit rekombinantem GPVI-Fc kam es zwar zum transienten Anhaften der Thrombozyten, aber eine permanente Aggregation wurde in den ersten 3 min nach Beginn des Blutflusses nicht beobachtet (Abb.36 B). Hier betrug die Anzahl der Aggregate durchschnittlich 3 ± 4 pro 10 Gesichtsfelder. Der Mittelwert der Fläche war 1804 ± 1563 (MW \pm SA, n=3). Die Multiplikation der Thrombozyten-Aggregatfläche mit der Anzahl der Thrombozytenaggregate ergab eine durchschnittliche Aggregatfläche von $163410 \mu\text{m}^2$ bei der Beschichtung von Plaque mit Fc-Kontrollprotein. Im Vergleich dazu reduzierte sich die durchschnittliche Aggregatfläche auf $7773\mu\text{m}^2$ bei Beschichtung von Plaque, der mit GPVI-Fc vorbehandelt worden war (Abb.36 C).

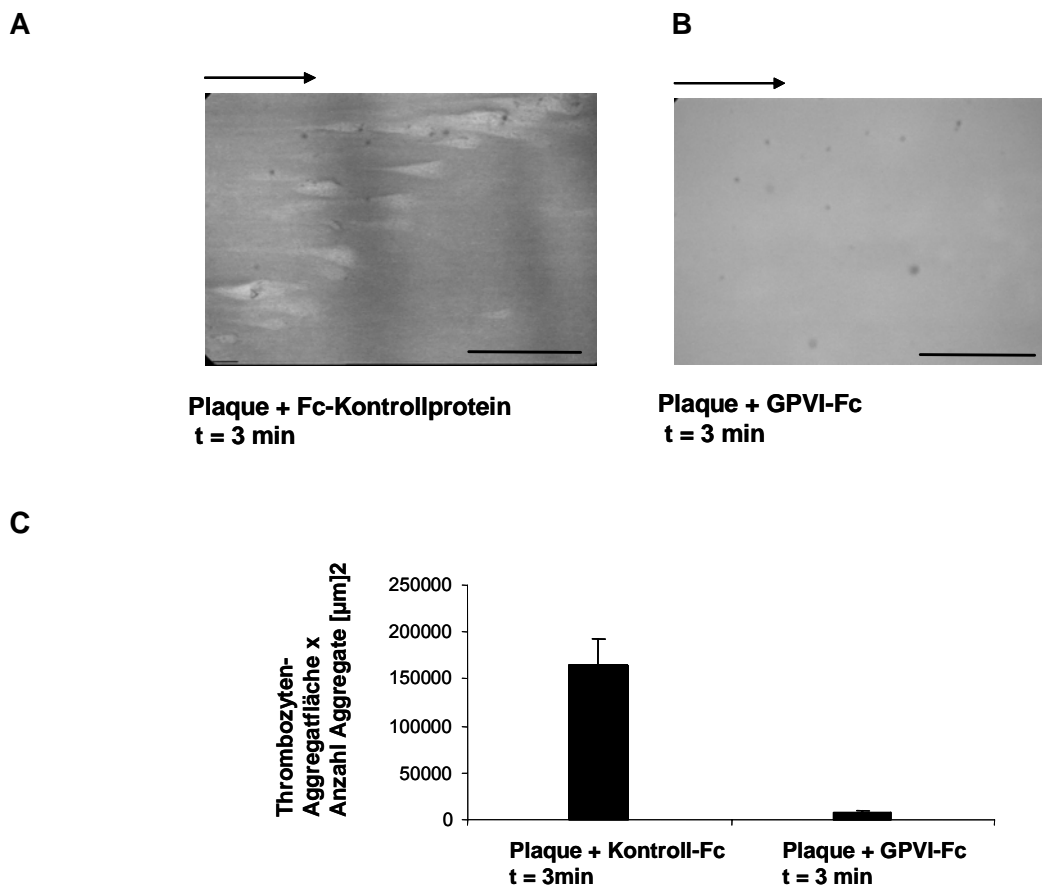


Abbildung 36: Einfluss von rekombinantem GPVI-Fc auf die Plaque-induzierte Adhäsion und Aggregation unter arteriellem Blutfluss zum Zeitpunkt $t = 3$ min nach Flussbeginn.

Das heparinisierte Blut (0,4 Einheiten/ml LMWH) floss in Anwesenheit von CTI (32µg/ml) mit einer Scherrate von 1500/s über die mit Plaque beschichteten Glasdeckplättchen (Plaque während des Blutflusses nicht sichtbar). Hellfeldmikroskopie, Balken entspricht 50µm. Objektiv 40x, zoom 1,0. Strömungsrichtung von links nach rechts (Pfeil). Die Bilder sind repräsentativ für $n=3$ Experimente (3 verschiedene Plaques, Aufbereitungsmethode A, getestet an 3 verschiedenen Blutspendern). **A** Mit Fc-Kontrollprotein (11µg/mg Plaque) vorbehandeltes Plaque-Homogenat (nicht sichtbar, 0,15mg). Es zeigen sich stabile Aggregate auf den Plaques. **B** Mit rekombinantem GPVI-Fc (11µg/mg Plaque) vorbehandelter Plaque (nicht sichtbar). Keine thrombozytäre Aggregation vorhanden. **C** Balkendiagramm: Darstellung der Thrombozyten-Aggregatfläche x der Anzahl der Thrombozytenaggregate pro 10 ausgewerteten Gesichtsfeldern. Als Fehlerindikator diente die SEM (*standard error of the mean*, siehe 4.3.8.1).

Ab der vierten Minute nach Flussbeginn begannen die Thrombozyten jedoch an die Plaques zu adhären und bildeten im weiteren Verlauf stabile Aggregate, sowohl im Falle der Vorbehandlung mit dem Fc-Kontrollprotein (Abb.37 A), als auch nach Vorbehandlung mit GPVI-Fc (Abb. 37 B). Die mittlere Aggregatzahl und Fläche unterschieden sich nicht mehr voneinander.

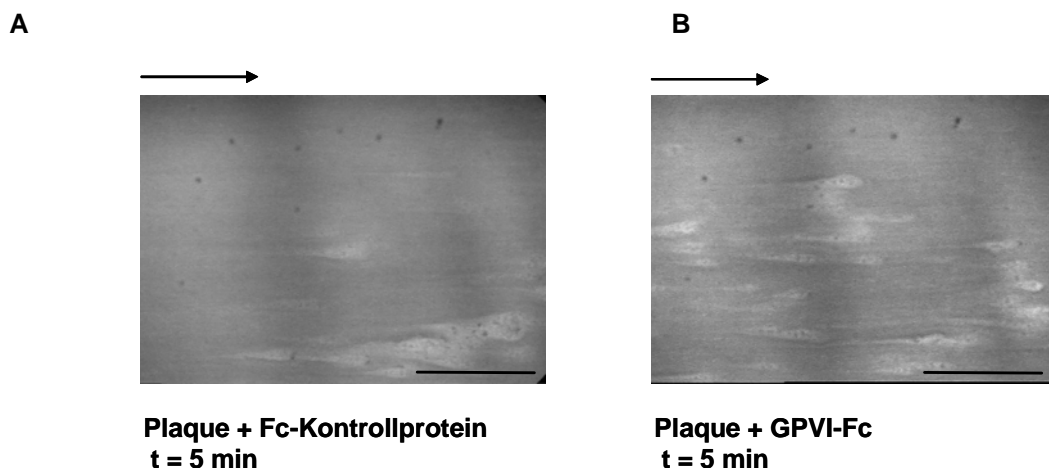


Abbildung 37: Einfluss von rekombinatem GPVI-Fc auf die Plaque-induzierte Adhäsion und Aggregation unter arteriellem Blutfluss zum Zeitpunkt $t = 5$ min nach Flussbeginn.

Hellfeldmikroskopie, Objektiv 40x, zoom 1,0. Balken entspricht 50 μ m. Zusätzliche Angaben siehe Abb. 36. **A** Stabile Thrombozyten-Aggregate auf der mit Fc-Kontrollprotein vorbehandelten Plaque-Beschichtung. **B** Auch auf den mit rekombinatem GPVI-Fc vorbehandelten Plaques stabile Thrombozytenaggregate vorhanden.

Somit konnte durch das rekombinante GPVI lediglich die Zeitspanne bis zum Beginn der thrombozytären Adhäsion und Aggregation um $3 \pm 0,5$ min (MW \pm SA) hinausgezögert werden.

Die Blockade des TF in den Plaque Homogenaten war ohne Effekt auf die thrombozytäre Adhäsion und Aggregation (Abb. 38 A,B). Weder die Zeitspanne bis zum Beginn der Adhäsion und Aggregation noch das Ausmaß der Aggregation wurden durch die TF-Blockade verändert. Hervorzuheben ist, dass alle untersuchten Plaques eine Fibrinbildung in antikoaguliertem Blut (LMWH, 0,4 U/ml) zeigten, und dass diese durch eine Vorbehandlung mit TF-AK hemmbar war (siehe 5.3.4).

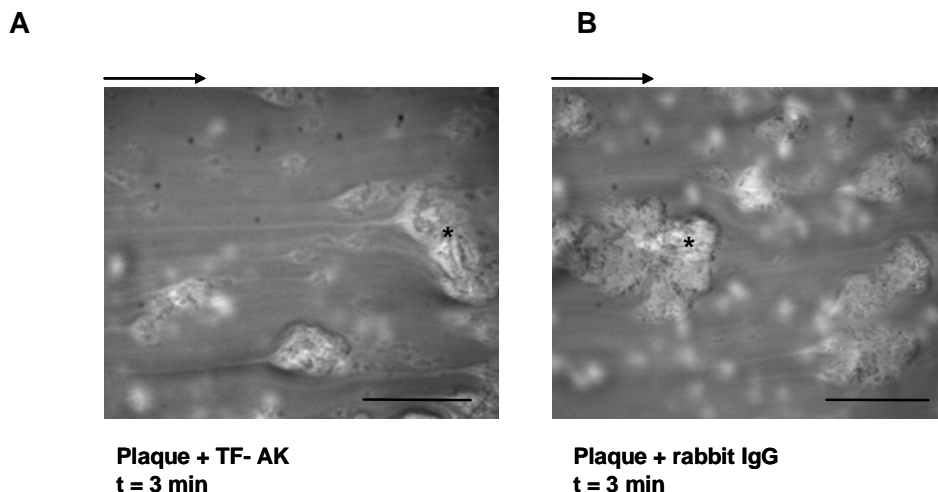


Abbildung 38: Kein Einfluss von TF-AK auf die Plaque-induzierte Adhäsion und Aggregation unter arteriellem Blutfluss.

Plaque Homogenat (0,15mg) wurde mit TF-AK (0,3 μ g) bzw. IgG Isotypenkontrolle aus Hase (rabbit IgG, 0,3 μ g) für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf Glasdeckplättchen immobilisiert. Das heparinisierte Blut (0,4 Einheiten/ml) floss in Anwesenheit von CTI (32 μ g/ml) mit einer Scherrate von 1500/s über die mit Plaque beschichteten Glasdeckplättchen. Die verwendete Technik und Auswertungsmethode siehe Abb.36. Hellfeldmikroskopie, Balken entspricht 50 μ m. Strömungsrichtung von links nach rechts (Pfeil). Insgesamt wurden n=3 Experimente durchgeführt. Die Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente. **A** Plaque mit TF-AK vorbehandelt. Stabile Aggregate auf den mit Plaque beschichteten Stellen zum Zeitpunkt t = 3 min nach Flussbeginn (*, hellgrau). **B** Plaque mit rabbit IgG vorbehandelt. Stabile Aggregate auf den mit Plaque beschichteten Stellen zum Zeitpunkt t = 3 min nach Flussbeginn (*, hellgrau).

5.4.2 Messungen im recalcifizierten Citratblut

5.4.2.1 Optimierung der CaCl₂ Konzentration für die TF-abhängige Gerinnungsaktivierung unter arteriellen Flussbedingungen

Bei der Zugabe von 12mM CaCl₂ zu den für den Versuch benötigten 7,5 ml Citratblut vor Strömungsbeginn kam es trotz der Anwesenheit von CTI bereits 10 min nach Beginn der Durchströmung der Kammer zu einer Spontangerinnung im Vorrats-Gefäß, in den zu- und abführenden Polyethylenschläuchen, sowie in der Flusskammer. Andererseits fand bei der Zugabe von 5mM CaCl₂ keine Plaque-induzierte Fibrinbildung unter arteriellen Flussbedingungen bis 10 min nach Versuchsbeginn statt. Um eine Spontangerinnung nach Recalcifizierung des Citratblutes während der Dauer eines Flussversuchs (15min) zu vermeiden, andererseits aber auch eine optimale und schnelle Plaque-TF-induzierte Gerinnung zu gewährleisten, wurde bei verschiedenen TF-Konzentrationen die optimale zur Recalcifizierung benötigte CaCl₂-Konzentration im Rotem[®] bestimmt (Abb.39). Es wurden vier unterschiedliche TF Konzentrationen bei verschiedenen CaCl₂ Konzentrationen getestet. Bei allen Experimenten wurde CTI (32 μ g/ml) und MgCl₂ (0,1mM) dem Blut zugegeben, wodurch annähernd physiologische MgCl₂ Konzentrationen erreicht wurden (vgl. 5.3). Es zeigte sich, dass bei 6mM und 8mM CaCl₂ die verschiedenen TF-Konzentrationen gleichermaßen optimal aktiv waren. Bei einer CaCl₂ Konzentration von 12mM zeigte die niedrigste eingesetzte TF-Konzentration (0,05ng/ml) sogar eine geringere Gerinnungsaktivität.

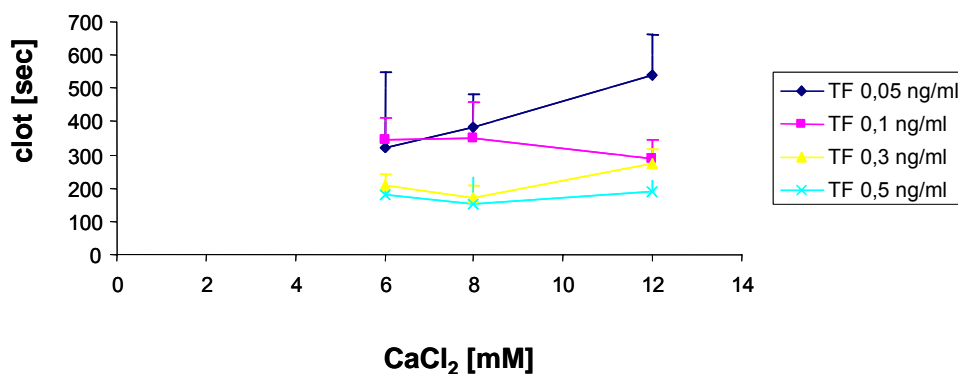


Abbildung 39: Thrombelastographische Messungen zur Bestimmung der optimalen CaCl₂ Konzentration die Gerinnungsaktivierung durch TF im Citratblut.

Es wurden in Anwesenheit von CTI (32µg/ml) und MgCl₂ (0,1mM) zu je 300µl Citratblut verschiedene Mengen CaCl₂ gegeben (6mM, 8mM und 12mM) und anschließend die Gerinnung mit TF (0,05 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,3 ng/ml und 0,5 ng/ml) stimuliert. MW ± SA, n=3 (3 verschiedene Blutspender).

Aufgrund dieser Ergebnisse und der nach 6-8 min nicht vorhandenen Plaque-induzierten Fibrinbildung bei 5mM CaCl₂ unter arteriellem Blutfluss wurde 8mM CaCl₂ und 0,1mM MgCl₂ zur Recalcifizierung des Citratblutes für die Flussexperimente verwendet.

5.4.2.2 Plaque- induzierte Aggregation und Fibrinbildung

Zur Hemmung der Kontaktaktivierung der Blutgerinnung wurde das Citratblut sofort nach Abnahme mit CTI (32µg/ml) versetzt. Die antikoagulatorische Citrat-Wirkung wurde durch die Zugabe von CaCl₂ (8mM) und MgCl₂ (0,1mM) zum Blut direkt vor Beginn der Durchströmung der Flusskammer aufgehoben. Als Kontrolle wurden mit Albumin beschichtete Glasdeckgläser mit recalcifiziertem Citratblut 15 min lang beströmt. Während dieser Zeit kam es weder in der Durchflussskammer oder im Vorrats-Behälter, noch in den zu- oder abführenden Schläuchen zu Thrombozytenadhäsion, -aggregation oder Gerinnungsbildung. In Abwesenheit von CTI kam es allerdings bereits nach 10 min zu einer Spontangerinnung des recalcifizierten Citratblutes in der Durchflussskammer.

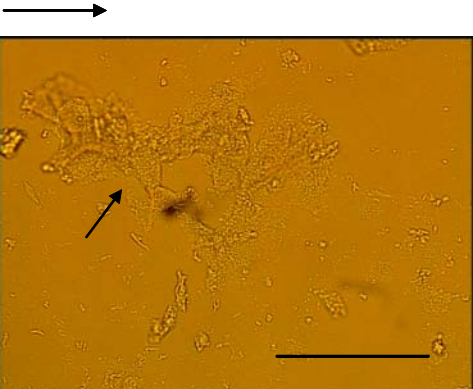
Abbildung 40 A zeigt die hellfeldmikroskopische Übersichtsaufnahme von beschichtetem Plaque-Homogenat vor dem Blutfluss durch die Kammer. Bei der Durchflutung der Kammer mit recalcifiziertem Citrat-Blut (0,2ml/min, Wandscherrate 1500/s) stellten sich bei der Verwendung einer Farbkamera und einer Kombination von Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie die Erythrozyten rot und der autofluoreszierende Plaque gelb dar (Abb.40 B). Die thrombozytäre Aggregatbildung (dargestellt durch die Mepacrin-gefärbten grün-fluoreszierenden Thrombozyten) begann bereits nach $0,8 \pm 0,3$ min ausschließlich im Bereich der Plaques (MW ± SA, n=5, Abb.40 C, siehe auch Film 1 im Anhang). Durch die

kontinuierliche Anlagerung von weiteren mit dem Blutstrom ankommenden Thrombozyten, nahm die Größe der Aggregate rasch in Höhe und Breite zu (siehe Filme 1 und 2 im Anhang). In Abbildung 40 D ist ein Ausschnitt eines Aggregats mit höherer Vergrößerung gezeigt. In dieser Auflösung sind sogar die Granula der mit Mepacrin fluoreszenz-markierten Thrombozyten im Aggregat zu erkennen. Das Blut erscheint schwarz, da Erythrozyten Mepacrin nicht aufnehmen. Eine Plaque-abhängige Fibrinbildung wurde erst 6-8 min nach Strömungsbeginn sichtbar ($n=5$, $MW \pm SA$, Abb.40 E,F). Um diese darstellen zu können, wurde 6 min nach Flussbeginn die optische Nachvergrößerung (zoom) von 1,0x auf 1,6x erhöht, sowie ausschließlich mit Hellfeld beleuchtet. Die ersten Fibrinfasern entstanden an den größeren Thrombozyten- Aggregaten. Dies schien darauf hinzuweisen, dass die Aggregatgröße und damit die Oberfläche aktivierter Thrombozyten die Geschwindigkeit der Fibrinbildung sowie die Fibrinmenge wesentlich beeinflusste. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass Fibrin bei den verwendeten arteriellen Wandscherraten von 1500/s zuerst in so genannten „Strömungsnischen“ der Aggregate entstand, wo die Fließgeschwindigkeit des Blutes durch die Geometrie der Aggregate vermindert (siehe Film 1). Die größeren Aggregate bildeten größere Strömungsnischen. In diesen herrschen optimale Bedingungen für die Fibrinpolymerisation (Reininger et al., 1995).

Beim Fokussieren auf verschiedene Ebenen fibrinhaltiger Aggregate zeigte sich, dass die Fibrinfasern bevorzugt in den unteren Schichten der thrombozytären Aggregate entstanden (Siehe Film 3). In Abbildung 40 F ist der Boden eines Aggregats auf dem Plaque dargestellt. Mit Hilfe der RICM Technik (siehe 4.3.8.1) wurden ausgebreitete Thrombozyten (dunkelgrün, dicker Pfeil) und strahlenförmig herauswachsende Fibrinfasern (dünner Pfeil) sichtbar. Die Ausrichtung der Fasern, sowie die Wachstumsrichtung der Fibrinfäden schienen von der Richtung des Blutflusses in der Kammer unabhängig zu sein.

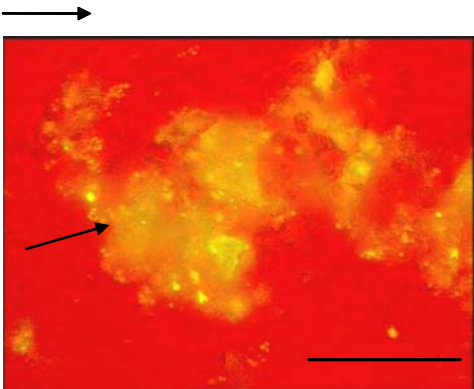
Die Länge und Anzahl der Fibrinfasern nahm kontinuierlich zu und die Anordnung der Fäden war sternförmig ausgehend vom Zentrum der Aggregate (siehe Film 3). In einem entstandenen Netz von Fibrinfäden wurden weiterhin vorbei fließende Thrombozyten angelagert. Bis zum Ende des Flussversuchs nach 15 min war nahezu der gesamte mit Plaque beschichtete Bereich der Flusskammer mit äußerst stabilen, fibrin- und thrombozytenhaltigen Thromben zugewachsen. Dies führte jedoch nicht zu einem Stillstand des Blutflusses in der Flusskammer oder in den Schläuchen. Auch das Blut im Vorratsbehälter war zu diesem Zeitpunkt noch nicht geronnen.

A



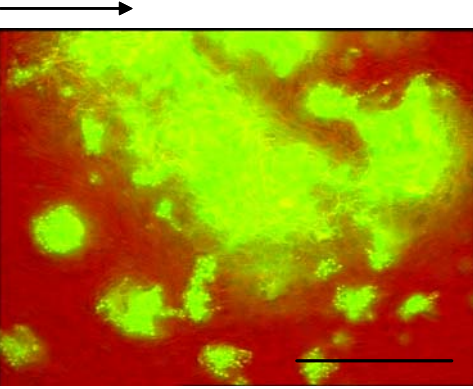
t = 0 min, vor Blutfluss
HF

B



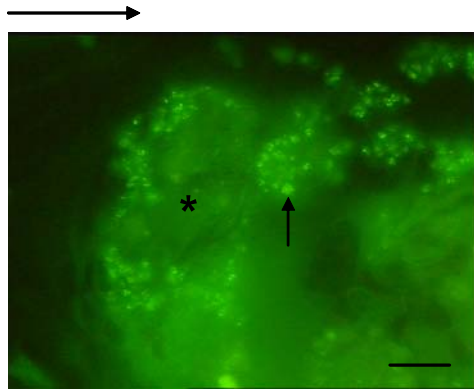
t = 0,1 min
HF + F

C



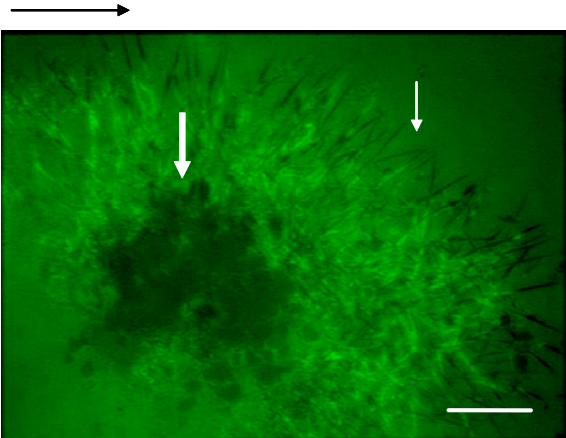
t = 5 min
HF + F

D



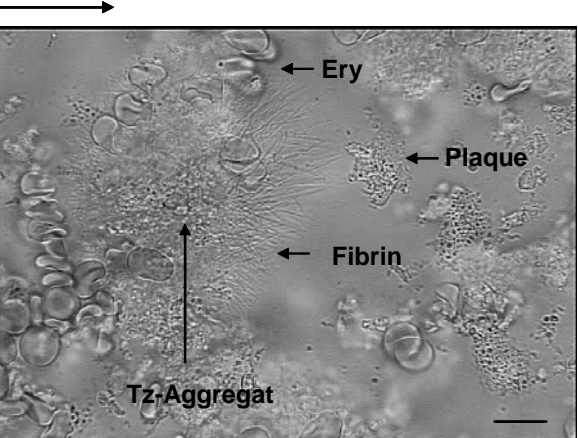
t = 3 min
F

E



t = 14 min
RICM

F



t = 12 min
HF

Abbildung 40: Plaque-induzierte Tz-Adhäsion, -Aggregation und Fibrinbildung unter arteriellen Strömungsbedingungen.

