

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Anatomie

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Hildebrand –

**Einfluss von Neopterin auf die Aktivierbarkeit menschlicher Blutplättchen durch Thrombin und Arachidonsäure.**

- **Eine photometrische und mikroskopische Untersuchung von Thrombozyten in Suspension -**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Wolff, Philipp

aus Bielefeld

2004

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. T. Filler

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H.-P. Wiesmann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Anatomie

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Hildebrand -

Referent: Priv.-Doz. Dr. T. Filler

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. H.-P. Wiesmann

### **Zusammenfassung**

Einfluss von Neopterin auf die Aktivierbarkeit menschlicher Blutplättchen durch Thrombin und  
Arachidonsäure

- Eine photometrische und mikroskopische Untersuchung von

Thrombozyten in Suspension -

Wolff, Philipp

Inhalt der Arbeit ist die erstmalige Untersuchung des Einflusses von Neopterin auf die Aktivierbarkeit gewaschener Thrombozyten. Die verwendete Waschmethode nach Patscheke eignet sich zur Gewinnung von Suspensionen inaktiver Plättchen in einer proteinarmen Lösung.

Die Blutplättchen wurden vor beziehungsweise nach den Waschvorgängen mit Neopterin inkubiert und im gewaschenen Zustand mit Thrombin und Arachidonsäure aktiviert. Die Auswertung der Versuche erfolgte mit Hilfe der Aggregometrie, der Lichtmikroskopie und der Elektronenmikroskopie. Mit diesen Verfahren konnte die funktionelle Morphologie der Blutplättchen nach erfolgter Aktivierung beurteilt werden.

Die Ergebnisse zeigen keine Zeichen einer Veränderung der Aktivierungsfähigkeit von Blutplättchen unter dem direkten Einfluss von Neopterin in vitro. Die Aktivierung mit Thrombin weist alle Merkmale einer vollständigen Aktivierung, resultierend in der Bildung kompakter Aggregate, auf. Die Gabe unphysiologischer Mengen Arachidonsäure hatte starke Zellyse zur Folge, doch führte auch sie zur Aktivierung der Blutplättchen.

Die Ergebnisse waren unabhängig von den verschiedenen gewählten Neopterinkonzentrationen. Die gemachten Beobachtungen waren identisch mit der nicht mit Neopterin inkubierten Kontrollgruppe. Eine Inkubation der Blutplättchen mit Neopterin, sei es im PRP oder in gewaschenem Zustand, hatte keinen nachweisbaren Effekt auf die Aktivierung mit Thrombin oder Arachidonsäure.

Dies schließt einen Zusammenhang zwischen Neopterin und der Aktivierbarkeit von Thrombozyten nicht aus. Vielmehr stellt diese Studie den Anfang für weiterführende Untersuchungen zu diesem Thema dar. Es wird Gegenstand weiterer Studien sein müssen, die aufgezeigten Theorien zu untersuchen und eine etwaige Verbindung zwischen Neopterin und dem thrombozytären Gerinnungssystem herstellen zu können.

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.2004

Für Otto.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Morphologie von Thrombozyten .....	1
1.2 Aspekte zum Mechanismus der Aktivierung von Thrombozyten .....	3
1.3 Biomechanische Mechanismen der Aktivierung .....	5
1.4 Neopterin .....	6
1.5 Fragestellung .....	10
<b>2. Material und Methode</b> .....	11
2.1 Material .....	11
2.1.1 Chemikalien .....	11
2.1.2 Geräte .....	12
2.2 Blutentnahme .....	13
2.3 PRP-Gewinnung .....	14
2.4 Plättchenpräparation .....	14
2.5 Antikoagulantien und Inhibitoren .....	16
2.6 Aggregometermessung .....	17
2.7 Versuchsablauf .....	18
2.7.1 Neopterin in PRP .....	18
2.7.2 Neopterin in gewaschenen Plättchen .....	19
2.8 Aufbereitung der Proben .....	20
2.8.2 Einbettung in Kunstharz .....	21
2.9 Herstellung von Semidünnschnitten .....	21

2.10 Herstellung von Ultradünnschnitten.....	22
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
3.1 Untersuchungen zum Zustand der Plättchen nach den Waschvorgängen.....	23
3.2 Untersuchungen zum Zustand der Plättchen nach erfolgter Aktivierung mit 0,05 U/ml, 0.075 U/ml bzw. 0,1 U/ml Thrombin.....	25
3.3 Untersuchungen zum Zustand der Plättchen nach erfolgter Aktivierung mit Arachidonsäure .....	35
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>44</b>
4.1 Präparation der Blutplättchen .....	44
4.2 Aktivierung und Hemmung von Blutplättchen.....	46
4.3 Aggregometermessungen und mikroskopische Befunde .....	48
4.3.1 Aggregometermessungen .....	48
4.3.2 Lichtmikroskopie .....	50
4.3.3 Elektronenmikroskopie .....	51
4.4 Neopterin .....	52
4.5 Abschluss und Ausblick .....	55
<b>5. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>57</b>
<b>6. Danksagung</b> .....	<b>69</b>
<b>7. Lebenslauf</b> .....	<b>70</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1 Morphologie von Thrombozyten**