Citratblut (7,5ml) wurde mit CTI (32µg/ml) versetzt und über eine Pumpe mit einer Geschwindigkeit von 0,2ml/min (Wandscherrate 1500/s) durch die Flusskammer geleitet. Strömungsrichtung von links nach rechts. Zur Markierung der Thrombozyten wurde Mepacrin (10µM) verwendet. Unmittelbar vor Flussbeginn wurden CaCl₂ (8mM) und MgCl₂ (0,1mM) dazugegeben und mit dem Blut durchmischt. Die verwendeten Techniken waren Hellfeld-, Fluoreszenzmikroskopie (HF, F), sowie deren Kombination (HF + F) und RICM (siehe Material und Methode). Gearbeitet wurde mit einer Farbkamera (siehe Material und Methode). Die Bilder sind repräsentativ für 5 Experimente mit 5 verschiedenen Blutspendern und 5 verschiedenen atherosklerotischen Plaques (Aufbereitungsmethode B). **A** Plaque Homogenat (0,15mg, Pfeil) wurde auf Glasdeckplättchen immobilisiert und vor Beginn des Blutflusses (t=0min) dargestellt. Objektiv 40x, optische Nachvergrößerung (= zoom) 1,0. Der Balken entspricht 50µm. **B** Plaque (Pfeil) 0,1 min nach Beginn des Blutflusses (Rot: Erythrozyten) ohne Thrombozytenablagerung. Gelb: Plaque (Autofluoreszenz), Rot: Erythrozyten. Objektiv 40x, zoom 1,0. Der Balken entspricht 50µm. **C** Großes konfluierendes Thrombozytenaggregat 3 min nach Beginn des Blutflusses (grün, fluoreszenz-markierte Thrombozyten) und mehrere kleine Aggregate auf dem Plaque. Objektiv 40x, zoom 1,0. Der Balken entspricht 50µm **D** Ausschnitt aus einem großen Aggregat 5 min nach Beginn des Blutflusses. Stern (*): Fluoreszenz-markierte Thrombozyten, Pfeil: dichte Granula in einzelnen Thrombozyten. Objektiv 40x, zoom 1,6. Der Balken entspricht 10µm **E** Fibrinfasern wachsen sternförmig aus den thrombozytären Aggregaten heraus 12 min nach Beginn des Blutflusses. Objektiv 40x, zoom 1,6. Der Balken entspricht 50µm. **F** Untere Schicht eines Aggregats mit ausgebreiteten Thrombozyten (dicker Pfeil) und herauswachsenden Fibrinfasern (dünner Pfeil, Reflexionsinterferenzkontrastmikroskopie (RICM + Grünfilter) 14 min nach Beginn des Blutflusses. Objektiv 63x, zoom 1,6. Der Balken entspricht 10µm.

5.4.2.3 Kollagen- induzierte Aggregation und Fibrinbildung

Die Beschichtung der Glasdeckplättchen mit fibrillärem Kollagen ist in Abbildung 41 A mikroskopisch dargestellt. Die thrombozytäre Aggregation begann ebenso wie bei der Plaque-Beschichtung innerhalb der ersten Minute nach Beginn der Durchströmung der Flusskammer mit recalcifiziertem Citratblut (CaCl₂ 8mM, MgCl₂ 0,1mM, ohne CTI). Die Aggregate entstanden entlang der Kollagenfasern und wuchsen kontinuierlich, indem sich immer mehr Thrombozyten anlagerten (Abb. 41 B,C).

Hervorzuheben ist, dass in Gegenwart von CTI auf den Kollagen-beschichteten Glasdeckplättchen kein Fibrin entstand (bis 15 min nach Flussbeginn, siehe 5.4.2.3). Ohne CTI wurde die Kollagen-induzierte Fibrinbildung wie beim Plaque nach 6-8 Minuten sichtbar (n=5). Fibrinfasern entstanden ausschließlich im Bereich der thrombozytären Aggregate, die sich zuvor entlang der Kollagenfasern gebildet hatten (Abb.41 E). Wie beim Plaque entstanden die ersten Fibrinfasern an den größeren Thrombozytenaggregaten und die Anordnung der Fasern war ebenso strahlenförmig.

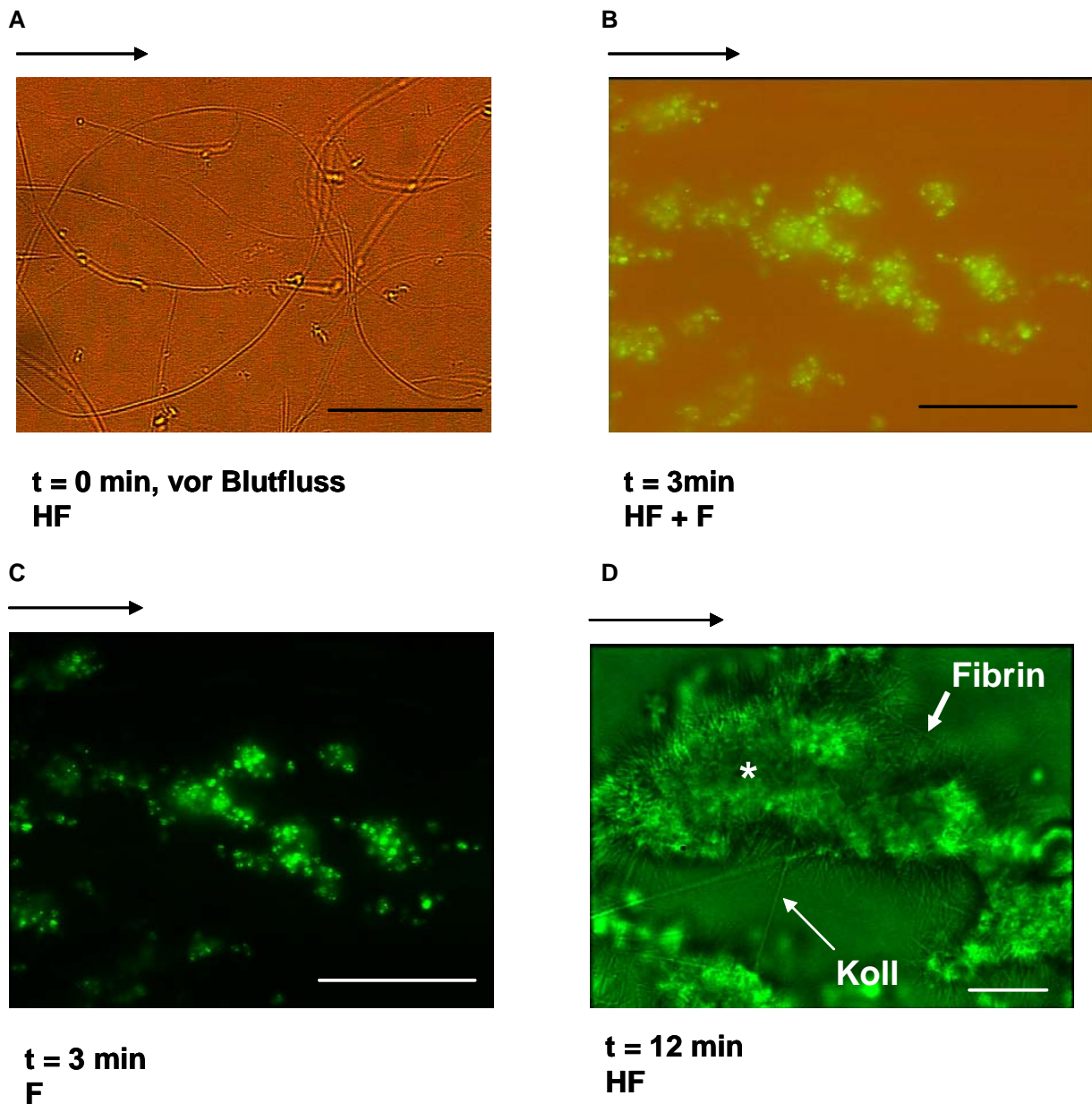


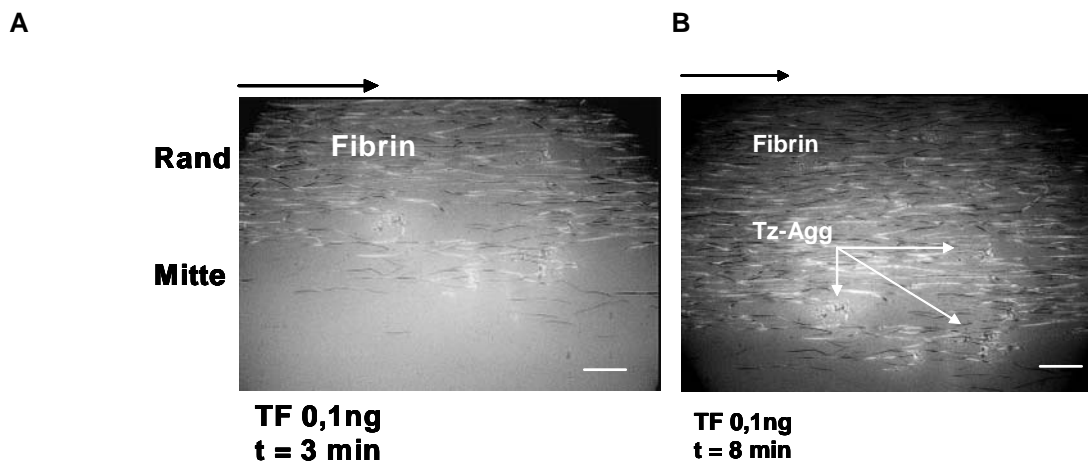
Abbildung 41: Kollagen-induzierte Tz-Adhäsion, -Aggregation und Fibrinbildung unter arteriellen Strömungsbedingungen.

Gearbeitet wurde mit einer Farbkamera. Zusätzliche Angaben siehe Abb. 40. Die Bilder sind repräsentativ für n=3 Experimente mit 3 verschiedenen Blutspendern. Die verwendeten Techniken waren Hellfeldmikroskopie (HF), Fluoreszenzmikroskopie (F), sowie deren Kombination (HF + F) **A** Fibrilläres Kollagen (0,2µg) auf Glasdeckplättchen vor Flussbeginn. Objektiv 40x, zoom 1,0. Balken entspricht 50µm. **B** Thrombozyten-Aggregate entlang der Kollagenfasern (anderer Bildausschnitt) nach Beginn des Blutflusses t= 3 min. Rot: Erythrozyten, Grün: Mit Mepacrin fluoreszenzmarkierte Thrombozyten. Objektiv 40x, zoom 1,0. Balken entspricht 50µm. **C** siehe B, jedoch ohne Hellfeld. **D** Fibrinfasern (Fibrin), die kranzförmig aus den thrombozytären Aggregaten (*) entlang der Kollagenfasern (Koll) herauswachsen. t= 12min nach Beginn Blutfluss. Hellfeld + Grünfilter. Objektiv 63x, zoom 1,6. Balken entspricht 10µm.

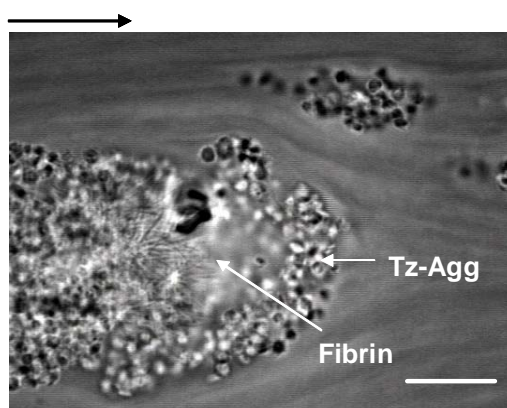
5.4.2.4 TF- induzierte Aggregation und Fibrinbildung

Glasdeckplättchen wurden mit zwei unterschiedlichen TF-Konzentrationen (TF 0,3 μ g/ml, total 0,1ng und TF 0,9 μ g/ml, total 0,3ng) beschichtet. Bei der geringen TF Konzentrationen von 0,1ng entstanden bereits ab der ersten Minute nach Flussbeginn die ersten Fibrinfasern im Bereich der TF-Beschichtung. Im Gegensatz zur Plaque- und Kollagen-induzierten Fibrinbildung bildeten die Fasern bei der TF-Beschichtung eine parallel zur Strömungsrichtung verlaufende Schicht. Der Prozess begann im Randbereich der Flusskammer (Abb.42 A). Hier ist die Strömungsgeschwindigkeit langsamer, als in der Mitte (Reininger et al., 1995). Die thrombozytäre Adhäsion und Aggregation begann 2 min nach Flussbeginn, also ca. 1 min später als die Bildung der Fibrinfäden. Sie fand im Bereich der entstandenen Fibrinfäden statt, und zwar ebenfalls im Randbereich der Flusskammer (Abb.42 A). Diese Thrombozyten-Aggregatbildung blieb aber äußerst diskret und es konnte kein deutliches Aggregatwachstum oder eine Konfluenz der Aggregate beobachtet werden. In der Mitte des Strömungsgebiets der Flusskammer entstand erst nach 7-8 min Fibrin (Abb. 42 B). Auch am Ende eines jeden Experiments nach 10 min war nur eine äußerst spärliche Aggregation bei massiver Fibrinbildung im Bereich der mit TF beschichteten Oberflächen zu erkennen.

Wurde die TF Konzentration auf 0,3ng erhöht, beeinflusste dies maßgeblich die Geschwindigkeit der thrombozytären Aggregatbildung. Fibrin entstand unmittelbar nach Beginn des Blutflusses zuerst im Randbereich, dann aber sogleich auch in der Mitte der Flusskammer bei den höchsten Fließgeschwindigkeiten des Blutes. Wie bei der niedrigeren TF Konzentration war die Anordnung parallel zur Flussrichtung (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Thrombozyten bildeten bei der hohen TF Konzentration große Aggregate auf der mit Fibrin bedeckten Oberfläche. Auf diesen Aggregaten entstand nach 4 min eine erneute Schicht mit Fibrinfasern, die wiederum eine strahlenförmig herauswachsende Anordnung aufwiesen (Abb.42 C).



C



TF 0,3 ng
t = 4 min

Abbildung 42: TF-induzierte Aggregation und Fibrinbildung unter arteriellen Strömungsbedingungen.

Gearbeitet wurde mit einer schwarz-weiß-Kamera und Hellfeld Technik. Zusätzliche Angaben siehe Abb. 40. **A** TF (0,1ng) induziert Fibrinbildung (Fibrin) zuerst am Rand der Flusskammer. Geringe Aggregatbildung (Tz-Agg) auf den Fibrinfasern. Hellfeld, t=3 min nach Beginn des Blutflusses. Objektiv 40 x, zoom 1,6. Balken entspricht 10µm. **B** TF (0,1ng). Fibrinfasern entstehen auch im mittleren Teil der Flusskammer. Kaum Aggregatbildung. Zeitpunkt t= 8 min nach Beginn des Blutflusses. Objektiv 40 x, zoom 1,6. Balken entspricht 10µm. **C** TF (0,3 ng) induziert Fibrinbildung (Fibrin) mit anschließender ausgeprägter Thrombozytenaggregation (Tz-Agg). Fokusebene oberhalb der mit den gebildeten Fibrinfäden beschichteten Glasdeckplättchenoberfläche. Innerhalb der Aggregate entstehen Fibrinfasern mit kranzförmiger Ausrichtung der Fasern. Hellfeld, t=4 min nach Flussbeginn. Objektiv 63 x, zoom 1,6. Balken entspricht 10µm. **A-C** Die Bilder sind repräsentativ für n=2 Experimente mit 2 verschiedenen Blutspendern.

5.4.2.5 Einfluss der Faktor XII Blockade auf die Plaque- und Kollagen-induzierte Aggregation und Gerinnung

Die Rolle des FXII für die Plaque-, Kollagen- und TF-induzierte Thrombozytenaggregation und Gerinnung wurde bereits in den beiden statischen Systemen Aggregometer (5.1) und Thrombogram (5.2) untersucht. Bei den Messungen zeigte sich unter Verwendung von CTI, dass die FXII Hemmung keinen Einfluss auf die Plaque- und TF-induzierte thrombozytäre Aggregation und Gerinnungszeit hatte (5.1.2). Die Kollagen-induzierte Aggregation wurde geringfügig, die Kollagen-induzierte Gerinnungs- und Thrombinbildungszeit (5.1.2; 5.2.3) wurde jedoch signifikant verlängert. Es war für uns von großem Interesse, inwieweit sich diese Ergebnisse im arteriellen Strömungsmodell bestätigen ließen.

Wir verglichen die Plaque- und Kollagen- induzierte Fibrinbildungszeit in An- und Abwesenheit von CTI. Citratblut verschiedener Blutspender wurde vor Beginn der Blutströmung durch die Flusskammer entweder mit CTI versetzt und vermischt, oder nicht. Gemessen wurde die

Zeitspanne von Beginn des Blutflusses über den Plaque bis zur Entstehung der ersten Fibrinfäden auf den Plättchenaggregaten.

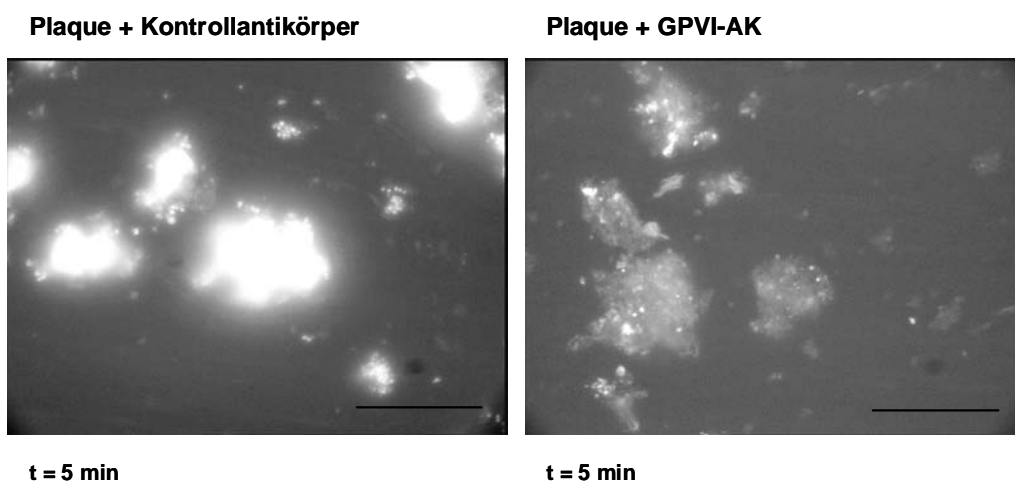
Die Plaque-induzierte Aggregation wurde durch CTI nicht verändert. Die Plaque-induzierte Fibrinbildungszeit ohne CTI betrug durchschnittlich $5,4 \pm 1,4$ min (MW \pm SA, n=5) und wurde durch die Zugabe von CTI nicht signifikant beeinflusst ($6,2 \pm 1,2$ min, MW \pm SA, n=3).

Die Kollagen-induzierte Aggregation wurde erwartungsgemäß ebenfalls nicht durch CTI beeinflusst. Ohne CTI wurden bei Kollagen durchschnittlich nach $5,6 \pm 0,4$ min (n=3) Fibrinfäden sichtbar. Nach Zugabe von CTI konnte jedoch in keinem der Experimente bis 15 min nach Beginn des Blutflusses eine Fibrinentstehung mehr nachgewiesen werden (n=2). Diese Ergebnisse zeigen einen deutlichen Unterschied bezüglich der Abhängigkeit der Kollagen- und Plaque-induzierten Fibrinbildung von Faktor XII.

5.4.2.6 Einfluss von GPVI-AK auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation und Fibrinbildung

Bei der Inkubation von Citratblut von 5 verschiedenen Blutspender mit GPVI-AK oder HLA-Kontrollprotein und anschließender Beströmung von immobilisiertem Plaque Homogenat mit diesem Blut nach Zugabe von CaCl_2 und MgCl_2 , ließ sich durch die GPVI-Hemmung im Vergleich zur Kontrolle eine 78%ige Inhibition der Thrombozytenaggregation bis 5 min nach Flussbeginn erzielen (Abb.43 A,B). Bei einem der 5 Spender (Spender 3, Abb. 43 B) wurde die Thrombozytenaggregation vollständig bis zum Ende des Versuchs (t= 15 min nach Flussbeginn) inhibiert.

A



B

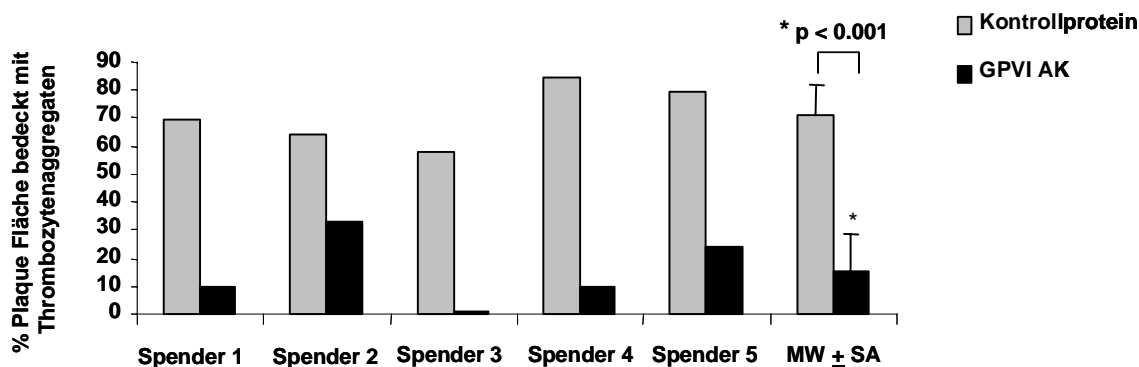
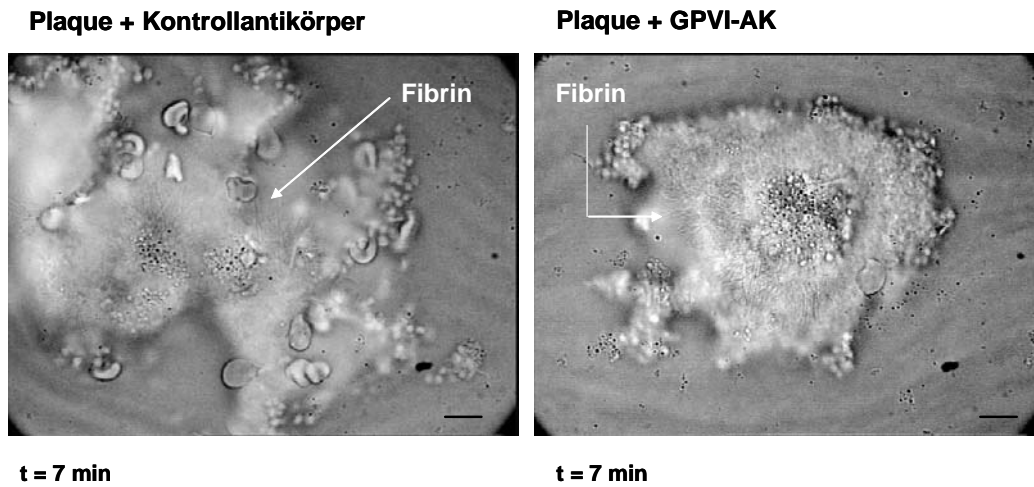


Abbildung 43: Einfluss von GPVI-AK auf die Plaque-induzierte Adhäsion und Aggregation unter arteriellem Blutfluss.

Citrat-Blut (7,5ml) wurde mit CTI (32 μ g/ml) versetzt und unmittelbar nach der Zugabe von CaCl₂ (12mM) und MgCl₂ (0,1mM) und über eine Pumpe mit einer Wandscherrate von 1500/s durch die Flusskammer geleitet. Zur Markierung der Thrombozyten wurde Mepacrin (10 μ M) verwendet. Die verwendete Technik Fluoreszenzmikroskopie (F) zur Darstellung der Thrombozytenaggregate. Objektiv 40x, optischen Nachvergrößerung (zoom) 1,0. Balken entspricht 50 μ m. Gearbeitet wurde mit einer schwarz-weiß-Kamera. **A** Die Bilder zeigen den Zeitpunkt t = 5 min nach Beginn des Blutflusses und sind repräsentativ für n=5 Experimente (5 verschiedene Plaques und 5 verschiedene Blutspender). Plaque Homogenat ist durch Autofluoreszenz visualisiert (hellgrau) und Thrombozyten durch Mepacrin Fluoreszenz (weiß) Blut wurde für 15 min mit anti-HLA-Kontrollantikörper (links) oder mit GPVI-AK (rechts) vorinkubiert. **B** Balkendiagramm: Quantifizierung der Fläche der thrombozytären Aggregatbildung im Verhältnis zur Plaque Fläche (% Plaque bedeckt mit Tz-Aggregaten). Auswertung erfolgte innerhalb der ersten 5 min nach Beginn der Blutströmung.

Nach ca. 5 min kam es bei den anderen vier Spendern trotz der Hemmung von GPVI zur Thrombozytenaggregation an den mit Plaque beschichteten Stellen des Glasdeckplättchens. Die Anzahl der Aggregate war jedoch Spender-abhängig reduziert. Im Bereich der Aggregate kam es nach ca. 6 min an den größeren Aggregaten zur Fibrinbildung (Abb. 44 A). Diese war zwar zeitlich nicht verzögert, schien jedoch im Vergleich zur Kontrolle reduziert zu sein. Nur bei Spender 3, bei dem die Thrombozytenaggregation vollständig inhibiert war, gab es bis zum Versuchsende (15 min nach Flussbeginn) keine Fibrinbildung (Abb. 44 B).

A



B

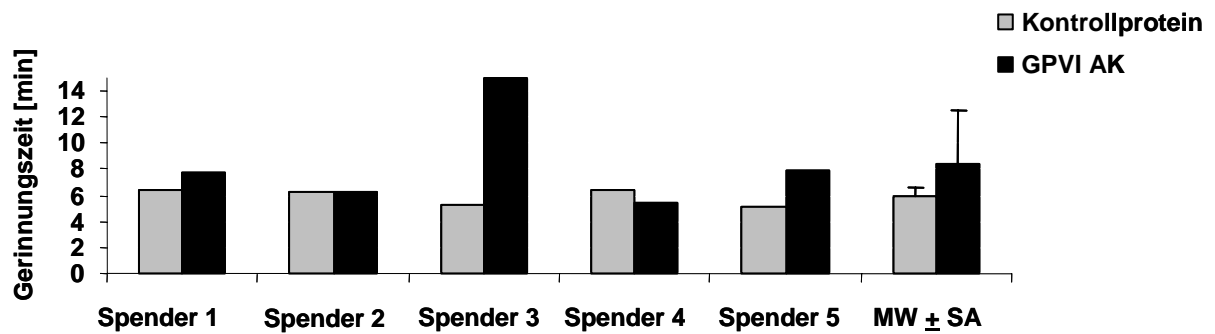


Abbildung 44: Einfluss von GPVI-AK auf die Plaque-induzierte Adhäsion und Aggregation unter arteriellem Blutfluss.

A Zur Darstellung von Fibrin wurde ab der fünften Minute nach Flussbeginn mit Hellfeldmikroskopie (HF), einem Objektiv 40x und einer optischen Nachvergrößerung von 1,6x gearbeitet. Balken entspricht 10µm. **B** Balkendiagramm. Darstellung der Fibrinbildungszeit. Die Werte sind als MW ± SA dargestellt und sind repräsentativ für n=5 Experimente (1 Plaque getestet mit 5 verschiedenen Blutspendern).

5.4.2.7 Einfluss von Plaque-TF auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation und Fibrinbildung

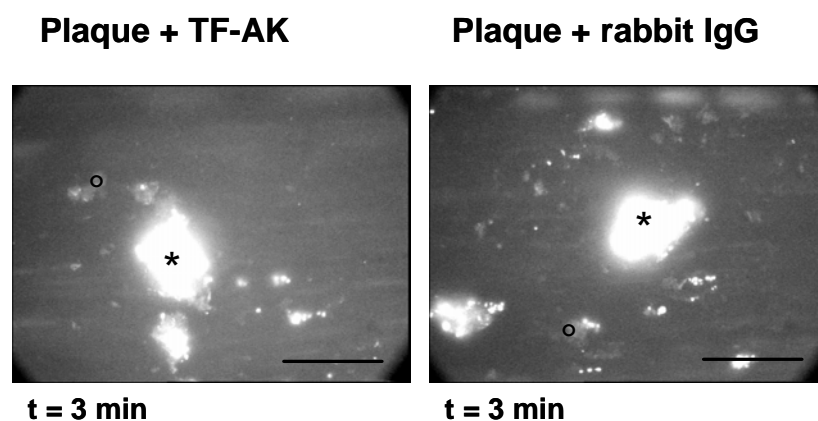
Plaque Homogenat verschiedener Patienten wurde entweder mit TF-AK vorbehandelt, oder mit der Isotypenkontrolle rabbit IgG und anschließend auf Glasdeckplättchen immobilisiert. Im Thrombelastogramm wurde im recalcifizierten Citrat-Blut die Hemmung der Fibrinbildungszeit induziert durch diese Plaques nach Vorbehandlung der Plaques mit TF-AK bestätigt (siehe 5.3.2). Der Beginn der Plaque-induzierten Aggregation wurde durch die Hemmung des Plaque-TF im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verzögert, was auf eine Plaque-TF unabhängige Initiierung der Plaque-induzierten Aggregation schließen ließ (Tab.13).

Tabelle 13: Kein signifikanter Einfluss der Plaque-TF-Hemmung auf die Aggregatbildungszeit.

Gemessen wurde die Zeitspanne ab dem Beginn des Blutflusses über den Plaque bis zum Beginn der Aggregatbildung. Plaque Homogenat (0,15mg) wurde mit TF-AK (0,3 μ g) bzw. Kontroll-rabbit IgG (0,3 μ g) für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit Citrat-Blut in Anwesenheit von CTI (32 μ g/ml), CaCl₂ (8mM) und MgCl₂ (0,1mM) mit einer Wandscherrate von 1500/s beströmt. MW \pm SA, n=4.

Beschichtung	Aggregatbildungszeit [min]
Plaque + rabbit IgG	0,9 \pm 0,4
Plaque + TF-AK	1,3 \pm 0,8

Auch die Größe der Thrombozyten-Aggregate unterschied sich nicht bei den mit TF-AK vorbehandelten Plaques im Vergleich zur Kontrolle (Abb.45).



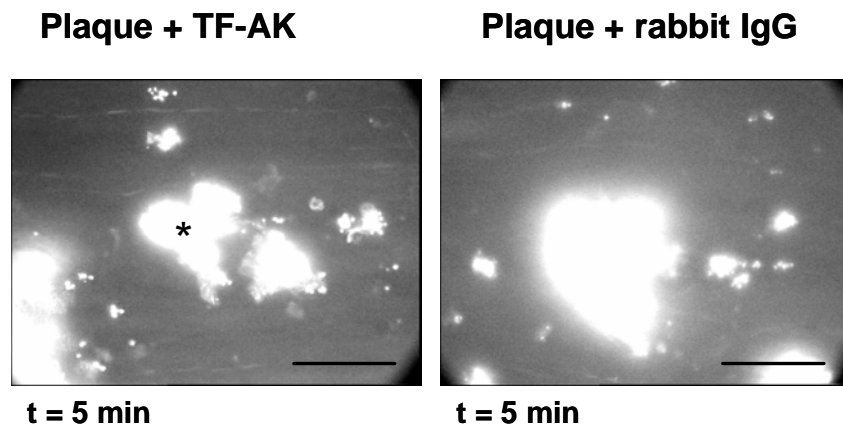


Abbildung 45: Einfluss von TF-AK auf die Plaque-induzierte Adhäsion und Aggregation unter arteriellem Blutfluss.

Citrat-Blut (7,5ml) wurde mit CTI (32µg/ml) versetzt und über eine Pumpe mit einer Wandscherrate von 1500/s durch die Flusskammer geleitet. Zur Markierung der Thrombozyten wurde Mepacrin (10µM) verwendet. Unmittelbar vor Flussbeginn wurden CaCl_2 (8mM) und MgCl_2 (0,1mM) dazugegeben und mit dem Blut durchmischt. Die verwendete Technik war Hellfeld- kombiniert mit Fluoreszenzmikroskopie (HF + F). Objektiv 40x, optischen Nachvergrößerung (zoom) 1,0. Balken entspricht 50µm. Plaque Homogenat ist durch Autofluoreszenz visualisiert (hellgrau, °) und Thrombozyten durch Mepacrin Fluoreszenz (weiß, *). Die Bilder zeigen Zeitpunkte $t = 3$ min und $t = 5$ min nach Beginn des Blutflusses und sind repräsentativ für $n=5$ Experimente (5 verschiedene Plaques und 5 verschiedene Blutspender). **Links:** Plaque-Homogenat wurde vor Immobilisierung auf Glasdeckplättchen mit TF-AK vorinkubiert. **Rechts:** Plaque-Homogenat wurde vor Immobilisierung auf Glasdeckplättchen mit Kontroll-AK (rabbit IgG) vorbehandelt. Plaque Homogenat ist durch Autofluoreszenz visualisiert (hellgrau, °) und Thrombozyten durch Mepacrin Fluoreszenz (weiß, *). Die Bilder zeigen Zeitpunkte $t = 3$ min und $t = 5$ min nach Beginn des Blutflusses und sind repräsentativ für $n=5$ Experimente (5 verschiedene Plaques und 5 verschiedene Blutspender). Aufnahmen zu den Zeitpunkten $t = 3$ min und $t = 5$ min nach Flussbeginn.

Die Ergebnisse der Quantifizierung der Fläche der thrombozytären Aggregatbildung im Verhältnis zur Plaque Fläche (% Plaque bedeckt mit Tz-Aggregaten) innerhalb der ersten 5 min nach Beginn der Blutströmung sind in Tabelle 14 dargestellt. Der durchschnittliche prozentuale Anteil der mit Plaque bedeckten Aggregatflächen aller 5 Experimente unterschieden sich bei den Kontrollen mit 57 ± 17 und bei den TF vorbehandelten Plaques mit 62 ± 12 nicht voneinander (MW \pm SA, $n=5$).

Tabelle 14: Kein Einfluss der TF-Hemmung auf die Fläche der Aggregatbildung im Verhältnis zur Plaque Fläche. In jedem Gesichtsfeld wurden die mit Plaque beschichteten Areale und die Fläche der darauf abgelagerten thrombozytären Aggregate gemessen und der Quotient zwischen Aggregatfläche und Plaque Fläche gebildet (% Plaque bedeckt mit Tz-Aggregaten, siehe 4.3.8.2). Die Werte sind MW \pm SA, n= 5 (5 verschiedene Plaques getestet an 5 verschiedenen Blutspendern).

Beschichtung	% Plaque bedeckt mit Tz-Aggregaten
Plaque + rabbit IgG	57 \pm 17
Plaque + TF-AK	62 \pm 12

Große Auswirkungen hatte jedoch die Plaque-TF Blockade auf die Plaque-induzierte Fibrinbildung unter arteriellen Strömungsbedingungen (Abb. 46). Die Fibrinbildungszeit wurde als die Zeitspanne von Beginn des Blutflusses über den Plaque bis zum Erscheinen der ersten Fibrinfäden definiert. Wurden die Plaque Homogenate mit rabbit IgG als Kontrolle vorbehandelt und anschließend mit Blut beströmt, ergab sich eine Fibrinbildungszeit von 7,3 \pm 0,9 min (MW \pm SA, n=5). Bei einer Vorbehandlung mit TF-AK verzögerte die Fibrinbildungszeit trotz der ungehemmten Tz-Aggregatbildung signifikant um 5,4 min auf 12,7 \pm 2,2 min heraus (MW \pm SA, n=5).

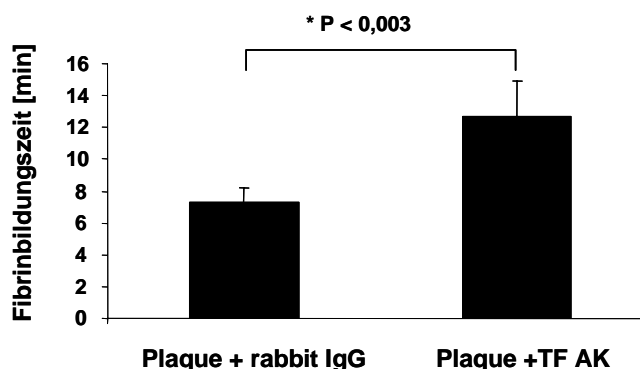


Abbildung 46: Signifikante Verzögerung der Fibrinbildungszeit durch Plaque-TF-Blockade.

Die Werte sind im Balkendiagramm als MW \pm SA dargestellt und repräsentativ für n=5 Experimente (5 verschiedene Plaques getestet mit 5 verschiedenen Blutspendern).

Bei zwei der fünf getesteten Plaques wurde die Fibrinbildung so stark gehemmt, dass bis zum Versuchsende (15 min nach Flussbeginn) kein Fibrin nachweisbar war (Abb.47, rechts).

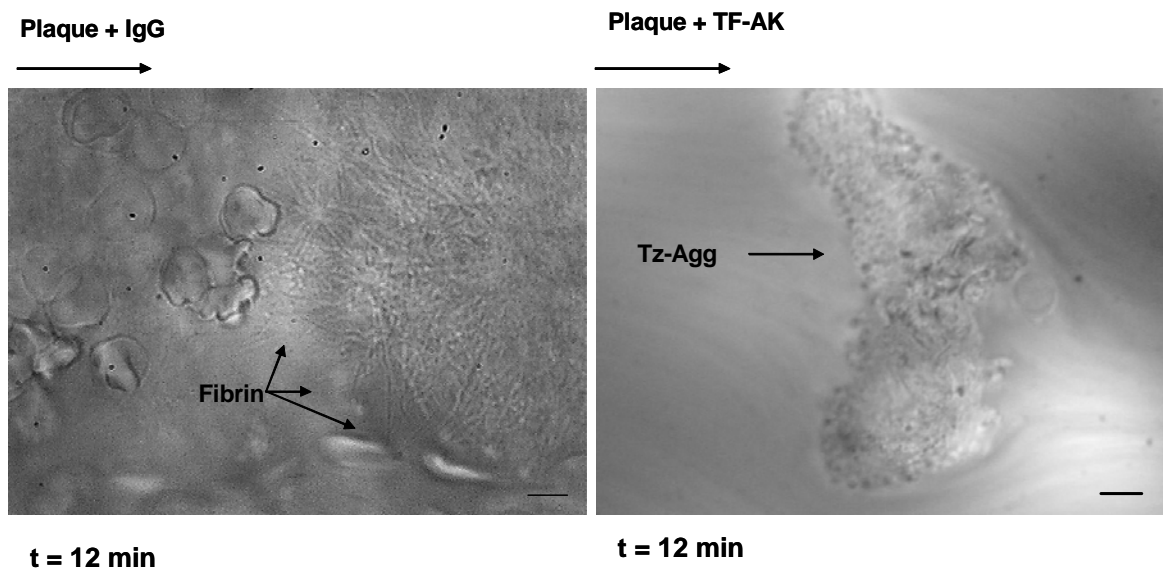


Abbildung 47: Plaque-induzierte Fibrinbildung nach Vorbehandlung mit Kontroll-rabbit IgG und TF-AK.

Links: Plaque wurde mit rabbit IgG vorbehandelt. Schwarz-weiß-Kamera, Hellfeld, Objektiv 40 x, zoom 1,6. Balken entspricht 10µm. Zu sehen sind Fibrinfasern auf dem Boden eines großen Thrombozytenaggregats. Auf der linken Bildhälfte sind im Aggregat eingefangene Erythrozyten abgebildet. **Rechts:** Plaque wurde mit TF-AK vorbehandelt. Objektiv 40 x, zoom 1,6. Balken entspricht 10µm. Zu sehen ist ein Thrombozytenaggregat (Tz-Agg) auf Plaque-Homogenat, jedoch keine Fibrinfasern. Die Aufnahmen entstanden jeweils zum Zeitpunkt $t = 12$ min nach Flussbeginn.

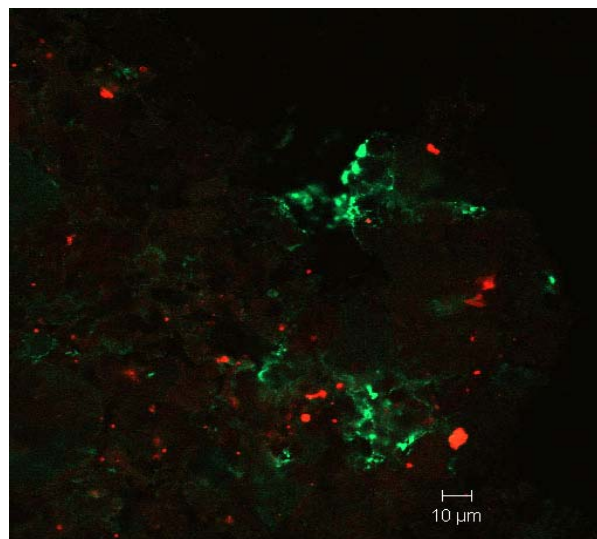
5.5 Lokalisation von TF im Plaque

5.5.1 Darstellung von TF im Plaque Homogenat

Die Anfärbung von TF im Plaque Homogenat mittels Immunfluoreszenz erwies sich im Gegensatz zur Anfärbung von Kollagen als äußerst schwierig, was wahrscheinlich an den sehr geringen Mengen von TF im Plaque (30 -60 pg/mg Protein) lag (Ardissino et al., 1997; Cortellaro et al., 2002). Nur bei einem von drei untersuchten Plaques, der eine sehr hohe Gerinnungsaktivität im Thrombelastogramm aufwies, gelang uns nach Optimierung der Anfärbung eine Markierung von TF (Abb.48 A, B). Die spezifische grüne Färbung zeigt immunfluoreszenzmarkierten TF. Dessen Anordnung war auf dem Glasdeckplättchen inhomogen und „clusterartig“. Es imponierten so genannte „Nester“ von TF innerhalb des Plaque Homogenats mit dazwischen gelegenen Arealen, wo sich kein TF anfärben ließ, sondern lediglich die Autofluoreszenz der rot dargestellten Plaque-Lipide auffiel. Dieses Phänomen ließ sich in jeder der mehrfach wiederholten Immunfluoreszenzfärbungen dieses Plaques wieder erkennen.

In der Kontrollfärbung mit der IgG Isotypenkontrolle und sekundärem *goat anti rabbit* Alexa 488-AK war keine Fluoreszenz zu erkennen (nicht dargestellt).

A



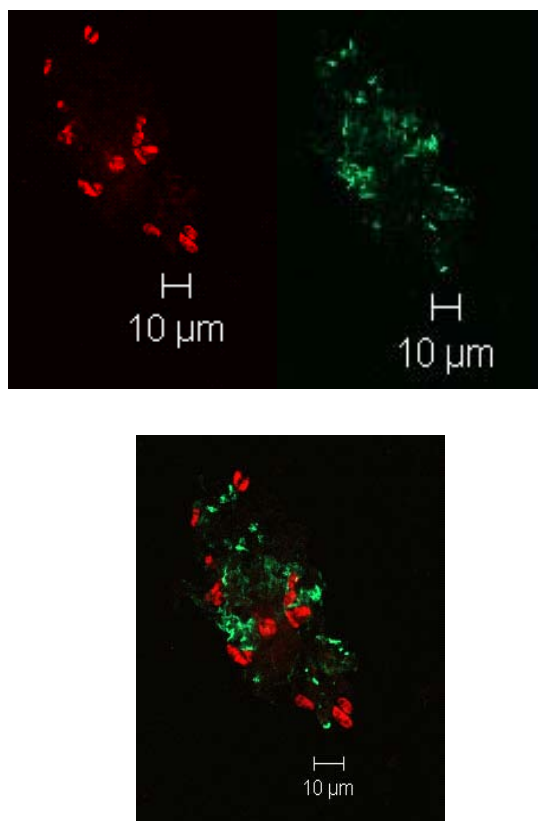
B

Abbildung 48: Identifizierung TF-positiver Strukturen im atherosklerotischen Plaque Homogenat mittels Immunfluoreszenz.

Die Aufnahmen erfolgten mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops. Objektiv 63x, optischer Zoom 1,4. **Grün:** Plaque-TF gebunden an spezifischen TF-AK. Anregungswellenlänge: 488nm. Emissionsfilter: Bandpassfilter 505-530nm. **Rot:** Autofluoreszenz der Lipide des Plaques. Anregungswellenlänge: 543nm. Emissionsfilter: Langpassfilter 560nm. **A** Ausschnitt aus einem Plaque Homogenat mit TF-positiven Strukturen. **B** Anderer Ausschnitt aus demselben Homogenat. Die oberen Bilder zeigen links und rechts die beiden Anregungswellenlängen getrennt. Das untere Bild ist eine Kombination aus den beiden Anregungswellenlängen.

5.5.2 TF in Plaque Schnitten

Durch die Anfertigung von Längs- und Querschnitten eines Plaque-Stücks und die anschließende immunhistochemische Markierung von TF ließ sich die Frage nach dessen spezifischer Lokalisation beantworten. Der Nachweis gelang in verschiedenen charakteristischen Arealen eines atherosklerotischen Plaques (Abb.49). Der Plaque-TF ließ sich durch die spezifische braune Färbung identifizieren. Hierbei erwies sich vor allem das Zytoplasma von Makrophagen, Schaumzellen und glatten Muskelzellen als TF-positiv. Dies waren die dominierenden Zellen in der den Lipidkern umschließenden Kappe (Abb.49 A), und in der Plaque-Schulter (Abb.49 B). In den großen Schaumzellen imponierte die TF-Färbung in

Form kleiner Granula (Abb.49 A). Vor allem im Übergang zum nekrotischen lipidreichen Kern waren Zellen mit einer starken Anfärbung von TF zu sehen (Abb.49 C). Auch hier war die dominierende Lokalisation interessanterweise intrazellulär in Makrophagen, Schaumzellen und glatten Muskelzellen. In unseren Präparaten waren Endothelzellen und Lymphozyten TF-negativ. Auch die IgG Isotypenkontrollfärbung war negativ (nicht dargestellt).

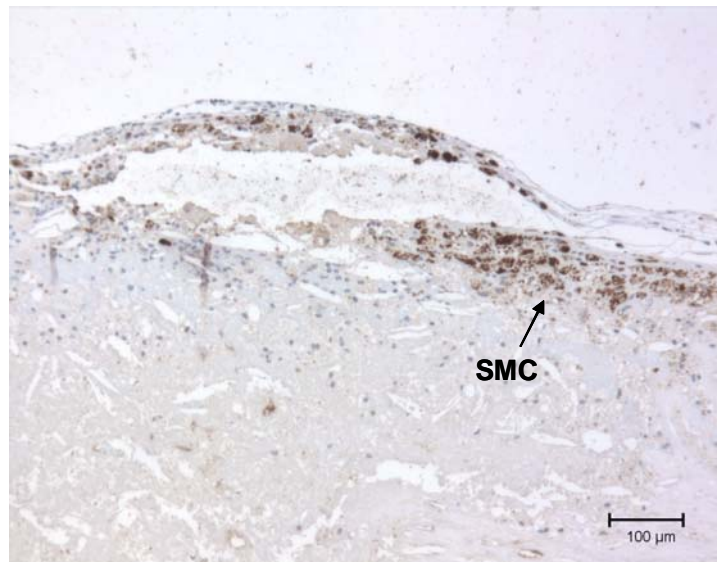
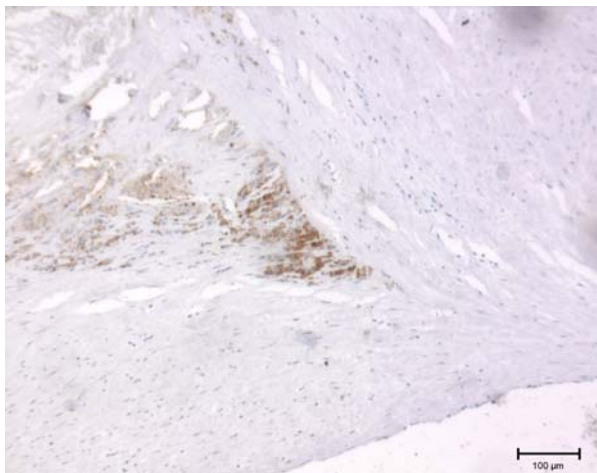
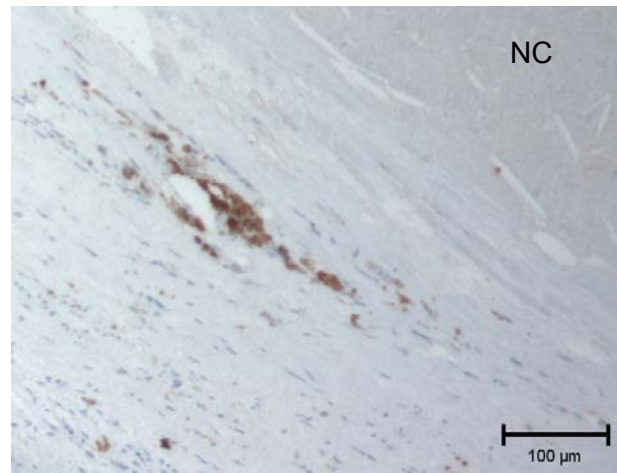
A**B****C**

Abbildung 49: Immunhistochemische Markierung von TF in diversen charakteristischen Regionen eines atherosklerotischen Carotis-Plaques.

Dargestellt sind lichtmikroskopische Bilder von Plaque- Längs- und Querschnitten. Die braune Färbung identifiziert die TF-positiven Strukturen. Objektiv 10x. Längenmaß: 100µm. **A** Plaque-Längsschnitt: Fibröse Kappe mit Lipidkern. SMC = glatte Muskelzellen. **B** Plaque-Querschnitt: Plaque Schulter. **C** Plaque-Querschnitt: Randbereich Nekrotischer Kern (NC).

6 Diskussion

6.1 Etablierung eines *in vitro* Modells zur Untersuchung der Plaque-induzierten Aktivierung von Thrombozyten und Gerinnung

Die untersuchten atherosklerotischen Plaques stammten als Endarterektomie-Präparate aus Carotis-Arterien von mehr als 45 verschiedenen Patienten mit symptomatischer bzw. hochgradiger Carotis-Stenose. Durch die Aufarbeitung jeweils des gesamten Endarterektomie-Präparats zu einem Plaque-Homogenat, das dann sowohl lipidreiche, als auch fibröse Bestandteile enthielt, wurde gewährleistet, dass im Rahmen der Experimente alle pro-thrombotischen Plaque-Komponenten (Thrombozyten- und gerinnungsaktivierende Substanzen) in gleichem Maß in Kontakt mit dem menschlichen Blut oder Plasma kamen. Dies war vor allem aufgrund zweier Tatsachen von Vorteil: **1)** Atherosklerotische Plaques haben einen charakteristischen Aufbau mit unterschiedlichen Arealen, in denen die thrombogenen Komponenten wahrscheinlich unterschiedlich verteilt sind. Zwar bildet der atheromatöse Kern des Plaques die am meisten thrombogene Komponente des Plaques (Rekhter, 2002). Jedoch befinden sich auch in anderen Bereichen des Plaques durchaus thrombogene Strukturen: Z.B. TF in glatten Muskelzellen in der Plaque-Schulter (siehe 5.5.2) oder kollagene Matrixkomponenten in der fibrösen Kappe und ebenso in der Plaque-Schulter (Rekhter et al., 1993). **2)** Sowohl kleine Erosionen, als auch tiefe Rupturen eines Plaques, führen zur arteriellen Thrombus-Bildung (Corti et al., 2002; Michel, 2001; Virmani et al., 2002). Somit wird die Art der freigelegten thrombogenen Substanzen von dem Typ, der Lokalisation und der Tiefe der Plaque-Verletzung abhängen. Bei unterschiedlich tiefen Gefäßwandverletzungen in Mäusen zeigten sich zum Beispiel unterschiedliche Mechanismen der Thrombozytenaktivierung: Bei oberflächlichen Laser-induzierten Verletzungen wurden Thrombozyten vorwiegend durch Thrombin aktiviert. Bei tiefen Gefäßwandverletzungen im FeCl₂-Modell stand die Kollagen-GPVI-vermittelte Thrombozytenaktivierung im Vordergrund (Furie and Furie, 2006b). Durch die Verwendung von Plaque-Homogenaten wurde die Thrombogenität atherosklerotischer Plaques unabhängig von Art und Tiefe der Plaque-Verletzung untersucht.

Normalerweise werden die Mechanismen der Thrombozytenaktivierung und die Aktivierung der Gerinnungskaskade *in vitro* getrennt voneinander erforscht, obwohl sie als voneinander abhängige Prozesse ablaufen (Heemskerk et al., 2002). Die Untersuchung der Thrombozytenaktivierung *in vitro* wird generell unter antikoagulatorischen Bedingungen durchgeführt, in denen die Gerinnungskaskade nicht aktiviert werden kann. Um das komplexe

Zusammenspiel zwischen der Aktivierung von Thrombozyten und der Gerinnungskaskade zu untersuchen, wurden durch die Recalzifizierung von Citrat-Blut oder –Plasma möglichst physiologische Bedingungen hergestellt, in denen sowohl die Aktivierung der Thrombozyten, als auch der Gerinnungskaskade möglich sind. Da Citrat alle zweiwertigen Ionen komplexiert, wurde außer CaCl_2 auch MgCl_2 zugegeben. Somit wurde die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -abhängige Bindung von Kollagen an das Integrin $\alpha_2\beta_1$ auf Thrombozyten gewährleistet (Onley et al., 2000). Die Titration verschiedener CaCl_2 - und MgCl_2 -Konzentrationen ergab im Citrat PPP bei der Zugabe von 12mM CaCl_2 und lediglich 0,1mM MgCl_2 physiologische Plasmakonzentrationen dieser Ionen (siehe 4.3.4). Da diese Ionenmessungen nicht im Blut durchführbar waren, erfolgte mit Hilfe des Rotem[®] Thrombelastograph die Bestimmung der optimalen CaCl_2 - und MgCl_2 -Konzentrationen für die TF-induzierten Gerinnung im Citrat-Blut (siehe 5.4.2.1). Hierbei ergab sich, dass lediglich 8mM CaCl_2 zusammen mit 0,1mM MgCl_2 für eine optimale Gerinnungsaktivierung zugegeben werden musste. Diese Konzentrationen wurden deswegen in den Flusseexperimenten die mit Citrat-Blut durchgeführt wurden, verwendet.

Weiterhin wurde von einer anderen Möglichkeit der Antikoagulation Gebrauch gemacht. Es wurde niedermolekulares Heparin (*low molecular weight heparin*, LMWH) in Anlehnung an Experimente von Badimon et al. in niedriger Konzentration verwendet, bei der das Blut spontan nicht gerinnt, jedoch die Gerinnungskaskade durch TF aktiviert werden kann (Badimon et al., 1988).

Bei *in vitro* Experimenten unter koagulatorischen Bedingungen kann der F XII des intrinsischen Gerinnungssystems unspezifisch durch artifizielle negativ geladene Oberflächen aktiviert werden (Gawaz, 2001). Dies hat dazu geführt, dass bei den meisten *in vitro* Experimenten, die sich mit der Erforschung der Gerinnungskaskade befassen, die Hemmung der Kontaktaktivierung angestrebt wird, um optimale Bedingungen für die TF-abhängige Initiation der Gerinnung zu schaffen (Holmes et al., 2000; Rand et al., 1996). Die Verwendung von *Corn Trypsin Inhibitor* (CTI) ist dabei eine gängige Methode, da selektiv und ausschließlich der FXIIa des intrinsischen Gerinnungssystems gehemmt wird (Behnke et al., 1998). Da sich die Verwendung von CTI nicht auf die Plaque-induzierten Thrombozytenadhäsion, und -aggregation, Thrombin- und Fibrinbildung auswirkte (siehe auch 6.5), verwendeten wir in allen Experimenten im Rotem[®] Thrombelastograph CTI, da nur hierdurch ohne Agonistenzugabe Kontrollwerte von >20 min erreicht werden konnten. Interessanterweise erfolgte die Spontangerinnung im PRP im Aggregometer nach Zugabe von Ca^{2+} und Mg^{2+} deutlich langsamer (>15 min), als im Rotem[®] Thrombelastograph. Dies könnte daran liegen, dass im Aggregometer das Plasma durch einen Magnetrührstab gerührt wird. Im Rotem[®] Thrombelastograph wird das Plasma oder Blut durch einen hin- und her-rotierenden

Bolzen deutlich weniger bewegt und durchmischt, was wahrscheinlich optimalere Bedingungen für die Fibrinpolymerisation darstellt.

Auch unter arteriellen Flussbedingungen zur Ermittlung der Rolle von Plaque-TF wurde CTI zur Inhibition des Kontaktsystems in den Plastikschläuchen und in der Flusskammer verwendet.

Durch die Konstruktion einer neuen Flusskammer für die Versuche im recalcifizierten Citrat-Blut wurden durch Vermeidung eines 90° Winkels im Einlauf-Kanal des Blutes mögliche turbulente Störungen, sowie eine mögliche mechanische Aktivierung der Thrombozyten beim Einlauf des Blutes in die Strömungskammer minimiert. Allein die Versuche unter arteriellen Flussbedingungen lieferten die Aufschlüsselung der zeitlichen Abfolge der Thrombozytenaktivierung und der Fibrinbildung induziert durch atherosklerotisches Plaque-Homogenat, das auf Glasoberflächen fest anhaftete.

6.2 Mechanismus der Plaque-induzierten Thrombusbildung unter statischen Bedingungen

6.2.1 Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation

Im Folgenden wird zunächst der Mechanismus der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation diskutiert. Unter statischen Bedingungen löste die Zugabe sowohl von fibrillärem Kollagen, als auch von atherosklerotischem Plaque Homogenat zum recalcifizierten Citrat-PRP zunächst unmittelbar eine Thrombozytenaggregation aus, der erst sekundär einige Minuten später eine Gerinnselbildung folgte. Im recalcifizierten Citrat PRP fiel die starke Ähnlichkeit zwischen der Plaque- und der Kollagen-induzierten Aggregometerkurven auf (siehe 5.1). Im Gegensatz dazu hatte TF alleine keinen stimulatorischen Effekt auf Thrombozyten. Nur in Anwesenheit von CaCl_2 induzierte TF eine Thrombozytenaggregation, die im Vergleich zu Kollagen und atherosklerotischem Plaque erst einige Zeit später einsetzte, deutlich schwächer war und unmittelbar in eine Gerinnselbildung überging. Die frühe erste Phase der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation war vollständig abhängig von der Interaktion zwischen kollagenen Plaque-Strukturen und dem thrombozytären GPVI-Rezeptor: Sowohl die Antagonisierung des GPVI-Rezeptors, als auch der kollagenen Strukturen im Plaque (Typ I und Typ III Kollagen) führte zu einer signifikanten Reduktion der frühen Plaque-induzierten Aggregation um 50-70%. Die Ergebnisse korrelieren sehr gut mit den bisherigen Beobachtungen unserer und anderer Gruppen, die bei

Experimenten mit maximal antikoaguliertem Blut die Typ I und III Kollagene als die wichtigsten Kollagene in atherosklerotischen Läsionen identifizierten und deren Bindung an den GPVI-Rezeptor als den zentralen Mechanismus der Kollagen-induzierten Thrombozytenaktivierung sehen (Cosemans et al., 2005; Morton and Barnes, 1982; Penz et al., 2005). Der Kollagen-Verdau mittels Kollagenase führte sogar zur vollständigen Inhibition der frühen Plaque-induzierten Aggregation in den ersten 3min. Die stärkere Hemmung im Vergleich zur Verwendung von GPVI-AK und Kollagen Typ I- und III-AK könnte zum einen daran liegen, dass außer Kollagen Typ I und III noch andere Plättchen-aktivierende Kollagene im Plaque vorhanden sind (z.B. Typ IV, V und VI), die nicht GPVI-vermittelt, sondern über andere Rezeptoren zu einer Thrombozytenaggregation führen (Barnes and Farndale, 1999; Katsuda et al., 1992; Ross et al., 1995). Zum anderen könnten außer GPVI unter koagulatorischen Bedingungen noch andere Kollagen-Rezeptoren (v.a. Integrin $\alpha_2\beta_1$) für die Plaque-induzierte Aggregation an Bedeutung gewinnen. Mehrere Gruppen räumen diesem Rezeptor ohnehin eine mindestens genauso große Bedeutung für die Kollagen-vermittelte Thrombozytenaggregation ein, wie GPVI (Kuijpers et al., 2003; Siljander et al., 2004).

Ab ca. 3 min nach dem Kontakt zwischen dem recalcifizierten Citrat- PRP und dem atherosklerotischen Plaque begann im Aggregometer trotz der Antagonisierung des thrombozytären GPVI-Rezeptors bzw. von Kollagen Typ I und III im Plaque die thrombozytäre Aggregation. Dies war unter antikoagulatorischen Bedingungen nicht zu beobachten gewesen. Auch der enzymatische Abbau des gesamten Kollagens in den Plaques durch Kollagenase verhinderte den Beginn der Thrombozytenaggregation nach 3 min nicht. Die Kinetik dieser verspäteten Thrombozytenaggregation war ähnlich, wie nach der Zugabe von TF (0,1 ng/ml) mit unverzögerter Gerinnungsbildung (siehe 5.1.5). Funktionell aktiver TF wurde in zahlreichen Untersuchungen sowohl intra- als auch extrazellulär in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen (Mallat et al., 1999; Marutsuka et al., 2005; Tedgui and Mallat, 2001; Toschi et al., 1997) und könnte über die Bildung von Thrombin zu einer potenten Plättchenaggregation führen. Tatsächlich verursachte die Vorbehandlung der Plaque-Homogenate mit TF-AK zusätzlich zur Vorbehandlung mit Kollagenase eine komplette Hemmung der Thrombozytenaggregation und der Gerinnung (siehe 5.1.6.1). Außerdem zeigte dies, dass kollagene Plaque-Strukturen zusammen mit Plaque-TF durchaus die entscheidenden Komponenten atherosklerotischer Plaques für die Thrombusbildung unter statischen Bedingungen darstellen. Bei alleiniger Hemmung des Plaque-TF wurde weder die frühe, noch die verspätete (>3 min nach Plaque-Zugabe) Thrombozytenaggregation beeinflusst (siehe 5.1.4). Der Grund hierfür lag wahrscheinlich daran, dass die kollagenen Plaque-Strukturen bereits eine maximale Thrombozytenaggregation hervorriefen, die durch eine zusätzliche Plaque-TF-induzierte Thrombinbildung unbeeinflusst blieb.

Es wäre ebenso denkbar gewesen, dass andere, im Plaque vorhandenen Gerinnungsfaktoren (z.B. F V, VII, X), die im Rahmen der Atherosklerose in den Läsionen eingelagert werden, zur Plaque-induzierten Thrombinbildung beitragen (Niemetz et al., 2004). Auch Thrombin selbst wurde in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen (Spronk et al., 2004). Wir untersuchten dessen Rolle durch die Zugabe von Hirudin (direkte Hemmung von Thrombin) zum recalcifizierten Citrat-PRP. Die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation wurde zwar signifikant, jedoch lediglich um durchschnittlich 15% reduziert, während die Kollagen-induzierte Aggregation unbeeinflusst blieb und die TF-induzierte Aggregation erwartungsgemäß vollständig inhibiert wurde. Deshalb ist wahrscheinlich die Inhibition von im Plaque eingelagertem, oder durch andere Gerinnungsfaktoren gebildetem Thrombin für diese 15%ige Reduktion der Thrombozytenaggregation verantwortlich.

6.2.2 Plaque-induzierte Thrombin- und Fibrinbildung

Die Kinetik und die quantitative Thrombinbildung wurden in PRP und plättchenfreien Plasma (PFP) gemessen. Thrombin gilt als das Schlüsselenzym der Gerinnungskaskade, da es einerseits für die Konvertierung von Fibrinogen zu Fibrin verantwortlich ist und andererseits zu den potentesten Plättchenaktivatoren zählt (Kuijpers et al., 2005; Mann, 1999). Deswegen wurde in dieser Arbeit untersucht, inwiefern der TF und die kollagenen Strukturen in atherosklerotischen Plaques zur Thrombinbildung beitragen. Hierfür dienten Messungen mit dem Thrombogram (Hemker et al., 2003).

Viele Publikationen postulieren die Anwesenheit von Thrombozyten als essentiell für das Ablaufen der Blutgerinnung, wie beispielsweise im Zell-basierten Modell der Gerinnung referiert wird (Monroe et al., 2002). Jedoch beobachteten wir auch im PFP eine Plaque- und TF induzierte Thrombinbildung (siehe 5.2.1). TF lag als rekombinantes Protein in einer lipidhaltigen Lösung vor. Bei der Plaque-Zugabe zum PFP könnten Lipidoberflächen, die für die enzymatischen Gerinnungsreaktionen und die Aktivität des Plaque-TF nötig sind (Viles-Gonzalez et al., 2004b), von den apoptotischen Zellbestandteilen im Plaque, sowie von den im Plaque eingelagerten Lipiden stammen. Die gebildete Thrombin Menge (*etp*, *peak*) im PFP nach Zugabe von atherosklerotischem Plaque-Homogenat und TF betrug durchschnittlich nur ca. 1/10 derer im PRP (siehe 5.2.1). Dies wies auf die Bedeutung von Thrombozyten für die Menge der Plaque-induzierten Thrombinbildung hin. Andere Arbeiten zeigten bereits, dass Thrombozyten Dosis-abhängig, vor allem durch ihre prokoagulatorische PS-Exposition zur TF-induzierten Thrombinbildung im Thrombogram beitragen (Vanschoonbeek et al., 2004).

Interessanterweise unterschieden sich aber die Werte der Kinetik der Plaque- und TF-induzierten Thrombinbildung (*lag time*, *ttp_{peak}*) kaum voneinander im PFP und PRP, was zeigte, dass die Anwesenheit von Thrombozyten die Zeit bis zur Entstehung von Thrombin nicht beeinflusste. Somit lief die initiale Plaque- und TF-induzierte Thrombinbildung unabhängig von Thrombozyten ab. Kollagen hingegen induzierte die Thrombinbildung im PRP signifikant schneller als im PFP, wo die Werte nahe den Kontrollwerten ohne Agonist lagen. Dies zeigte, dass nur die Kinetik bei der Kollagen-vermittelten Thrombinbildung über eine vorhergehende Thrombozytenaktivierung stattfand.

Durch die Hemmung des Plaque-TF wurde weder die gesamte Menge des gebildeten Thrombins (*etp*), noch die maximale Thrombin-Konzentration (*peak*) beeinflusst. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass nur die Initiationsphase der Blutgerinnung, in der lediglich Spuren von Thrombin entstehen, vom TF-FVII-Komplex abhängig ist. Erst in der Propagationsphase der Blutgerinnung werden über 96% der Gesamtmenge des während der Koagulation entstehenden Thrombins durch den Tenase-Komplex (FVIIIa-FIXa-Komplex) auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten gebildet (Mann, 1999). Diese Phase läuft also nahezu unabhängig von dem TF-FVIIa-Komplex und damit unabhängig von Plaque-TF, der in dieser Phase sogar physiologisch bereits durch *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI), der von diversen vaskulären Zellen exprimiert wird, gehemmt wird (Mann, 1999).

Die Kinetik der Plaque-induzierten Thrombinbildung (*lag time*, *time to peak*) wurde jedoch signifikant verzögert durch die Hemmung des Plaque-TF (siehe 5.2.4). Somit war der Plaque-TF hauptsächlich für diese initiale Thrombinbildung verantwortlich. Die Auswirkungen des TF-AK auf die *lag time* und die *time to peak* der Plaque-induzierte Thrombinbildung waren etwas schwächer, als auf die TF-induzierte Thrombinbildung. Dies könnte auf eine unvollständige Hemmung bzw. Absättigung des Plaque-TF durch TF-AK zurückzuführen sein, da das TF-Antigen im komplexen Plaque-Homogenat schwerer zugänglich sein dürfte, als das rekombinante TF-Protein.

Im Gegensatz dazu beeinflusste der Verdau der kollagenen Plaque-Strukturen mittels Kollagenase im PRP und PFP weder die Kinetik der Plaque-induzierten Thrombinbildung, noch die Gesamtmenge des entstehenden Thrombins. Die zur Kontrolle durchgeführte Inkubation von fibrillärem Kollagen mit Kollagenase führte hingegen zu einer drastischen Verzögerung der Kollagen-induzierten Thrombinbildung.

Diese Resultate machten deutlich, dass nur der Plaque-TF, nicht jedoch die kollagenen Strukturen in atherosklerotischen Plaques für die Kinetik der Thrombinbildung im PRP verantwortlich sind und dass die Kollagen-abhängige Aktivierung der Thrombozyten für die Induktion der Thrombinbildung im statischen System wahrscheinlich eine eher zu

vernachlässigende Rolle spielt. Diese Ergebnisse sind verwunderlich, da Kollagen und Thrombin einen synergistischen Effekt auf die Aktivierung und PS-Exposition der Thrombozyten haben und andere Studien eine signifikante Verstärkung der TF-induzierten Thrombinbildung durch die Aktivierung von Thrombozyten durch fibrilläres Kollagen fanden (Alberio et al., 2000; Lecut et al., 2005). Außerdem liefern über den GPVI-Rezeptor aktivierte Thrombozyten entscheidende prokoagulatorische Oberflächen in einem sich entwickelnden arteriellen Thrombus (Heemskerk et al., 2002). Eine mögliche Erklärung für den mangelnden Einfluss von GPVI wäre, dass die Konzentration und die Aktivität des Plaque-TF in den von uns untersuchten Homogenaten so hoch waren, dass allein dadurch bereits eine maximale Thrombinbildung unter statischen Bedingungen *in vitro* hervorgerufen wurde. Außerdem sollte bedacht werden, dass das entstehende Thrombin in dem statischen *in vitro* Thrombogram-Modell in den Meßgefäßen akkumuliert und dadurch Thrombozyten vielleicht vor allem durch Thrombin aktiviert werden. Unter anderem ist dieses System deswegen kaum vergleichbar mit den Bedingungen im arteriellen Blutfluss. Es könnte sein, dass am Ort der rupturierten atherosklerotischen Läsion das entstehende Thrombin durch die hohen Fließgeschwindigkeiten des arteriellen Blutes verdünnt und weggeschwemmt wird (Diquelou et al., 1994; Vanschoonbeek et al., 2004). Gerade unter diesen Bedingungen könnte die Kollagen-GPVI-vermittelte Thrombozytenaktivierung an Bedeutung gewinnen.

Um die bisherigen Ergebnisse zu untermauern, führten wir Messungen der Fibrinbildungszeit im recalcifizierten Citrat-PPP, PRP und Blut mit Hilfe des Rotem[®] Thrombelastographen durch. Da Fibrin bereits in der Initiationsphase der Blutgerinnung entsteht, sobald Spuren von Thrombin gebildet werden (Mann, 1999), ließen sich diese Messungen gut mit den Ergebnissen des Thrombograms korrelieren. Insbesondere die Messungen im Blut ermöglichten uns die Einschätzung des Beitrags von intravaskulärem TF zur Plaque- und Kollagen-induzierten Fibrinbildung. Im Blut zirkuliert dieser *blood borne* TF nach bisherigen Forschungsergebnissen gebunden an Mikropartikel, Leukozyten oder auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten und muss wahrscheinlich erst durch zelluläre Interaktionen zwischen Mikropartikeln, Thrombozyten und Leukozyten aktiviert, gebildet oder transferiert werden (Giesen et al., 1999; Mackman et al., 2007; Rauch et al., 2000; Sim et al., 2005). Wir verglichen die Plaque-induzierte Fibrinbildungszeit mit der von TF und fibrillärem Kollagen: Dabei zeigte sich eine sehr ähnliche Fibrinbildungszeit für TF und atherosklerotischen Plaque in recalcifiziertem Citrat-PPP, PRP und Blut (siehe 5.3.1). Aufgrund der Tatsache, dass die Plaque-induzierte Fibrinbildungszeit im Blut nicht signifikant schneller war, als im PRP oder PPP, zeigte sich, dass die Bildung von intravaskulärem TF im Blut unter statischen Bedingungen eher eine untergeordnete Rolle für die Plaque-induzierte Fibrinbildung zu spielen schien, zumindest nicht zur Plaque-induzierten Fibrinbildungszeit unter statischen Bedingungen beizutragen schien. Außerdem führte die Blockade des Plaque-TF sowohl im

recalcifizierten Citrat-PRP, als auch im recalcifizierten Citrat-Blut, wo intravaskulärer TF gebildet werden kann, zu einer ähnlich drastischen Inhibition der Plaque-induzierten Fibrinbildung bei allen untersuchten Plaques (n= 30, siehe 5.1.4, 5.3.2). Diese Ergebnisse deuteten ebenso auf den wichtigen Einfluss von Plaque-TF auf die Plaque-induzierte Gerinnung hin. Trotzdem favorisieren manche auch unter statischen Bedingungen als Pathomechanismus der Atherothrombose die Akkumulation von *blood borne* TF im wachsenden Thrombus (Engelmann et al., 2003; Zillmann et al., 2001). Ein Beitrag von intravaskulärem TF war außerdem durch eine fehlende Wirkung der Zugabe der gleichen finalen Konzentration des TF-AK zum Blut unwahrscheinlich. Möglicherweise befand sich der Zell-, Mikropartikel-, oder Plättchen-gebundene intravaskuläre TF unmittelbar nach dessen Translation und Expression in einem funktionell inaktiven „enkryptischen“ Zustand (Monroe and Key, 2007). Dessen Umwandlung in eine aktivierte „dekryptische“ Form durch assoziative und dissoziative Prozesse des Moleküls könnte eine gewisse Zeitspanne von mehreren Minuten erfordern (Eilertsen and Osterud, 2004). Diese Überlegung ist deswegen interessant, da Engelmann et al. fanden, dass intravaskulärer TF auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten nur eine geringe Aktivität besitzt und erst nach einer Interaktion zw. Plättchen und Leukozyten „enkryptisiert“ wird (Engelmann et al., 2003). Außerdem wären hohe Konzentrationen von aktivem, im Blut zirkulierendem TF wahrscheinlich nicht mit dem Leben vereinbar, da es zu einer generalisierten Gerinnungsaktivierung kommen würde (Butenas et al., 2005).

Nach TF-Zugabe unterschieden sich die Fibrinbildungszeiten im PRP und im Blut signifikant von denen im PPP, lagen jedoch insgesamt im Bereich derer der Plaque-Homogenate. Kollagen-Konzentrationen, die im Aggregometer maximale Thrombozytenaggregation hervorriefen, induzierte erst sehr spät nach ca. 20 min eine Fibrinbildung im recalcifizierten Citrat-PRP und -Blut. Diese Werte lagen nahe den Kontrollwerten. Erst eine 5x höhere Konzentration induzierte, wie früher gezeigt (Zillmann et al., 2001), wahrscheinlich über die Bildung von TF im Blut, eine Fibrinbildung, die allerdings auch erst sehr spät auftrat (nach ca. 13 min im PRP und nach 16 min im Blut). Da bisher keine Mechanismen bekannt sind, durch welche im PRP die Bildung von intravaskulärem TF stimuliert wird, könnten andere Mechanismen für die Kollagen- induzierte Gerinnung im PRP in Frage kommen, z.B. eine Aktivierung des F XII des intrinsischen Gerinnungssystems. Dieser Mechanismus war im Rotem[®] Thrombelastograph ausgeschlossen, da hier standardisiert das F XII inhibierende CTI zugegeben wird und wird unter 6.4 gesondert diskutiert.

Weder die Hemmung von GPVI, noch die Verwendung spezifischer AK gegen Kollagen Typ I und III im Plaque, noch der Verdau des gesamten Plaque-Kollagens führten zu einer Änderung der Plaque-induzierten Fibrinbildungszeit im Rotem[®] Thrombelastograph. Diese

Resultate zeigen, dass die Thrombozytenaktivierung induziert durch kollagene Plaque-Strukturen nicht zu einer Verkürzung der Plaque-induzierten Fibrinbildungszeit beitrug.

Somit schien auch die Kinetik der Plaque-induzierten Fibrinbildung im recalcifizierten Citrat-PPP, -PRP und -Blut, ebenso wie die Kinetik der Thrombinbildung im PFP und PRP unter statischen Bedingungen ausschließlich vom Plaque-TF abhängig zu sein. Weder die Aktivierung von Thrombozyten durch kollagene Plaque-Strukturen, noch die Bildung von intravaskulärem TF trugen zur Fibrinbildungszeit bei. Es wäre möglich, dass die Aktivierung von Thrombozyten durch kollagene Plaque-Strukturen zu einer quantitativen Zunahme der Fibrinmenge führt. Dies sollte in zukünftigen Experimenten noch untersucht werden.

Die Zusammenschau aller Ergebnisse der statischen Messgeräte ergab, dass es im Rahmen der Plaque-induzierten Thrombusbildung sowohl zur Thrombozytenaggregation (vermittelt durch kollagene Plaque-Strukturen), als auch zur Fibrinbildung (vermittelt durch Plaque-TF) kam. Diese beiden Mechanismen liefen nacheinander (zuerst Thrombozytenaggregation, dann erst Fibrinpolymerisation) und völlig unabhängig voneinander ab, da sich eine Blockade des GPVI-Rezeptors bzw. der kollagenen Plaque-Strukturen ausschließlich auf die Thrombozytenaggregation inhibitorisch auswirkte, und eine Hemmung des Plaque-TF allein die Plaque-induzierte Thrombin- und Fibrinbildung beeinflusste. Im Folgenden wird diskutiert, wie und warum sich die Ergebnisse unter arteriellen Flussbedingungen wahrscheinlich von denen im statischen System unterscheiden.

6.3 Mechanismus der Plaque-induzierten Thrombusbildung unter arteriellen Flussbedingungen: Rolle von kollagenen Plaque Strukturen und TF

Die Bedingungen unter Blutfluss sind durch die vorhandene Strömung völlig andere, als unter statischen Bedingungen und könnten daher andere Pathomechanismen der Plaque-induzierten Thrombozyten- und Gerinnungsaktivierung hervorrufen. Durch die Flussversuche gelang es uns, in einem *in vitro* Perfusionsmodell die zeitliche Abfolge der Thrombozytenadhäsion, Aggregation und den Zeitpunkt der Fibrinbildung an atherosklerotischem Plaque-Material mit bisher in dieser Auflösung noch nicht gezeigten Aufnahmen zu entschlüsseln. Unter statischen Bedingungen genügen *in vitro* kleinste Mengen Thrombin (einige nM), um das Blut gerinnen zu lassen, da es in den Messgefäßen akkumulieren kann (Mann et al., 2003b). Es ist zu erwarten und wurde gezeigt, dass unter arteriellen Flussbedingungen diese Spuren von Thrombin möglicherweise verdünnt und rasch „weggewaschen“ werden (Diquelou et al., 1994), vielleicht ohne eine sofortige

Plättchenaktivierung und Fibrinpolymerisation am Plaque zu bewirken. Die Bildung von Strömungsnischen innerhalb der Thrombozytenaggregate könnte die Voraussetzung dafür liefern, das gebildete Thrombin an der Läsion zu konzentrieren, um dadurch eine suffiziente Thrombozytenaktivierung und Fibrinpolymerisation hervorzurufen. Somit könnte die unmittelbare Nachbarschaft von prokoagulatorischen aktivierten Thrombozyten und Strömungsnischen mit sehr langsamen Fließgeschwindigkeiten des Blutes wichtig sein für die Ermöglichung der Fibrinpolymerisation unter arteriellen Strömungsbedingungen.

Sowohl auf Glasdeckplättchen immobilisiertes fibrilläres Kollagen, als auch immobilisiertes atherosklerotisches Plaque-Homogenat induzierten unter Blutfluss zunächst eine Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Dabei zeigten Kollagen und Plaque eine vergleichbare Kinetik. Sowohl bei Kollagen-, als auch bei Plaque-Stimulation kam es erst nach einem zeitlich deutlich abgrenzbaren Zeitintervall nach ca. 6 min zu einer Fibrinbildung. Diese trat ausschließlich im Bereich der Thrombozytenaggregate auf und die Fibrinfäden wuchsen unabhängig von der Strömungsrichtung des Blutes in einer radiären, sternförmigen Anordnung, ausgehend vor allem vom Boden der Thrombozytenaggregate in Bereich des immobilisierten Plaque-Homogenats. Für die bevorzugte Entstehung der Fibrinfäden im Bereich großer Thrombozytenaggregate könnten verschiedene Dinge verantwortlich sein: **1)** Innerhalb der Aggregate bildeten sich Strömungsnischen, in denen Rezirkulationszonen mit extrem verlangsamtem Blutfluss und Turbulenzen entstanden. Das könnte auch bei hohen arteriellen Wandscherraten, die sonst eher hinderlich für die Fibrinbildung sind (Sakariassen et al., 1998), die optimalen Bedingungen für die Thrombin-Akkumulation und die exzessive Fibrinpolymerisation schaffen (Reininger et al., 1995). **2)** Durch die zunehmende Thrombozytenaktivierung durch kollagene Strukturen in atherosklerotischen Plaques entstehen immer mehr prokoagulatorische Oberflächen, die gerade bei hohen Scherraten nötig sind, damit die Gerinnungskaskade beschleunigt ablaufen kann. Denn vor allem die Aktivität der Tenase- und Prothrombinase-Komplexe der Gerinnungskaskade (FIXa-FVIIIa und FXa-FVa) ist in höchstem Maße abhängig von aktivierten Thrombozytenoberflächen und anderen Phospholipidoberflächen (Heemskerk et al., 2002; Monroe et al., 1994). In Echtzeit wurde beobachtet, dass die entstandenen Fibrinpolymere für die Stabilisierung der Thrombozytenaggregate und für die weitere Rekrutierung und Aktivierung von Thrombozyten im wachsenden Thrombus sorgten.

Die beobachteten Ereignisse in der Flusskammer waren völlig andere, wenn man das recalcifizierte Citrat-Blut über eine mit TF beschichteten Oberfläche (0,1ng) fließen ließ: In einem ersten Schritt unmittelbar nach Beginn des Blutflusses entstanden im Bereich der TF-Beschichtung der Glasdeckplättchen zunächst Fibrinfasern in einer parallel zur Strömungsrichtung verlaufenden Anordnung. Erst in einem späteren zweiten Schritt bildeten

Thrombozyten kleine Aggregate an den Fibrinfäden. Die Beschichtung mit einer dreifach höheren Konzentration verkürzte lediglich die Zeit bis zur Entstehung der ersten Fibrinfäden von einigen Minuten auf einige Sekunden, änderte aber nichts an der Reihenfolge der zunächst entstehenden Fibrinbildung und anschließender Thrombozytenaggregation. Die Thrombozytenaggregation war in diesen Fällen mit größter Wahrscheinlichkeit durch Thrombin oder zusätzlich auch durch Fibrin vermittelt, das durch die Bindung an den GPIIb-IIIa Rezeptor ebenfalls Thrombozyten-aktivierende Eigenschaften besitzt (Beguin and Kumar, 1997; Billy et al., 1997; Monroe et al., 2002).

Dieser grundlegend unterschiedliche Mechanismus der TF-induzierten Thrombusbildung im Vergleich zur Plaque- oder Kollagen-induzierten Thrombusbildung gab uns bereits erste Hinweise dafür, dass wahrscheinlich kollagene Plaque-Strukturen für die initiale Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation auch unter Fluss verantwortlich sind. In der Tat führte die Inkubation des Blutes mit GPVI-AK zu einer Hemmung der initialen Thrombozytenaggregation (siehe 5.4.2.4). Durchschnittlich kam es, ähnlich wie unter statischen Bedingungen, zu einer 80%igen Reduktion der Adhäsion und Aggregation der Plättchen in den ersten 5 min nach Flussbeginn. Bei einem Blutspender wurde gar keine Thrombozytenaggregation bis zum Ende des Blutflusses beobachtet. Ein Grund für diese unterschiedlich stark ausgeprägte Hemmung der Blutplättchen könnte sein, dass die thrombozytären GPVI-Expression individuell sehr unterschiedlich ist (Bigalke et al., 2006; Ollikainen et al., 2004). Eine hohe Expression von GPVI-Rezeptoren könnte dazu führen, dass mit der verwendeten GPVI-AK Menge nicht alle Rezeptoren blockiert wurden, und bei Spendern mit möglicherweise hoher GPVI-Expression auch eine höhere AK Konzentration erforderlich gewesen wäre. Die Vorbehandlung der Plaques mit rekombinanten GPVI-Fc inhibierte die Thrombozytenadhäsion und –aggregation lediglich für 3 min nach Flussbeginn. Größe und Anzahl der Aggregate unterschieden sich nach 5 min bereits nicht mehr von der Kontrolle. Die Ursache für die im Vergleich zum GPVI-AK geringere Hemmbarkeit der Thrombozytenadhäsion und –aggregation durch rekombinantes GPVI-Fc kann unterschiedliche Gründe haben: Das rekombinante GPVI-Fc wurde mit dem Plaque-Homogenat vorinkubiert und bindet sich an GPVI-bindende kollagene Strukturen im Plaque, während der GPVI-AK zum Blut gegeben wurde und direkt an den GPVI Rezeptor auf Thrombozyten bindet. Die Besetzung unterschiedlicher Bindungsstellen könnte eine unterschiedlich starke Hemmung der Kollagen-GPVI-Interaktion bewirken. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die Experimente mit rekombinantem GPVI-Fc in LMWH-Blut in niedriger Konzentration durchgeführt wurden, während die Versuche mit dem GPVI-AK in recalcifiziertem Citrat-Blut stattfanden. Die Verwendung unterschiedlicher Antikoagulantien (Heparin/ recalcifiziertes Citrat-Blut) könnte sich unterschiedlich auf die Interaktion des

thrombozytären GPVI mit kollagenen Plaque Strukturen und damit die Plaque-induzierte Thrombozytenadhäsion und –aggregation auswirken.

Auch nach GPVI-Hemmung der Thrombozyten kam es unter Fluss nach 5 min (in 4 von 5 Versuchen). zu einer langsamen, stetigen Zunahme der Thrombozytenadhäsion und –aggregation. Diese Thrombozytenadhäsion und –aggregation wurde an Plaque-Material beobachtet, aber eine sekundäre Thrombozytenaggregation, ausgelöst durch Plaque-TF und nach vorheriger Fibrinbildung (wie bei rekombinatem TF beobachtet), fand nicht statt. Der Grund für diese unvollständige Hemmung der späteren Thrombozytenaggregation 5 min nach Flussbeginn ist unklar. Unter arteriellen Flussbedingungen könnte in atherosklerotischen Plaques vorhandener vWF oder zirkulierender, an kollagene Plaque-Strukturen bindender vWF wichtig für die Thrombozytenaggregation sein. Es wurde publiziert, dass vWF nicht nur für die Adhäsion der Thrombozyten und die Vermittlung des Rollens der Thrombozyten auf Kollagen wichtig ist, sondern dass die Bindung von vWF an den Fibrinogenrezeptor $\alpha_{IIb}\beta_{III}$ bei hohen Scherraten auch die Thrombozytenaggregation vermittelt (Ruggeri et al., 1999; Ruggeri et al., 2006). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass bei arteriellen Scherraten von 1500/sec allein die Blockade von GPIIb/IIIa im Hirudin-Blut bereits zu einer sehr starken Reduktion nicht nur der Plaque-induzierten Thrombozytenadhäsion, sondern auch der Thrombozytenaggregation führte (Penz et al., 2007). Damit wäre erklärbar, dass trotz der GPVI-Blockade die Thrombozytenadhäsion und –aggregation zu einem späteren Zeitpunkt nicht vollständig inhibiert wurde. Diese vWF-vermittelte Aggregation könnte zu der Bildung von Strömungsnischen führen, in denen durch Plaque-TF gebildetes Thrombin akkumulieren könnte. Für die Rolle von Thrombin als Stimulus für die spätere Phase der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation unter arteriellen Flussbedingungen sprechen frühere Ergebnisse im Hirudin-Blut, in denen durch die zusätzliche Inhibition von Thrombin zusammen mit einem GPVI-AK die Thrombozytenaggregation über 10 min komplett gehemmt wurde (Penz et al., 2005).

Die Hemmung des Plaque-TF beeinflusste die Thrombozytenaggregation nicht. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass ohne die vorherige Bildung von Strömungsnischen durch Thrombozytenaggregate alles Thrombin, das durch Plaque-TF entsteht, verdünnt und weggewaschen wurde, ohne eine Thrombozytenaggregation am Plaque zu induzieren. Erst in einer späteren Phase der Plaque-induzierten Thrombusbildung, nachdem die Thrombozytenaggregate groß genug waren, damit Thrombin in Nischen akkumulieren kann, könnte Thrombin zur Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation beitragen.

Die Plaque-induzierte Fibrinbildung wurde durch die Vorinkubation der Plaques mit TF-AK hingegen in allen Versuchen drastisch inhibiert: die Fibrinbildungszeit war auf >12min

verzögert. Somit war der Plaque-TF allein für diese Fibrinbildung unter arteriellen Flussbedingungen verantwortlich. Die Expression und Akkumulation von intravaskulärem TF im wachsenden Thrombus als Pathomechanismus für eine lokale Fibrinbildung nach Gefäßwandverletzung oder Atherothrombose ist nach neueren Ergebnissen vor allem für die Amplifikation der Fibrinbildung in der Propagationsphase der Blutgerinnung bedeutend (Mackman et al., 2007). Nach unseren Ergebnissen könnte ein Beitrag von intravaskulärem TF frühestens ca. 12 min nach Kontakt des Blutes mit dem atherosklerotischen Plaque-Homogenat sich bemerkbar machen, nicht jedoch in der Initiationsphase, weil in dieser der Plaque-TF für die Fibrinbildung verantwortlich ist.

Unter arteriellen Flussbedingungen schien die Thrombozytenaggregation induziert durch kollagene Plaque-Strukturen, anders als unter statischen Bedingungen, die Voraussetzung dafür zu sein, dass die Plaque-TF-induzierte Fibrinbildung stattfinden kann. Es wäre interessant herauszufinden, ob es allein die Strömungsnischen der Aggregate sind, die für die Akkumulation von Thrombin sorgen, oder ob es die Anwesenheit aktivierter, PS-exponierender Thrombozyten bedarf, um die Fibrinpolymerisation unter Fluss zu katalysieren.

6.4 Beitrag des F XII des intrinsischen Gerinnungssystems zur Thrombogenität von atherosklerotischen Plaques und fibrillärem Kollagen

Lange Zeit ging man davon aus, dass die Bildung des F XIIa durch die Kontaktaktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems *in vivo* eine untergeordnete oder gar keine Rolle spielt (Koster et al., 1994; Zeerleder et al., 1999) (siehe auch Kapitel 2.2.3). Durch eine kürzlich publizierte Arbeit wurde die Diskussion um die Rolle des FXII und der Kontaktaktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems bei der arteriellen Thrombusbildung neu entfacht (Renne et al., 2005).

Nach unseren Ergebnissen spielt F XII keine Rolle für die Fibrinbildung bei der Atherothrombose induziert durch humane atherosklerotische Plaques. Die Hemmung von F XII durch CTI im Aggregometer (PRP), im Thrombogram (PRP) und unter arteriellen Flussbedingungen (Blut) bewirkte keine Verlängerung der Thrombin- bzw. Fibrinbildungszeit. Im Rotem[®] Thrombelastograph wurden alle Versuche in der Gegenwart von CTI durchgeführt, da nach Zugabe von Ca^{2+} und Mg^{2+} die Fibrinbildung auch ohne zusätzliche Stimulation mit Plaque in Abwesenheit von CTI schon sehr rasch (ca. nach 600 sec) beobachtet wurde.

Daher kann keine Schlussfolgerung über die Rolle des intrinsischen Systems für andere Eigenschaften des Gerinnsels (*clot formation time; mean clot firmness; etc.*) gezogen werden.

Prinzipiell wäre denkbar gewesen, dass durch kollagene Strukturen im atherosklerotischen Plaque-Material oder aktivierte Thrombozyten die für die Aktivierung des F XII benötigten negativ geladenen Oberflächen liefern (Kawamoto and Kaibara, 1990; Osterud et al., 1979; Renne et al., 2005; Walsh and Griffin, 1981). Auch hätte man sich eine unspezifische Aktivierung von F XII durch Proteine der subendothelialen Matrix, die im atherosklerotischen Plaque-Homogenat vorkommen können, vorstellen können (Hojima et al., 1984). Wir fanden jedoch, dass der Plaque-TF für die Plaque-induzierte Thrombin- und Fibrinbildung verantwortlich ist. Dieser extrinsische Weg führt deutlich schneller zur Thrombin- und Fibrinbildung, als der intrinsische Pfad, der durch F XII initiiert wird (Mann, 1999). Deswegen könnte es sein, dass durch die hohe TF Aktivität in humanen atherosklerotischen Plaques die Aktivierung des intrinsischen Systems keine zusätzliche Wirkung zeigt, da diese erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Fibrinbildung führt. In der Tat wurde im Aggregometer die Plaque-induzierte Gerinnselbildung nach Hemmung des Plaque-TF durch die zusätzliche Gabe von CTI noch weiter herausgezögert. (siehe 5.1.4). Dies könnte aber ebenso auf die Hemmung der *in vitro* stattfindenden unspezifischen Kontaktaktivierung von F XII durch CTI zurückzuführen sein. Ein weiterer Grund, warum die kollagenen Plaque-Strukturen das F XII-abhängige intrinsische System nicht deutlich aktivierten, könnte sein, dass die Plaques eingefroren und wieder aufgetaut wurden und dadurch die Tertiär- und Quarternärstruktur der kollagenen Plaque-Strukturen beeinträchtigt worden sein könnte. Diese könnten wichtig sein für die negative Ladung von Kollagen und die dadurch mögliche Aktivierung des F XII. In diesem Zusammenhang wurde gefunden, dass die kollagenen Plaque-Strukturen nicht eine typische fibrilläre Morphologie zeigten (Penz et al., 2005).

Völlig anders wirkte sich eine CTI Zugabe auf die Kollagen-induzierte Thrombus-Bildung im PRP und im Blut aus. Fibrilläres Kollagen induzierte, ebenso wie atherosklerotische Plaques, im PRP und im Blut unter arteriellen Flussbedingungen eine Thrombozytenaggregation, gefolgt von einer Thrombin- und Fibrinbildung. Während die Thrombozytenaggregation zwar ebenfalls unbeeinflusst blieb, kam es zu einer Verzögerung der Thrombinbildung im PRP und zu einer vollständigen Hemmung der Fibrinbildung im PRP, und auch im Blut unter arteriellen Flussbedingungen durch CTI. Damit zeigen unsere Resultate, dass fibrilläres Kollagen in Anwesenheit von Thrombozyten eine F XII-abhängige Gerinnung induzieren könnte. Die Frage, ob Kollagen direkt F XII aktivierende Eigenschaften besitzt, wurde über Jahrzehnte kontrovers beantwortet (Kawamoto and Kaibara, 1990; Koenig et al., 1991; Osterud et al., 1979; Renne et al., 2005). Es wurde diskutiert, dass entweder die fibrilläre Struktur der Kollagene, oder spezifische Aminosäure-Sequenzen den F XII direkt aktivieren könnten. Im

Kollagen-stimulierten PFP (2,5µg/ml und 10µg/ml) wurde jedoch keine messbare Thrombinmenge (*etp*, *peak*) im Vergleich zum unstimulierten PFP gemessen, obwohl eine Verkürzung der *lag time* und der *t_{peak}* der Thrombinbildung im Vergleich zur Kontrolle verzeichnet wurden (siehe 5.2.1). Die Ergebnisse könnten darauf hin deuten, dass fibrilläres Kollagen den F XII im PFP stimulieren kann. Die entstandene Thrombinmenge war jedoch in Abwesenheit von Thrombozyten so gering, dass sie gerätebedingt unterhalb eines bestimmten messbaren Schwellenwerts lag. Aktivierte Thrombozyten könnten auf einen in der Literatur bisher nicht beschriebenen Mechanismus die F XIIa-Bildung stimulieren. Vorstellbar wäre, dass z.B. PS, exponiert auf aktivierten Thrombozyten, die Umwandlung von F XII zu F XIIa stimulieren könnte. Nahe liegend wäre ebenso, dass die Thrombinbildung durch unspezifische Kontaktaktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems initiiert wurde und die Gerinnung durch die Bindung der Tenase- und Prothrombinase- Komplexe an aktivierte Thrombozyten propagiert wurde. Nach CTI Zugabe war unter arteriellen Flussbedingungen im Blut die Kollagen-induzierte Fibrinbildung bis zu 15 min nach Flussbeginn nicht nachweisbar. Dies kann dadurch erklärt werden, dass gerade unter Fluss die Thrombinbildung an den aktivierten, PS-exponierenden Thrombozyten sehr rasch abläuft und dadurch die Fibrinbildung induziert wird.

Schließlich muss die Hemmung des intrinsischen Gerinnungssystems bei *in vitro* Experimenten zur Untersuchung der Atherothrombose unter koagulatorischen Bedingungen kritisch bedacht werden, da einerseits die Inhibition der Kontaktaktivierung nötig ist, andererseits aber ein Signalweg ausgeschaltet wird, der eventuell doch eine Rolle bei der arteriellen Thrombusbildung in Folge Plaque-Ruptur spielen könnte.

6.5 Lokalisation von TF in atherosklerotischen Plaques

Nachdem gezeigt worden war, dass die Kollagen-vermittelte GPVI-Aktivierung für die initiale Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation und der Plaque-TF für die Plaque-induzierte Thrombin- und Fibrinbildung verantwortlich zu sein scheint, war es von großem Interesse, weitere Erkenntnisse über die Lokalisation von TF und Kollagen in den von uns untersuchten atherosklerotischen Plaques zu gewinnen. Unsere Arbeitsgruppe identifizierte und lokalisierte bereits die Kollagene Typ I und III in diesen Plaques im Bereich des lipidreichen Kern und der fibrösen Kappe (Penz et al., 2005). Mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz gelang es weiterhin, den Plaque-TF in den Operationspräparaten humaner Carotis-Plaques nachzuweisen. In unseren Präparaten befand sich der Plaque-TF vor allem intrazellulär am Übergang der Intima zum nekrotischen Kern, in der fibrösen Kappe und im Bereich der Schulter-Region, was von Anderen ebenfalls beobachtet wurde (Moons et al., 2002). Da die

Schulter-Region der Bereich ist, wo atherosklerotische Plaques häufig rupturieren (Michel, 2001), trägt die dortige Akkumulation von TF wahrscheinlich zur Thrombogenität der Läsionen bei. Der Plaque-TF war in unseren immunhistochemischen Präparaten stets intrazellulär lokalisiert, v.a. in Makrophagen, Schaumzellen und glatten Muskelzellen. Eigentlich würde man ihn als transmembranäres Glykoprotein auf der Zelloberfläche erwarten. Andere Arbeitsgruppen wiesen TF in atherosklerotischen Plaques überwiegend extrazellulär nach, vor allem Mikropartikel-assoziiert im lipidreichen Kern (Cortellaro et al., 2002; Zaman et al., 2000). Die Art der Fixierung oder auch der für die Anfärbung verwendete monoklonale TF-AK könnten mögliche Gründe sein für eine fehlende Nachweisbarkeit von extrazellulärem und auf Zelloberflächen lokalisiertem TF. Von anderen Forschergruppen wurden auch TF-positive Endothelzellen in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen (Hatakeyama et al., 1997). In unseren Plaque-Schnitten waren die den Plaque bedeckenden Endothelzellen überwiegend TF-negativ. Dies lag vielleicht daran, dass die Endothelzellen in unseren Präparaten in einem inaktiven Zustand vorlagen. Denn nur aktivierte Endothelzellen exprimieren bekanntermaßen TF (Shebuski and Kilgore, 2002). In der Zusammenschau ergibt sich hieraus eine mögliche Kollokalisierung von kollagenen Strukturen und TF vor allem im Bereich des lipidreichen Kerns und in der fibrösen Kappe. Nach Plaque-Ruptur dürfte es zur gleichzeitigen Exposition von TF und kollagenen Strukturen zum fließenden Blut kommen, ähnlich wie in unserem *in vitro* Modell der Beströmung von Plaque-beschichteten Oberflächen mit Blut.

6.6 Mögliche klinische Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick in die Zukunft

Kollagenfasern und TF gehören zu den wichtigsten thrombogenen Komponenten eines atherosklerotischen Plaques und als die entscheidenden Moleküle, die zum thrombotischen Verschluss des Gefäßes führen (Mackman, 2004; van Zanten et al., 1994). Die *in vivo* zur Verfügung stehenden therapeutischen Strategien sind häufig nicht in der Lage, die arterielle Thrombusbildung nach Plaqueruptur und die Gewebs-Ischämie suffizient zu verhindern (Rauch et al., 2001). Die standardisierte Therapie eines akuten Myokardinfarkts besteht nach wie vor in der Gabe von Heparin zur Hemmung der Blutgerinnung, sowie der Gabe von Aspirin und/oder ADP-P2Y₁₂-Rezeptor Antagonisten (v.a. Clopidogrel) zur Inhibition der Thrombozytenaggregation. Diese Kombination kann zu Blutungskomplikationen führen und Bedarf einer engen Überwachung der Patienten. Außerdem zeigte unsere Gruppe, dass Aspirin *in vitro* zwar unter statischen Bedingungen, nicht jedoch unter arteriellen Flussbedingungen die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation beeinflusste; auch die durch ADP-Rezeptor Antagonisten um 30% reduzierte Thrombozytenaggregation unter Fluss

wurde durch zusätzliche Zugabe von Aspirin zum Blut *in vitro* nicht weiter gesenkt (Penz et al., 2007).

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zeigen, dass die Hemmung des GPVI-Rezeptors auf Thrombozyten nicht nur im Hirudin-Blut (Penz et al., 2005), sondern auch im recalcifizierten Citrat-Blut unter arteriellen Flussbedingungen ein effektiver Weg ist, um die initiale Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation zu reduzieren. In Tierversuchen (Maus) wurde gefunden, dass die Infusion einer löslichen Form des GPVI-Rezeptors, die Thrombozytenadhäsion und –aggregation nach mechanischer Gefäßwandverletzung effizient inhibiert, ohne dass die Tiere eine Blutungsneigung aufwiesen (Massberg et al., 2004).

Aufgrund der Resultate der nicht vollständigen Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation durch GPVI-AK in einer späteren Phase (> 5min nach Kontakt des Blutes mit dem Plaque Homogenat) ist es vorstellbar, dass es beim Patienten nach Plaque-Ruptur trotz GPVI-Hemmung zu einer verzögerten arteriellen Thrombusbildung kommen könnte. Wünschenswert wären experimentelle Tiermodelle der Plaqueruptur, um die Plaque-induzierte Thrombusbildung *in vivo* zu untersuchen.

Um die Blutgerinnung zu beeinflussen, wurden direkte TF-Inhibitoren in Tiermodellen untersucht (z.B. rekombinantes TFPI-Protein und inaktivierter FVIIa als kompetitiver Inhibitor der TF-abhängigen FX-Aktivierung), die aber aufgrund hoher Dosierungen und Ineffektivität noch weit davon entfernt sind, in klinischen Studien eingesetzt zu werden (Rauch et al., 2001). Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wäre eine direkte Inhibition des Plaque-TF wünschenswert und vorstellbar durch spezifische Antagonisten oder Antikörper mit hoher Affinität zu TF. Da die TF-Konzentration in atherosklerotischen Plaques in sehr niedrigen Bereichen liegt (pM), wäre vielleicht nur eine sehr niedrige Dosierung von TF-Antagonisten nötig.

Der systemisch gebildete *blood borne* TF scheint nach den Resultaten dieser Forschungsarbeit keine Rolle für die initiale Phase der Plaque-induzierten Thrombusbildung während der ersten 15 min zu spielen. Allerdings ist nicht ausgeschlossen, dass der systemische, an der Stelle der Plaqueruptur gebildete TF eine Rolle für eine spätere Phase der Plaque-induzierten Thrombusbildung hat. Es wäre zu erwarten, dass dieser *blood borne* TF durch die systemische Gabe von TF-Hemmsubstanzen ebenfalls inhibiert werden sollte.

Direkte F Xa Inhibitoren, die sowohl die intrinsische, als auch die extrinsische Koagulation inhibieren (siehe Abb. 8), befanden sich bereits in präklinischen und klinischen Phase 1 Studien (Rauch et al., 2001). Immerhin haben klinische Phase 2 Studien gezeigt, dass oral verabreichtes Rivaroxaban, ein selektiver direkter F Xa Inhibitor, Patienten vor

Thrombembolien nach größeren operativen Eingriffen zu schützen vermag, ohne die Blutungszeit zu verlängern (Laux et al., 2007). Diese Ergebnisse betreffen allerdings nur die venöse, und nicht die arterielle Thrombusbildung. Vielleicht sind F Xa Inhibitoren jedoch auch bei der arteriellen Thrombusbildung effektiv einsetzbar. All diese Annäherungen zeigen das dringende Bedürfnis nach potenteren und sichereren antithrombotischen Therapien *in vivo*, um effektiv arterielle thrombotische Ereignisse nach Plaqueruptur oder -erosion zu verhindern, ohne Blutungskomplikationen hervorzurufen.

Diese Arbeit untermauert, wie wichtig es ist, mit neuen Medikamenten auf die beiden wichtigsten „Pfade“ der arteriellen Thrombusbildung einzugreifen: 1) Die Inhibition der Kollagen-GPVI-Interaktion und damit der initialen Thrombozytenaktivierung; 2) Die Inhibition des Plaque-TF und damit der Thrombin- und Fibrinbildung, die für die Verfestigung und Stabilisierung der arteriellen Thrombi verantwortlich ist.

7 Zusammenfassung

Kollagenes Material und TF akkumulieren in der atherosklerotischen Gefäßwand und werden bei einem akuten koronaren Ereignis durch die Ruptur eines vulnerablen atherosklerotischen Plaques dem fließenden Blut exponiert. Trotzdem ist nach wie vor strittig, ob die Thrombozytenaggregation induziert durch kollagene Plaque Strukturen, oder die Gerinnungsaktivierung durch Plaque TF der entscheidende Pathomechanismus ist, der zur Atherothrombose und zum oftmals tödlichen Verschluss eines Gefäßes führt. Zusätzlich wurden in letzter Zeit auch zirkulierende Mikropartikel und im Blut entstehender aktiver TF (intravaskulärer TF, *blood borne TF*) als wichtige thrombogene Stimuli der arteriellen Thrombus-Bildung diskutiert (Bogdanov et al., 2003; Butenas et al., 2005; Mackman, 2004; Zillmann et al., 2001). Auch dem Faktor XII wurde neuerdings eine entscheidende Bedeutung bei der Stabilisierung arterieller Thrombi beigemessen (Renne et al., 2005).

Wir entwickelten ein *in vitro* Modell, mit dem sowohl unter statischen, als auch unter arteriellen Flussbedingungen die initiale Phase der Atherothrombose (0-15 min) induziert durch atherosklerotische Plaques untersucht wurde. Durch die Zugabe von CaCl_2 und MgCl_2 zu Citrat-Blut oder -Plasma unmittelbar vor den Versuchen wurden möglichst physiologische Bedingungen wiederhergestellt. In diesem System konnte der detaillierte zeitliche Ablauf sowohl der Plaque-induzierten Aktivierung der Thrombozyten, als auch der Plaque-induzierten Thrombin- und Fibrinbildung untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe dieses Modells neue Erkenntnisse über die relative Bedeutung von Plaque-TF, kollagenen Plaque-Strukturen, intravaskulärem TF und F XII für die Plaque-induzierte Thrombozyten- und Gerinnungsaktivierung gewonnen, und es wurden neue Ergebnisse über deren zeitlichen Verlauf vorgestellt: Es wurde gefunden, dass der Beginn der Plaque-induzierten Thrombusbildung aus zwei Phasen besteht (Abb.50): In der ersten Phase, unmittelbar nach Kontakt der atherosklerotischen Plaque-Homogenate mit dem PRP oder Blut, kam es zu einer GPVI-Rezeptor vermittelten Thrombozytenadhäsion und -aggregation an kollagenes Material in atherosklerotischen Plaques. In einer zeitlich deutlich abgrenzbaren zweiten Phase kam es zur Gerinnungsaktivierung. Diese wurde ausschließlich durch Plaque-TF hervorgerufen, wie die Versuche nach Präinkubation der Plaques mit TF-AK klar zeigten.

Systemisch gebildeter, intravaskulärer TF oder die Aktivierung des F XII des intrinsischen Gerinnungssystems spielten keine Rolle bei der untersuchten initialen Phase der Plaque-induzierten Thrombusbildung.

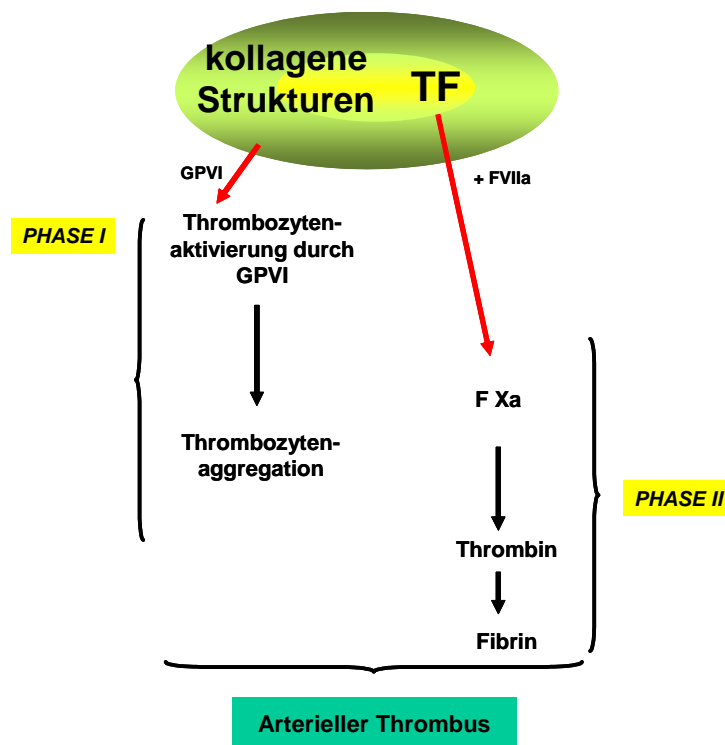


Abbildung 50: 2-Phasen Modell der Atherothrombose.

Phase I: kollagene Plaque-Strukturen aktivieren den GPVI-Rezeptor auf Thrombozyten und es kommt zur Thrombozytenadhäsion und -aggregation. **Phase II:** Plaque-TF-induzierte Thrombin- und Fibrinbildung.

Im statischen System (Aggregometer, Thrombogram, Rotem® Thrombelastograph) liefen die beiden Phasen getrennt voneinander ab: Kollagene Plaque Strukturen vermitteln GPVI-abhängig eine Thrombozytenaktivierung, hatten aber keinen Einfluss auf die Plaque-induzierte Thrombin –und Fibrinbildungszeit. Der Plaque-TF induzierte unabhängig von Thrombozyten in PPP, PRP und Blut gleich schnell eine Thrombin- und Fibrinbildung. Lediglich die Thrombinmenge wurde durch die Anwesenheit von Thrombozyten im PRP amplifiziert. Die durch den Plaque-TF-induzierte Thrombinbildung hatte keinen Einfluss auf die initiale Thrombozytenaggregation.

Unter arteriellen Flussbedingungen schienen die Phasen der Plaque-induzierten Thrombozyten- und Gerinnungsaktivierung zusammenzuhängen: Nur an den Stellen der Plaque-Homogenate, an denen sich bereits in der ersten Phase Thrombozytenaggregate gebildet hatten, entstand später, von Plaque-TF abhängig, Fibrin in einer radiären Anordnung in Strömungsnischen. Mechanistisch ist vorstellbar, dass die zuerst gebildeten Thrombozytenaggregate als Strömungsbarriere dienen könnten und dadurch die Plaque-TF initiierte Fibrinpolymerisation bei geringen Scherraten begünstigen könnten. Es könnten aber

auch aktivierte, PS-exponierende Thrombozyten für die Propagation der Plaque-TF initiierten Thrombinbildung erforderlich sein. Hierfür spricht, dass bei einer vollständigen Hemmung der GPVI-vermittelten Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation unter Fluss, die bei einem Proband beobachtet wurde, auch kein Fibrin mehr entstand.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass für eine effektive Therapie einer Plaque-induzierten arteriellen Thrombusbildung sowohl GPVI-Antagonisten zur Hemmung der Thrombozytenaggregation, als auch eine selektive Hemmung des Plaque-TF wünschenswert wären und möglicherweise ausreichend sein könnten.

Anhang

Inhalt der CD

Echtzeitaufnahmen (komprimierte Versionen) der Flussversuche (Ergebnisteil 5.4)

Film 1: Schwarz-weiß-Kamera, Hellfeldmikroskopie: Thrombozytenadhäsion- und aggregation an atherosklerotischem Plaque-Homogenat erfolgt vor der Fibrinbildung.

Recalcifiziertes Citrat Blut strömt in einer parallel-Platten Flusskammer über ein mit atherosklerotischem Plaque Homogenat beschichtetes Glasdeckplättchen. Scherrate 1500/s, 37°C, Objektiv 40x, zoom 1,6. Flussrichtung von rechts nach links. Diese Aufnahme zeigt, dass im Rahmen der Atherothrombose zuerst eine thrombozytäre Adhäsion und Aggregation erfolgt. Erst in einer zeitlich deutlich abgrenzbaren zweiten Phase kommt es zur Fibrinbildung ausschließlich im Bereich der Thrombozytenaggregate.

Zeitpunkt t= 0 min nach Flussbeginn: Zu sehen ist immobilisiertes atherosklerotisches Plaque-Homogenat, das mit Blut beströmt wird. Die mit Mepacrin angefärbten Thrombozyten leuchten hell. Einzelne Thrombozyten (weiß) adhärieren auf der rechten Seite am atherosklerotischen Plaque.

Zeitpunkt t= 3 min nach Flussbeginn: Thrombozyten aggregieren im rechten Teil des Plaques und bilden eine Aggregat-Brücke nach links (weiß). Durch die Verlangsamung der Strömung sind rollende Erythrozyten zu sehen.

Zeitpunkt t = 6 min nach Flussbeginn: Es hat sich ein großes, stabiles Thrombozytenaggregat gebildet, das den gesamten mit Plaque beschichteten Bereich bedeckt. An einer Stelle im unteren Bereich des Aggregats in einer Strömungsnische beginnt die Fibrinbildung entgegengesetzt der Strömungsrichtung.

Zeitpunkt t = 10 min nach Flussbeginn: Fibrinfasern polymerisieren und entstehen an immer mehr Stellen am Boden im Bereich des Thrombozytenaggregats.

Film 2: Farbkamera, Fluoreszenzmikroskopie: Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an atherosklerotischem Plaque-Material unter arteriellen Flussbedingungen.

Zeitpunkt t = 3 min nach Flussbeginn: Recalcifiziertes Citrat Blut (rot) strömt in einer parallel-Platten Flusskammer über ein mit atherosklerotischem Plaque Homogenat beschichtetes Glasdeckplättchen. Scherrate 1500/s, 37°C, Objektiv 40x, zoom 1,0, Flussrichtung von links nach rechts. Thrombozyten erscheinen fluoreszenzmikroskopisch grün, da die dichte Granula der Plättchen mit Mepacrin beladen sind. Zu sehen sind wachsende Thrombozytenaggregate ausschließlich an den mit Plaque Homogenat beschichteten Stellen des Glasdeckplättchens. Nach 15 sec wird der zoom von 1,0 auf 1,6 erhöht und man erkennt sogar die einzelnen fluoreszierenden Granula innerhalb der Thrombozyten.

Film 3: Schwarz-weiß-Kamera, Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie: Fibrin am Boden eines großen Thrombozytenaggregats

Zeitpunkt t = 10 min nach Flussbeginn: Recalcifiziertes Citrat Blut strömt in einer parallel-Platten Flusskammer über atherosklerotisches Plaque Homogenat, an dem sich bereits ein großes Thrombozytenaggregat (weiß) und Fibrin gebildet haben. Scherrate 1500/s, 37°C, Objektiv 40x, zoom 1,6. Flussrichtung von links nach rechts. Am Boden des Thrombozytenaggregats sind Fibrinfasern zu sehen. Auch Erythrozyten haben sich in dem großen Aggregat verfangen.

Literaturverzeichnis

Aikawa, M., Rabkin, E., Okada, Y., Voglic, S. J., Clinton, S. K., Brinckerhoff, C. E., Sukhova, G. K., and Libby, P. (1998). Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation* 97, 2433-2444.

Alberio, L., Safa, O., Clemetson, K. J., Esmon, C. T., and Dale, G. L. (2000). Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood* 95, 1694-1702.

Albrecht, S., Kotzsch, M., Siegert, G., Luther, T., Grossmann, H., Grosser, M., and Muller, M. (1996). Detection of circulating tissue factor and factor VII in a normal population. *Thromb Haemost* 75, 772-777.

Anand, S. X., Viles-Gonzalez, J. F., Badimon, J. J., Cavusoglu, E., and Marmur, J. D. (2003). Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease. *Thromb Haemost* 90, 377-384.

Andre, P., Prasad, K. S., Denis, C. V., He, M., Papalia, J. M., Hynes, R. O., Phillips, D. R., and Wagner, D. D. (2002). CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat Med* 8, 247-252.

Andrews, R. K., Shen, Y., Gardiner, E. E., Dong, J. F., Lopez, J. A., and Berndt, M. C. (1999). The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. *Thromb Haemost* 82, 357-364.

Ardissino, D., Merlini, P. A., Ariens, R., Coppola, R., Bramucci, E., and Mannucci, P. M. (1997). Tissue-factor antigen and activity in human coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 349, 769-771.

Ardissino, D., Merlini, P. A., Bauer, K. A., Bramucci, E., Ferrario, M., Coppola, R., Fetiveau, R., Lucreziotti, S., Rosenberg, R. D., and Mannucci, P. M. (2001). Thrombogenic potential of human coronary atherosclerotic plaques. *Blood* 98, 2726-2729.

Badimon, J. J., Lettino, M., Toschi, V., Fuster, V., Berrozpe, M., Chesebro, J. H., and Badimon, L. (1999). Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation* 99, 1780-1787.

Badimon, L., Badimon, J. J., Turitto, V. T., Vallabhajosula, S., and Fuster, V. (1988). Platelet thrombus formation on collagen type I. A model of deep vessel injury. Influence of blood rheology, von Willebrand factor, and blood coagulation. *Circulation* 78, 1431-1442.

Baglia, F. A., and Walsh, P. N. (2000). Thrombin-mediated feedback activation of factor XI on the activated platelet surface is preferred over contact activation by factor XIIa or factor XIa. *J Biol Chem* 275, 20514-20519.

Balasubramanian, V., Grabowski, E., Bini, A., and Nemerson, Y. (2002). Platelets, circulating tissue factor, and fibrin colocalize in ex vivo thrombi: real-time fluorescence images of thrombus formation and propagation under defined flow conditions. *Blood* 100, 2787-2792.

Barnes, M. J. (1985). Collagens in atherosclerosis. *Coll Relat Res* 5, 65-97.

- Barnes, M. J., and Farndale, R. W. (1999). Collagens and atherosclerosis. *Exp Gerontol* 34, 513-525.
- Bavendiek, U., Libby, P., Kilbride, M., Reynolds, R., Mackman, N., and Schonbeck, U. (2002). Induction of tissue factor expression in human endothelial cells by CD40 ligand is mediated via activator protein 1, nuclear factor kappa B, and Egr-1. *J Biol Chem* 277, 25032-25039.
- Beck, J., Ferrucci, L., Sun, K., Fried, L. P., Varadhan, R., Walston, J., Guralnik, J. M., and Semba, R. D. (2008). Circulating oxidized low-density lipoproteins are associated with overweight, obesity, and low serum carotenoids in older community-dwelling women. *Nutrition*.
- Beguin, S., and Kumar, R. (1997). Thrombin, fibrin and platelets: a resonance loop in which von Willebrand factor is a necessary link. *Thromb Haemost* 78, 590-594.
- Behnke, C. A., Yee, V. C., Trong, I. L., Pedersen, L. C., Stenkamp, R. E., Kim, S. S., Reeck, G. R., and Teller, D. C. (1998). Structural determinants of the bifunctional corn Hageman factor inhibitor: x-ray crystal structure at 1.95 Å resolution. *Biochemistry* 37, 15277-15288.
- Berckmans, R. J., Neuwland, R., Boing, A. N., Romijn, F. P., Hack, C. E., and Sturk, A. (2001). Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* 85, 639-646.
- Bevers, E. M., Rosing, J., and Zwaal, R. F. (1986). Membrane phospholipids are the major determinant of the binding site for factor X activating--and prothrombinase complexes at the surface of human platelets. *Agents Actions Suppl* 20, 69-75.
- Bigalke, B., Lindemann, S., Ehlers, R., Seizer, P., Daub, K., Langer, H., Schonberger, T., Kremmer, E., Siegel-Axel, D., May, A. E., and Gawaz, M. (2006). Expression of platelet collagen receptor glycoprotein VI is associated with acute coronary syndrome. *Eur Heart J* 27, 2165-2169.
- Billy, D., Briede, J., Heemskerk, J. W., Hemker, H. C., and Lindhout, T. (1997). Prothrombin conversion under flow conditions by prothrombinase assembled on adherent platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis* 8, 168-174.
- Biro, E., Sturk-Maquelin, K. N., Vogel, G. M., Meuleman, D. G., Smit, M. J., Hack, C. E., Sturk, A., and Nieuwland, R. (2003). Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost* 1, 2561-2568.
- Bogdanov, V. Y., Balasubramanian, V., Hathcock, J., Vele, O., Lieb, M., and Nemerson, Y. (2003). Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* 9, 458-462.
- Brand, K., Page, S., Rogler, G., Bartsch, A., Brandl, R., Knuechel, R., Page, M., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P. A., and Neumeier, D. (1996). Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 97, 1715-1722.
- Brandl, R., Richter, T., Haug, K., Wilhelm, M. G., Maurer, P. C., and Nathrath, W. (1997). Topographic analysis of proliferative activity in carotid endarterectomy specimens by immunocytochemical detection of the cell cycle-related antigen Ki-67. *Circulation* 96, 3360-3368.
- Bugge, T. H., Xiao, Q., Kombrinck, K. W., Flick, M. J., Holmback, K., Danton, M. J., Colbert, M. C., Witte, D. P., Fujikawa, K., Davie, E. W., and Degen, J. L. (1996). Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6258-6263.

- Burke, A. P., Kolodgie, F. D., Farb, A., Weber, D. K., Malcom, G. T., Smialek, J., and Virmani, R. (2001). Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation* 103, 934-940.
- Butenas, S., Bouchard, B. A., Brummel-Ziedins, K. E., Parhami-Seren, B., and Mann, K. G. (2005). Tissue factor activity in whole blood. *Blood* 105, 2764-2770.
- Butenas, S., Dee, J. D., and Mann, K. G. (2003). The function of factor XI in tissue factor-initiated thrombin generation. *J Thromb Haemost* 1, 2103-2111.
- Butenas, S., and Mann, K. G. (2004). Active tissue factor in blood? *Nat Med* 10, 1155-1156; author reply 1156.
- Byzova, T. V., and Plow, E. F. (1997). Networking in the hemostatic system. Integrin α IIb β 3 binds prothrombin and influences its activation. *J Biol Chem* 272, 27183-27188.
- Camera, M., Frigerio, M., Toschi, V., Brambilla, M., Rossi, F., Cottell, D. C., Maderna, P., Parolari, A., Bonzi, R., De Vincenti, O., and Tremoli, E. (2003). Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1690-1696.
- Caplice, N. M., Mueske, C. S., Kleppe, L. S., and Simari, R. D. (1998). Presence of tissue factor pathway inhibitor in human atherosclerotic plaques is associated with reduced tissue factor activity. *Circulation* 98, 1051-1057.
- Chada, D., Mather, T., and Nollert, M. U. (2006). The synergy site of fibronectin is required for strong interaction with the platelet integrin α IIb β 3. *Ann Biomed Eng* 34, 1542-1552.
- Chatzizisis, Y. S., Coskun, A. U., Jonas, M., Edelman, E. R., Feldman, C. L., and Stone, P. H. (2007). Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol* 49, 2379-2393.
- Chen, Q., and Lentz, B. R. (1997). Fluorescence resonance energy transfer study of shape changes in membrane-bound bovine prothrombin and meizothrombin. *Biochemistry* 36, 4701-4711.
- Clemetson, K. J., and Clemetson, J. M. (2001). Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* 86, 189-197.
- Colhoun, H. M., Zito, F., Norman Chan, N., Rubens, M. B., Fuller, J. H., and Humphries, S. E. (2002). Activated factor XII levels and factor XII 46C>T genotype in relation to coronary artery calcification in patients with type 1 diabetes and healthy subjects. *Atherosclerosis* 163, 363-369.
- Colli, S., Lalli, M., Rise, P., Mussoni, L., Eligini, S., Galli, C., and Tremoli, E. (1999). Increased thrombogenic potential of human monocyte-derived macrophages spontaneously transformed into foam cells. *Thromb Haemost* 81, 576-581.
- Collins, T., and Cybulsky, M. I. (2001). NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* 107, 255-264.
- Comfurius, P., Williamson, P., Smeets, E. F., Schlegel, R. A., Bevers, E. M., and Zwaal, R. F. (1996). Reconstitution of phospholipid scramblase activity from human blood platelets. *Biochemistry* 35, 7631-7634.

- Cortellaro, M., Cofrancesco, E., Arbustini, E., Rossi, F., Negri, A., Tremoli, E., Gabrielli, L., and Camera, M. (2002). Atorvastatin and thrombogenicity of the carotid atherosclerotic plaque: the ATROCAP study. *Thromb Haemost* 88, 41-47.
- Corti, R., Farkouh, M. E., and Badimon, J. J. (2002). The vulnerable plaque and acute coronary syndromes. *Am J Med* 113, 668-680.
- Corti, R., Fuster, V., and Badimon, J. J. (2003). Pathogenetic concepts of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 41, 7S-14S.
- Cosemans, J. M., Kuijpers, M. J., Lecut, C., Loubale, S. T., Heeneman, S., Jandrot-Perrus, M., and Heemskerk, J. W. (2005). Contribution of platelet glycoprotein VI to the thrombogenic effect of collagens in fibrous atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 181, 19-27.
- de Boer, O. J., van der Wal, A. C., Teeling, P., and Becker, A. E. (1999). Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovasc Res* 41, 443-449.
- De Meyer, G. R., Hoylaerts, M. F., Kockx, M. M., Yamamoto, H., Herman, A. G., and Bult, H. (1999). Intimal deposition of functional von Willebrand factor in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 2524-2534.
- Del Prete, G., De Carli, M., Lammel, R. M., D'Elios, M. M., Daniel, K. C., Giusti, B., Abbate, R., and Romagnani, S. (1995). Th1 and Th2 T-helper cells exert opposite regulatory effects on procoagulant activity and tissue factor production by human monocytes. *Blood* 86, 250-257.
- Diquelou, A., Lemozy, S., Dupouy, D., Boneu, B., Sakariassen, K., and Cadroy, Y. (1994). Effect of blood flow on thrombin generation is dependent on the nature of the thrombogenic surface. *Blood* 84, 2206-2213.
- Drew, A. F., Davenport, P., Apostolopoulos, J., and Tipping, P. G. (1997). Tissue factor pathway inhibitor expression in atherosclerosis. *Lab Invest* 77, 291-298.
- Eilertsen, K. E., and Osterud, B. (2004). Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis* 15, 521-538.
- Engelmann, B., Luther, T., and Muller, I. (2003). Intravascular tissue factor pathway--a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel. *Thromb Haemost* 89, 3-8.
- Falati, S., Liu, Q., Gross, P., Merrill-Skoloff, G., Chou, J., Vandendries, E., Celi, A., Croce, K., Furie, B. C., and Furie, B. (2003). Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 197, 1585-1598.
- Falk, E., Shah, P. K., and Fuster, V. (1995). Coronary plaque disruption. *Circulation* 92, 657-671.
- Farndale, R. W., Sixma, J. J., Barnes, M. J., and de Groot, P. G. (2004). The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost* 2, 561-573.
- Fernandez-Ortiz, A., Badimon, J. J., Falk, E., Fuster, V., Meyer, B., Mailhac, A., Weng, D., Shah, P. K., and Badimon, L. (1994). Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol* 23, 1562-1569.

- Freedman, J. E. (2005). Molecular regulation of platelet-dependent thrombosis. *Circulation* 112, 2725-2734.
- Furie, B., and Furie, B. C. (2006a). Thrombus formation in a living mouse. *Pathophysiol Haemost Thromb* 35, 1-4.
- Furie, B., and Furie, B. C. (2008). Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 359, 938-949.
- Furie, B. C., and Furie, B. (2006b). Tissue factor pathway vs. collagen pathway for in vivo platelet activation. *Blood Cells Mol Dis* 36, 135-138.
- Furnkranz, A., Schober, A., Bochkov, V. N., Bashtrykov, P., Kronke, G., Kadl, A., Binder, B. R., Weber, C., and Leitinger, N. (2005). Oxidized phospholipids trigger atherogenic inflammation in murine arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 633-638.
- Galis, Z. S., and Khatri, J. J. (2002). Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 90, 251-262.
- Gawaz, M. (2001). *Blood platelets* (Stuttgart, Thieme).
- Gawaz, M., Brand, K., Dickfeld, T., Pogatsa-Murray, G., Page, S., Bogner, C., Koch, W., Schomig, A., and Neumann, F. (2000). Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 148, 75-85.
- Gawaz, M., Langer, H., and May, A. E. (2005). Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 115, 3378-3384.
- Gawaz, M., Neumann, F. J., Dickfeld, T., Koch, W., Laugwitz, K. L., Adelsberger, H., Langenbrink, K., Page, S., Neumeier, D., Schomig, A., and Brand, K. (1998). Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 98, 1164-1171.
- Giesen, P. L., Rauch, U., Bohrmann, B., Kling, D., Roque, M., Fallon, J. T., Badimon, J. J., Himber, J., Riederer, M. A., and Nemerson, Y. (1999). Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2311-2315.
- Gilbert, G. E., and Arena, A. A. (1995). Phosphatidylethanolamine induces high affinity binding sites for factor VIII on membranes containing phosphatidyl-L-serine. *J Biol Chem* 270, 18500-18505.
- Gimbrone, M. A., Jr. (1999). Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol* 155, 1-5.
- Goto, S., Tamura, N., Handa, S., Arai, M., Kodama, K., and Takayama, H. (2002). Involvement of glycoprotein VI in platelet thrombus formation on both collagen and von Willebrand factor surfaces under flow conditions. *Circulation* 106, 266-272.
- Greilberger, J., Schmut, O., and Jurgens, G. (1997). In vitro interactions of oxidatively modified LDL with type I, II, III, IV, and V collagen, laminin, fibronectin, and poly-D-lysine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2721-2728.
- Gross, P. L., Furie, B. C., Merrill-Skoloff, G., Chou, J., and Furie, B. (2005). Leukocyte-versus microparticle-mediated tissue factor transfer during arteriolar thrombus development. *J Leukoc Biol* 78, 1318-1326.

- Grundt, H., Nilsen, D. W., Hetland, O., Valente, E., and Fagertun, H. E. (2004). Activated factor 12 (FXIIa) predicts recurrent coronary events after an acute myocardial infarction. *Am Heart J* 147, 260-266.
- Hansson, G. K. (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352, 1685-1695.
- Hatakeyama, K., Asada, Y., Marutsuka, K., Sato, Y., Kamikubo, Y., and Sumiyoshi, A. (1997). Localization and activity of tissue factor in human aortic atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 133, 213-219.
- Heemskerk, J. W., Bevers, E. M., and Lindhout, T. (2002). Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost* 88, 186-193.
- Hemker, H. C. (2002). Thrombin generation in a reconstituted system: a comment. *Thromb Haemost* 87, 551-554.
- Hemker, H. C., Giesen, P., Al Dieri, R., Regnault, V., de Smedt, E., Wagenvoort, R., Lecompte, T., and Beguin, S. (2003). Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 33, 4-15.
- Hemker, H. C., Giesen, P., AlDieri, R., Regnault, V., de Smed, E., Wagenvoort, R., Lecompte, T., and Beguin, S. (2002). The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 32, 249-253.
- Hemker, H. C., Giesen, P. L., Ramjee, M., Wagenvoort, R., and Beguin, S. (2000). The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost* 83, 589-591.
- Hemker, H. C., van Rijn, J. L., Rosing, J., van Dieijen, G., Bevers, E. M., and Zwaal, R. F. (1983). Platelet membrane involvement in blood coagulation. *Blood Cells* 9, 303-317.
- Hirschi, K. K., Ingram, D. A., and Yoder, M. C. (2008). Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1584-1595.
- Hojima, Y., Cochrane, C. G., Wiggins, R. C., Austen, K. F., and Stevens, R. L. (1984). In vitro activation of the contact (Hageman factor) system of plasma by heparin and chondroitin sulfate E. *Blood* 63, 1453-1459.
- Holmes, M. B., Schneider, D. J., Hayes, M. G., Sobel, B. E., and Mann, K. G. (2000). Novel, bedside, tissue factor-dependent clotting assay permits improved assessment of combination antithrombotic and antiplatelet therapy. *Circulation* 102, 2051-2057.
- Inoue, O., Suzuki-Inoue, K., McCarty, O. J., Moroi, M., Ruggeri, Z. M., Kunicki, T. J., Ozaki, Y., and Watson, S. P. (2006). Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI. *Blood* 107, 1405-1412.
- Jackson, S. P., and Schoenwaelder, S. M. (2003). Antiplatelet therapy: in search of the 'magic bullet'. *Nat Rev Drug Discov* 2, 775-789.
- Johne, J., Blume, C., Benz, P. M., Pozgajova, M., Ullrich, M., Schuh, K., Nieswandt, B., Walter, U., and Renne, T. (2006). Platelets promote coagulation factor XII-mediated proteolytic cascade systems in plasma. *Biol Chem* 387, 173-178.

- Kahn, M. L., Zheng, Y. W., Huang, W., Bigornia, V., Zeng, D., Moff, S., Farese, R. V., Jr., Tam, C., and Coughlin, S. R. (1998). A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394, 690-694.
- Kaikita, K., Ogawa, H., Yasue, H., Takeya, M., Takahashi, K., Saito, T., Hayasaki, K., Horiuchi, K., Takizawa, A., Kamikubo, Y., and Nakamura, S. (1997). Tissue factor expression on macrophages in coronary plaques in patients with unstable angina. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2232-2237.
- Kaikita, K., Takeya, M., Ogawa, H., Suefuji, H., Yasue, H., and Takahashi, K. (1999). Co-localization of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in coronary atherosclerosis. *J Pathol* 188, 180-188.
- Kalafatis, M., Swords, N. A., Rand, M. D., and Mann, K. G. (1994). Membrane-dependent reactions in blood coagulation: role of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Biochim Biophys Acta* 1227, 113-129.
- Katsuda, S., and Kaji, T. (2003). Atherosclerosis and extracellular matrix. *J Atheroscler Thromb* 10, 267-274.
- Katsuda, S., Okada, Y., Minamoto, T., Oda, Y., Matsui, Y., and Nakanishi, I. (1992). Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arterioscler Thromb* 12, 494-502.
- Kawamoto, Y., and Kaibara, M. (1990). Procoagulant activity of collagen. Effect of difference in type and structure of collagen. *Biochim Biophys Acta* 1035, 361-368.
- Kehrel, B., Wierwille, S., Clemetson, K. J., Anders, O., Steiner, M., Knight, C. G., Farndale, R. W., Okuma, M., and Barnes, M. J. (1998). 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* 91, 491-499.
- Knight, D. E., Niggli, V., and Scrutton, M. C. (1984). Thrombin and activators of protein kinase C modulate secretory responses of permeabilised human platelets induced by Ca²⁺. *Eur J Biochem* 143, 437-446.
- Koenig, J. M., Chahine, A., and Ratnoff, O. D. (1991). Inhibition of the activation of Hageman factor (factor XII) by soluble human placental collagens types III, IV, and V. *J Lab Clin Med* 117, 523-527.
- Kollros, P. R., Bates, S. R., Mathews, M. B., Horwitz, A. L., and Glagov, S. (1987). Cyclic AMP inhibits increased collagen production by cyclically stretched smooth muscle cells. *Lab Invest* 56, 410-417.
- Koster, T., Rosendaal, F. R., Briet, E., and Vandenbroucke, J. P. (1994). John Hageman's factor and deep-vein thrombosis: Leiden thrombophilia Study. *Br J Haematol* 87, 422-424.
- Koyama, T., Nishida, K., Ohdama, S., Sawada, M., Murakami, N., Hirose, S., Kuriyama, R., Matsuzawa, K., Hasegawa, R., and Aoki, N. (1994). Determination of plasma tissue factor antigen and its clinical significance. *Br J Haematol* 87, 343-347.
- Kuijpers, M. J., Nieuwenhuys, C. M., Feijge, M. A., Kloots, W., Giesen, P. L., Jerling, J. C., oude Egbrink, M. G., and Heemskerk, J. W. (2005). Regulation of tissue factor-induced coagulation and platelet aggregation in flowing whole blood. *Thromb Haemost* 93, 97-105.

- Kuijpers, M. J., Schulte, V., Bergmeier, W., Lindhout, T., Brakebusch, C., Offermanns, S., Fassler, R., Heemskerk, J. W., and Nieswandt, B. (2003). Complementary roles of glycoprotein VI and alpha2beta1 integrin in collagen-induced thrombus formation in flowing whole blood ex vivo. *Faseb J* 17, 685-687.
- Kulik, T. J., and Alvarado, S. P. (1993). Effect of stretch on growth and collagen synthesis in cultured rat and lamb pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 157, 615-624.
- Laux, V., Perzborn, E., Kubitza, D., and Misselwitz, F. (2007). Preclinical and clinical characteristics of rivaroxaban: a novel, oral, direct factor Xa inhibitor. *Semin Thromb Hemost* 33, 515-523.
- Lecut, C., Feijge, M. A., Cosemans, J. M., Jandrot-Perrus, M., and Heemskerk, J. W. (2005). Fibrillar type I collagens enhance platelet-dependent thrombin generation via glycoprotein VI with direct support of alpha2beta1 but not alpha1bbeta3 integrin. *Thromb Haemost* 94, 107-114.
- Lee, R. T., and Libby, P. (1997). The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 1859-1867.
- Leon, C., Alex, M., Klocke, A., Morgenstern, E., Moosbauer, C., Eckly, A., Spannagl, M., Gachet, C., and Engelmann, B. (2004). Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation. *Blood* 103, 594-600.
- Leon, C., Ravanat, C., Freund, M., Cazenave, J. P., and Gachet, C. (2003). Differential involvement of the P2Y1 and P2Y12 receptors in platelet procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1941-1947.
- Lewis, J. C., Bennett-Cain, A. L., DeMars, C. S., Doellgast, G. J., Grant, K. W., Jones, N. L., and Gupta, M. (1995). Procoagulant activity after exposure of monocyte-derived macrophages to minimally oxidized low density lipoprotein. Co-localization of tissue factor antigen and nascent fibrin fibers at the cell surface. *Am J Pathol* 147, 1029-1040.
- Libby, P. (1995). Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 91, 2844-2850.
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874.
- Linna, M. S., Ahotupa, M., Irfjala, K., Pollanen, P., Huhtaniemi, I., Makinen, J., Perheentupa, A., and Vasankari, T. J. (2008). Smoking and low serum testosterone associates with high concentration of oxidized LDL. *Ann Med*, 1-7.
- Lüllmann, H., Mohr, K., and Wehling, M. (2003). *Pharmakologie und Toxikologie*, Thieme).
- Luscher, T. F., Tanner, F. C., Tschudi, M. R., and Noll, G. (1993). Endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Annu Rev Med* 44, 395-418.
- Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241.
- Mach, F., Schonbeck, U., Bonnefoy, J. Y., Pober, J. S., and Libby, P. (1997). Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation* 96, 396-399.
- Mackman, N. (2004). Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1015-1022.

- Mackman, N., Tilley, R. E., and Key, N. S. (2007). Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1687-1693.
- Malek, A. M., Alper, S. L., and Izumo, S. (1999). Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *Jama* 282, 2035-2042.
- Mallat, Z., Hugel, B., Ohan, J., Leseche, G., Freyssinet, J. M., and Tedgui, A. (1999). Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 99, 348-353.
- Mann, K. G. (1999). Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* 82, 165-174.
- Mann, K. G., Brummel, K., and Butenas, S. (2003a). What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost* 1, 1504-1514.
- Mann, K. G., Butenas, S., and Brummel, K. (2003b). The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 17-25.
- Marutsuka, K., Hatakeyama, K., Yamashita, A., and Asada, Y. (2005). Role of thrombogenic factors in the development of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 12, 1-8.
- Massberg, S., Brand, K., Gruner, S., Page, S., Muller, E., Muller, I., Bergmeier, W., Richter, T., Lorenz, M., Konrad, I., *et al.* (2002). A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 196, 887-896.
- Massberg, S., Gawaz, M., Gruner, S., Schulte, V., Konrad, I., Zohlnhofer, D., Heinzmann, U., and Nieswandt, B. (2003). A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med* 197, 41-49.
- Massberg, S., Konrad, I., Bultmann, A., Schulz, C., Munch, G., Peluso, M., Lorenz, M., Schneider, S., Besta, F., Muller, I., *et al.* (2004). Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *Faseb J* 18, 397-399.
- Mayne, R. (1986). Collagenous proteins of blood vessels. *Arteriosclerosis* 6, 585-593.
- Mazzolai, L., Silacci, P., Bouzourene, K., Daniel, F., Brunner, H., and Hayoz, D. (2002). Tissue factor activity is upregulated in human endothelial cells exposed to oscillatory shear stress. *Thromb Haemost* 87, 1062-1068.
- Michel, J. B. (2001). Contrasting outcomes of atheroma evolution: intimal accumulation versus medial destruction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1389-1392.
- Mohler, E. R., 3rd (2007). Atherothrombosis--wave goodbye to combined anticoagulation and antiplatelet therapy? *N Engl J Med* 357, 293-296.
- Monroe, D. M., Hoffman, M., and Roberts, H. R. (2002). Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 1381-1389.
- Monroe, D. M., and Key, N. S. (2007). The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *J Thromb Haemost* 5, 1097-1105.
- Monroe, D. M., Roberts, H. R., and Hoffman, M. (1994). Platelet procoagulant complex assembly in a tissue factor-initiated system. *Br J Haematol* 88, 364-371.
- Moons, A. H., Levi, M., and Peters, R. J. (2002). Tissue factor and coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 53, 313-325.

- Moroi, M., and Jung, S. M. (2004). Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res* 114, 221-233.
- Moroi, M., Jung, S. M., Okuma, M., and Shinmyozu, K. (1989). A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest* 84, 1440-1445.
- Morrissey, J. H. (2001). Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost* 86, 66-74.
- Morton, L. F., and Barnes, M. J. (1982). Collagen polymorphism in the normal and diseased blood vessel wall. Investigation of collagens types I, III and V. *Atherosclerosis* 42, 41-51.
- Muhlfelder, T. W., Teodorescu, V., Rand, J., Rosman, A., and Niemetz, J. (1999). Human atheromatous plaque extracts induce tissue factor activity (TFa) in monocytes and also express constitutive TFa. *Thromb Haemost* 81, 146-150.
- Muller, I., Klocke, A., Alex, M., Kotsch, M., Luther, T., Morgenstern, E., Zieseniss, S., Zahler, S., Preissner, K., and Engelmann, B. (2003). Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *Faseb J* 17, 476-478.
- Murata, K., Motayama, T., and Kotake, C. (1986). Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis* 60, 251-262.
- Murray, C. J., and Lopez, A. D. (1997). Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349, 1436-1442.
- Naghavi, M., Libby, P., Falk, E., Casscells, S. W., Litovsky, S., Rumberger, J., Badimon, J. J., Stefanadis, C., Moreno, P., Pasterkamp, G., *et al.* (2003). From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation* 108, 1772-1778.
- Nakashima, Y., Raines, E. W., Plump, A. S., Breslow, J. L., and Ross, R. (1998). Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 842-851.
- Negoro, N., Kanayama, Y., Haraguchi, M., Umetani, N., Nishimura, M., Konishi, Y., Iwai, J., Okamura, M., Inoue, T., and Takeda, T. (1995). Blood pressure regulates platelet-derived growth factor A-chain gene expression in vascular smooth muscle cells in vivo. An autocrine mechanism promoting hypertensive vascular hypertrophy. *J Clin Invest* 95, 1140-1150.
- Nemerson, Y., and Repke, D. (1985). Tissue factor accelerates the activation of coagulation factor VII: the role of a bifunctional coagulation cofactor. *Thromb Res* 40, 351-358.
- Nesheim, M. E., Pittman, D. D., Wang, J. H., Slonosky, D., Giles, A. R., and Kaufman, R. J. (1988). The binding of 35S-labeled recombinant factor VIII to activated and unactivated human platelets. *J Biol Chem* 263, 16467-16470.
- Niemetz, J., Fallon, J. T., Harrington, E., and Hathcock, J. (2004). Rapid generation of thrombin by atheroma and platelets. *J Thromb Haemost* 2, 321-326.
- Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., Lindhout, T., Heemskerk, J. W., Zirngibl, H., and Fassler, R. (2001). Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *Embo J* 20, 2120-2130.

- Nieswandt, B., and Watson, S. P. (2003). Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 102, 449-461.
- Nikkari, S. T., Geary, R. L., Hatsukami, T., Ferguson, M., Forough, R., Alpers, C. E., and Clowes, A. W. (1996). Expression of collagen, interstitial collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in restenosis after carotid endarterectomy. *Am J Pathol* 148, 777-783.
- O'Connor, M. N., Smethurst, P. A., Davies, L. W., Joutsu-Korhonen, L., Onley, D. J., Herr, A. B., Farndale, R. W., and Ouwehand, W. H. (2006). Selective blockade of glycoprotein VI clustering on collagen helices. *J Biol Chem* 281, 33505-33510.
- Ollikainen, E., Mikkelsson, J., Perola, M., Penttila, A., and Karhunen, P. J. (2004). Platelet membrane collagen receptor glycoprotein VI polymorphism is associated with coronary thrombosis and fatal myocardial infarction in middle-aged men. *Atherosclerosis* 176, 95-99.
- Onley, D. J., Knight, C. G., Tuckwell, D. S., Barnes, M. J., and Farndale, R. W. (2000). Micromolar Ca²⁺ concentrations are essential for Mg²⁺-dependent binding of collagen by the integrin alpha 2beta 1 in human platelets. *J Biol Chem* 275, 24560-24564.
- Osterlund, M., Persson, E., Carlsson, U., Freskgard, P. O., and Svensson, M. (2005). Sequential coagulation factor VIIa domain binding to tissue factor. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 1276-1282.
- Osterud, B., Bajaj, M. S., and Bajaj, S. P. (1995). Sites of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and tissue factor expression under physiologic and pathologic conditions. On behalf of the Subcommittee on Tissue factor Pathway Inhibitor (TFPI) of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 73, 873-875.
- Osterud, B., Harper, E., Rapaport, S. I., and Lavine, K. K. (1979). Evidence against collagen activation of platelet-associated factor XI as a mechanism for initiating intrinsic clotting. *Scand J Haematol* 22, 205-213.
- Osterud, B., and Rapaport, S. I. (1977). Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5260-5264.
- Ott, I. (2003). Tissue factor in acute coronary syndromes. *Semin Vasc Med* 3, 185-192.
- Penz, S., Reininger, A. J., Brandl, R., Goyal, P., Rabie, T., Bernlochner, I., Rother, E., Goetz, C., Engelmann, B., Smethurst, P. A., *et al.* (2005). Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *Faseb J* 19, 898-909.
- Penz, S. M., Reininger, A. J., Toth, O., Deckmyn, H., Brandl, R., and Siess, W. (2007). Glycoprotein Ibalph inhibition and ADP receptor antagonists, but not aspirin, reduce platelet thrombus formation in flowing blood exposed to atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost* 97, 435-443.
- Plenz, G. A., Deng, M. C., Robenek, H., and Volker, W. (2003). Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. *Atherosclerosis* 166, 1-11.
- Plow, E. F., Cierniewski, C. S., Xiao, Z., Haas, T. A., and Byzova, T. V. (2001). Alpha11beta3 and its antagonism at the new millennium. *Thromb Haemost* 86, 34-40.
- Podrez, E. A., Byzova, T. V., Febbraio, M., Salomon, R. G., Ma, Y., Valiyaveetil, M., Poliakov, E., Sun, M., Finton, P. J., Curtis, B. R., *et al.* (2007). Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype. *Nat Med* 13, 1086-1095.

- Proudfoot, D., Skepper, J. N., Shanahan, C. M., and Weissberg, P. L. (1998). Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 379-388.
- Rand, M. D., Lock, J. B., van't Veer, C., Gaffney, D. P., and Mann, K. G. (1996). Blood clotting in minimally altered whole blood. *Blood* 88, 3432-3445.
- Rauch, U., Bonderman, D., Bohrmann, B., Badimon, J. J., Himber, J., Riederer, M. A., and Nemerson, Y. (2000). Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood* 96, 170-175.
- Rauch, U., Osende, J. I., Fuster, V., Badimon, J. J., Fayad, Z., and Chesebro, J. H. (2001). Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med* 134, 224-238.
- Reininger, A. J., Reininger, C. B., Heinzmann, U., and Wurzinger, L. J. (1995). Residence time in niches of stagnant flow determines fibrin clot formation in an arterial branching model--detailed flow analysis and experimental results. *Thromb Haemost* 74, 916-922.
- Reitsma, P. H. (2004). Is hypercoagulability an issue in arterial thrombosis? No. *J Thromb Haemost* 2, 692-694.
- Rekhter, M. (2002). Vulnerable atherosclerotic plaque: emerging challenge for animal models. *Curr Opin Cardiol* 17, 626-632.
- Rekhter, M. D. (1999). Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc Res* 41, 376-384.
- Rekhter, M. D., Hicks, G. W., Brammer, D. W., Hallak, H., Kindt, E., Chen, J., Rosebury, W. S., Anderson, M. K., Kuipers, P. J., and Ryan, M. J. (2000). Hypercholesterolemia causes mechanical weakening of rabbit atheroma : local collagen loss as a prerequisite of plaque rupture. *Circ Res* 86, 101-108.
- Rekhter, M. D., Zhang, K., Narayanan, A. S., Phan, S., Schork, M. A., and Gordon, D. (1993). Type I collagen gene expression in human atherosclerosis. Localization to specific plaque regions. *Am J Pathol* 143, 1634-1648.
- Renie, G., Maingrette, F., and Li, L. (2007). Diabetic vasculopathy and the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1). *Curr Diabetes Rev* 3, 103-110.
- Renne, T., Pozgajova, M., Gruner, S., Schuh, K., Pauer, H. U., Burfeind, P., Gailani, D., and Nieswandt, B. (2005). Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* 202, 271-281.
- Rentrop, K. P. (2000). Thrombi in acute coronary syndromes : revisited and revised. *Circulation* 101, 1619-1626.
- Rosen, E. D., Chan, J. C., Idusogie, E., Clotman, F., Vlasuk, G., Luther, T., Jalbert, L. R., Albrecht, S., Zhong, L., Lissens, A., *et al.* (1997). Mice lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding. *Nature* 390, 290-294.
- Ross, J. M., McIntire, L. V., Moake, J. L., and Rand, J. H. (1995). Platelet adhesion and aggregation on human type VI collagen surfaces under physiological flow conditions. *Blood* 85, 1826-1835.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-126.

- Rother, E., Brandl, R., Baker, D. L., Goyal, P., Gebhard, H., Tigyi, G., and Siess, W. (2003). Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation* 108, 741-747.
- Ruggeri, Z. M. (2002). Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 8, 1227-1234.
- Ruggeri, Z. M. (2003). Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 1, 1335-1342.
- Ruggeri, Z. M., Dent, J. A., and Saldivar, E. (1999). Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood* 94, 172-178.
- Ruggeri, Z. M., Orje, J. N., Habermann, R., Federici, A. B., and Reininger, A. J. (2006). Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood* 108, 1903-1910.
- Sakariassen, K. S., Holme, P. A., Orvim, U., Barstad, R. M., Solum, N. O., and Brosstad, F. R. (1998). Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation in native human blood. *Thromb Res* 92, S33-41.
- Sambola, A., Osende, J., Hathcock, J., Degen, M., Nemerson, Y., Fuster, V., Crandall, J., and Badimon, J. J. (2003). Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation* 107, 973-977.
- Santoro, S. A., Walsh, J. J., Staatz, W. D., and Baranski, K. J. (1991). Distinct determinants on collagen support alpha 2 beta 1 integrin-mediated platelet adhesion and platelet activation. *Cell Regul* 2, 905-913.
- Santucci, R. A., Erlich, J., Labriola, J., Wilson, M., Kao, K. J., Kickler, T. S., Spillert, C., and Mackman, N. (2000). Measurement of tissue factor activity in whole blood. *Thromb Haemost* 83, 445-454.
- Sartore, S., Chiavegato, A., Faggini, E., Franch, R., Puato, M., Ausoni, S., and Pauletto, P. (2001). Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res* 89, 1111-1121.
- Savage, B., Almus-Jacobs, F., and Ruggeri, Z. M. (1998). Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 94, 657-666.
- Savage, B., Ginsberg, M. H., and Ruggeri, Z. M. (1999). Influence of fibrillar collagen structure on the mechanisms of platelet thrombus formation under flow. *Blood* 94, 2704-2715.
- Schechter, A. D., Giesen, P. L., Taby, O., Rosenfield, C. L., Rossikhina, M., Fyfe, B. S., Kohtz, D. S., Fallon, J. T., Nemerson, Y., and Taubman, M. B. (1997). Tissue factor expression in human arterial smooth muscle cells. TF is present in three cellular pools after growth factor stimulation. *J Clin Invest* 100, 2276-2285.
- Schenone, M., Furie, B. C., and Furie, B. (2004). The blood coagulation cascade. *Curr Opin Hematol* 11, 272-277.
- Schonbeck, U., Mach, F., Sukhova, G. K., Herman, M., Graber, P., Kehry, M. R., and Libby, P. (2000). CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 156, 7-14.

- Schroeder, V., Chatterjee, T., and Kohler, H. P. (2001). Influence of blood coagulation factor XIII and FXIII Val34Leu on plasma clot formation measured by thrombelastography. *Thromb Res* 104, 467-474.
- Schwartz, S. M., and Bennett, M. R. (1995). Death by any other name. *Am J Pathol* 147, 229-234.
- Shebuski, R. J., and Kilgore, K. S. (2002). Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 729-735.
- Shekhonin, B. V., Domogatsky, S. P., Idelson, G. L., Koteliansky, V. E., and Rukosuev, V. S. (1987). Relative distribution of fibronectin and type I, III, IV, V collagens in normal and atherosclerotic intima of human arteries. *Atherosclerosis* 67, 9-16.
- Siddiqui, F. A., Desai, H., Amirkhosravi, A., Amaya, M., and Francis, J. L. (2002). The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets* 13, 247-253.
- Siess, W. (1989). Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 69, 58-178.
- Siess, W., Zangl, K. J., Essler, M., Bauer, M., Brandl, R., Corrinth, C., Bittman, R., Tigyi, G., and Aepfelbacher, M. (1999). Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6931-6936.
- Siljander, P. R., Munnix, I. C., Smethurst, P. A., Deckmyn, H., Lindhout, T., Ouwehand, W. H., Fardale, R. W., and Heemskerk, J. W. (2004). Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. *Blood* 103, 1333-1341.
- Sim, D., Flaumenhaft, R., and Furie, B. (2005). Interactions of platelets, blood-borne tissue factor, and fibrin during arteriolar thrombus formation in vivo. *Microcirculation* 12, 301-311.
- Sixma, J. J., van Zanten, G. H., Huizinga, E. G., van der Plas, R. M., Verkley, M., Wu, Y. P., Gros, P., and de Groot, P. G. (1997). Platelet adhesion to collagen: an update. *Thromb Haemost* 78, 434-438.
- Skalen, K., Gustafsson, M., Rydberg, E. K., Hulten, L. M., Wiklund, O., Innerarity, T. L., and Boren, J. (2002). Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 417, 750-754.
- Smeets, E. F., Comfurius, P., Bevers, E. M., and Zwaal, R. F. (1996). Contribution of different phospholipid classes to the prothrombin converting capacity of sonicated lipid vesicles. *Thromb Res* 81, 419-426.
- Smethurst, P. A., Joutsu-Korhonen, L., O'Connor, M. N., Wilson, E., Jennings, N. S., Garner, S. F., Zhang, Y., Knight, C. G., Dafforn, T. R., Buckle, A., *et al.* (2004). Identification of the primary collagen-binding surface on human glycoprotein VI by site-directed mutagenesis and by a blocking phage antibody. *Blood* 103, 903-911.
- So, A. K., Varisco, P. A., Kemkes-Matthes, B., Herkenne-Morard, C., Chobaz-Peclat, V., Gerster, J. C., and Busso, N. (2003). Arthritis is linked to local and systemic activation of coagulation and fibrinolysis pathways. *J Thromb Haemost* 1, 2510-2515.
- Soejima, H., Ogawa, H., Yasue, H., Kaikita, K., Nishiyama, K., Misumi, K., Takazoe, K., Miyao, Y., Yoshimura, M., Kugiyama, K., *et al.* (1999). Heightened tissue factor associated with tissue factor pathway inhibitor and prognosis in patients with unstable angina. *Circulation* 99, 2908-2913.

- Solum, N. O. (1999). Procoagulant expression in platelets and defects leading to clinical disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 2841-2846.
- Spronk, H. M., van der Voort, D., and Ten Cate, H. (2004). Blood coagulation and the risk of atherothrombosis: a complex relationship. *Thromb J* 2, 12.
- Stary, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schaffer, S. A., Schwartz, C. J., Wagner, W. D., and Wissler, R. W. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 89, 2462-2478.
- Sturk-Maquelin, K. N., Nieuwland, R., Romijn, F. P., Eijssman, L., Hack, C. E., and Sturk, A. (2003). Pro- and non-coagulant forms of non-cell-bound tissue factor in vivo. *J Thromb Haemost* 1, 1920-1926.
- Sumpio, B. E., Banes, A. J., Link, W. G., and Johnson, G., Jr. (1988). Enhanced collagen production by smooth muscle cells during repetitive mechanical stretching. *Arch Surg* 123, 1233-1236.
- Taipale, J., and Keski-Oja, J. (1997). Growth factors in the extracellular matrix. *Faseb J* 11, 51-59.
- Taubman, M. B., Marmur, J. D., Rosenfield, C. L., Guha, A., Nichtberger, S., and Nemerson, Y. (1993). Agonist-mediated tissue factor expression in cultured vascular smooth muscle cells. Role of Ca²⁺ mobilization and protein kinase C activation. *J Clin Invest* 91, 547-552.
- Tedgui, A., and Mallat, Z. (2001). Apoptosis as a determinant of atherothrombosis. *Thromb Haemost* 86, 420-426.
- Toschi, V., Gallo, R., Lettino, M., Fallon, J. T., Gertz, S. D., Fernandez-Ortiz, A., Chesebro, J. H., Badimon, L., Nemerson, Y., Fuster, V., and Badimon, J. J. (1997). Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 95, 594-599.
- Tuszynski, G. P., Bevacqua, S. J., Schmaier, A. H., Colman, R. W., and Walsh, P. N. (1982). Factor XI antigen and activity in human platelets. *Blood* 59, 1148-1156.
- Valettas, N., and Herrmann, H. C. (2003). The role of platelets and platelet inhibition in acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis* 14, 357-363.
- van Zanten, G. H., de Graaf, S., Sloomweg, P. J., Heijnen, H. F., Connolly, T. M., de Groot, P. G., and Sixma, J. J. (1994). Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin Invest* 93, 615-632.
- Vanschoonbeek, K., Feijge, M. A., Van Kampen, R. J., Kenis, H., Hemker, H. C., Giesen, P. L., and Heemskerk, J. W. (2004). Initiating and potentiating role of platelets in tissue factor-induced thrombin generation in the presence of plasma: subject-dependent variation in thrombogram characteristics. *J Thromb Haemost* 2, 476-484.
- Viles-Gonzalez, J. F., Anand, S. X., Valdiviezo, C., Zafar, M. U., Hutter, R., Sanz, J., Rius, T., Poon, M., Fuster, V., and Badimon, J. J. (2004a). Update in atherothrombotic disease. *Mt Sinai J Med* 71, 197-208.
- Viles-Gonzalez, J. F., Anand, S. X., Zafar, M. U., Fuster, V., and Badimon, J. J. (2004b). Tissue factor coagulation pathway: a new therapeutic target in atherothrombosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 43, 669-676.

- Virmani, R., Burke, A. P., Kolodgie, F. D., and Farb, A. (2002). Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol* 15, 439-446.
- Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A., and Schwartz, S. M. (2000). Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1262-1275.
- Walsh, P. N., and Griffin, J. H. (1981). Contributions of human platelets to the proteolytic activation of blood coagulation factors XII and XI. *Blood* 57, 106-118.
- Ware, J. (2004). Dysfunctional platelet membrane receptors: from humans to mice. *Thromb Haemost* 92, 478-485.
- Watala, C. (2005). Blood platelet reactivity and its pharmacological modulation in (people with) diabetes mellitus. *Curr Pharm Des* 11, 2331-2365.
- Watson, S., Berlanga, O., Best, D., and Frampton, J. (2000). Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid? *Platelets* 11, 252-258.
- Wilcox, J. N., Smith, K. M., Schwartz, S. M., and Gordon, D. (1989). Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2839-2843.
- Xiao, Z., and Theroux, P. (1998). Platelet activation with unfractionated heparin at therapeutic concentrations and comparisons with a low-molecular-weight heparin and with a direct thrombin inhibitor. *Circulation* 97, 251-256.
- Yang, Y., and Loscalzo, J. (2000). Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide. *Circulation* 101, 2144-2148.
- Zaman, A. G., Helft, G., Worthley, S. G., and Badimon, J. J. (2000). The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 149, 251-266.
- Zeerleder, S., Schloesser, M., Redondo, M., Wuillemin, W. A., Engel, W., Furlan, M., and Lammle, B. (1999). Reevaluation of the incidence of thromboembolic complications in congenital factor XII deficiency--a study on 73 subjects from 14 Swiss families. *Thromb Haemost* 82, 1240-1246.
- Zillmann, A., Luther, T., Muller, I., Kotzsch, M., Spannagl, M., Kauke, T., Oelschlagel, U., Zahler, S., and Engelmann, B. (2001). Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 603-609.
- Zito, F., Drummond, F., Bujac, S. R., Esnouf, M. P., Morrissey, J. H., Humphries, S. E., and Miller, G. J. (2000). Epidemiological and genetic associations of activated factor XII concentration with factor VII activity, fibrinopeptide A concentration, and risk of coronary heart disease in men. *Circulation* 102, 2058-2062.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. W. Siess für die Vergabe dieses interessanten und spannenden Themas, für die exzellente Betreuung bei der Durchführung der Experimente, für zahlreiche wertvolle Anregungen und Diskussionen, sowie für die Geduld bei der Korrektur dieser Arbeit.

Ebenso bei Frau S. Penz bedanke ich mich besonders für die Einführung in die Methodik, für ihre unendliche Geduld, ihre wertvollen Anregungen, ihre Hilfsbereitschaft und ihre enorme Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Auch für ihre vielen beruhigenden, aufbauenden und motivierenden Worte möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Reiningger bedanke ich mich für die Ermöglichung der gemeinsamen Durchführung der Flussversuche in seinem Labor, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Außerdem danke ich ihm für die vielen weiterführenden Ideen und Diskussionen und für sein stetes Zuhören, wenn sich Probleme auftaten. Ohne seine Mithilfe wären die im Anhang gezeigten Videofilme nicht entstanden.

Herrn Prof. Dr. R. Brandl danke ich für die Bereitstellung der atherosklerotischen Plaques.

Herrn Prof. C. Gachet danke ich für die freundliche Aufnahme in seinem Labor in Strassbourg. Frau K. Ravanat danke ich für ihre große Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Experimente mit dem Thrombogram.

Allen Mitgliedern des Instituts für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten danke ich für ihre Unterstützung. Bei Frau v. Oheimb bedanke ich mich für ihre Hilfe bei der Durchführung von Rotem® Experimenten. Frau Wilke danke ich für ihre Hilfe bei Aggregometer Experimenten.

Mein allergrößter Dank gilt meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben. Insbesondere danke ich meiner Mutter, die immer für mich da war und mich durch ihre Liebe unterstützt hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Maria Isabell Bernlochner
Geburtsdatum: 6.10.1981
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Religion: katholisch
email: m_isabell@gmx.net

Schulbildung

1987 - 1991 Grundschole am Marsplatz in München
1991 - 1992 Rupprecht Gymnasium in München
1992 - 2000 A.B. von Stettensches Gymnasium in Augsburg
2000 - 2001 Sprachreisenaufenthalt in Australien

Studium

2001 - 2003 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Semmelweis Universität in Budapest
Juni 2003 1. Ärztliche Prüfung
2003 - 2008 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
Juni 2008 2. Ärztliche Prüfung