Menschliche Blutplättchen sind kernlose und unter Ruhebedingungen scheibenförmige Zellfragmente mit einem Durchmesser von 2-5  $\mu\text{m}$ . Sie werden im Knochenmark als Abschnürungen aus dem Zytoplasma von Megakaryozyten gebildet. Im Blut des Gesunden befinden sich normalerweise 140 000 – 360 000 Thrombozyten/ $\mu\text{l}$ .

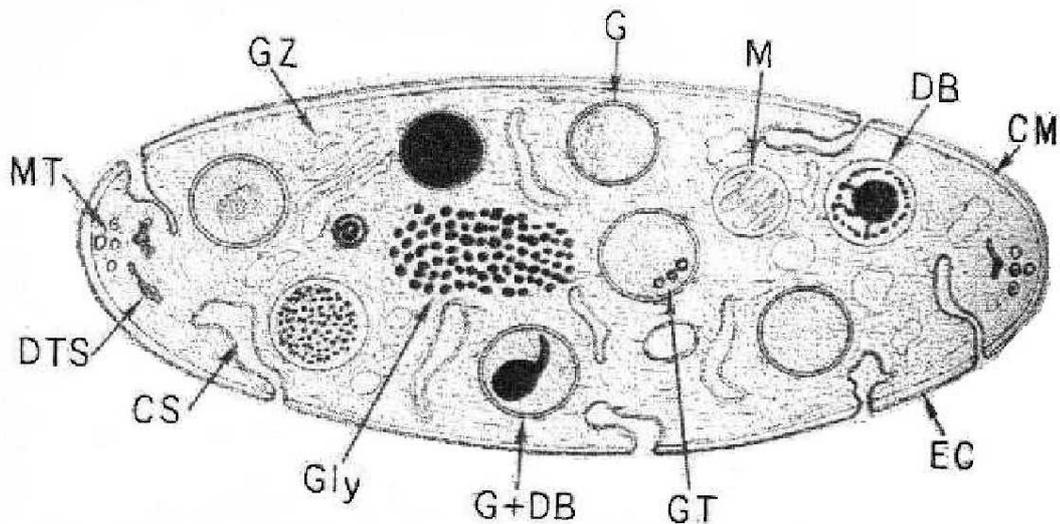
Die Plättchen werden vom Plasmalemm umgeben, dem außen eine Schicht aus Glykosaminoglykanen und Glykoproteinen, die Glykokalix, anliegt. Eingebaut in die Glykokalix und die Plättchenmembran sind Glykoproteinkomplexe und Rezeptoren für verschiedene Liganden, über die die Plättchenmembran auch an Adhäsions- und Aggregationsvorgängen beteiligt sind. (White 1979, 1994, Peerschke 1992, Rosenblum 1994)

Vom Plasmalemm strahlen Mikrofilamente in das Hyaloplasma ein und sind so an der Formgebung der Blutplättchen beteiligt (Holmsen 1982). Zusätzlich hält ein zirkuläres Band von Mikrotubuli in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran die Thrombozytenform aufrecht (White 1994, Fox 1988). Strukturproteine, vor allem Aktin, befinden sich in der Peripherie des Zytoplasmas und sind, abhängig vom Aktivierungszustand des Blutplättchens, in Polymerisationsgrad und räumlicher Anordnung Veränderungen unterworfen. Kommt es zur Plättchenaktivierung, wird das Zytoskelett zu einer elektronendichten Masse gebündelter Filamente (Ware und Collier 1995) und beteiligt sich an der Pseudopodienbildung, der Zentralisierung und Sekretion der Granula und der shape change (White 1994).

Thrombozyten enthalten verschiedene Organellen, Membransysteme und Glykogen. Zu den Organellen zählen unter anderem Mitochondrien, Lysosomen, Peroxysomen, elektronendichte Granula und  $\alpha$ -Granula (Abb. 1.1).

Die Mitochondrien sind wichtig für den Energiemetabolismus der Thrombozyten, Glykogen dient ihnen als Energiespender (Ware und Collier 1995). Die

elektronendichten Granula speichern ADP, ATP, Calcium und Serotonin. Die  $\alpha$ -Granula enthalten Fibrinogen, Adhäsionsproteine, Thromboglobulin, Zytokine, Plättchenfaktor 4, Willebrand-Faktor, Thrombospondin, Vitronektin und Albumin (Ware und Collier 1995).



**Abb. 1.1:** Darstellung ultrastruktureller Merkmale eines diskoiden Plättchens im Längsschnitt. (EC) exterior coat, (CM) trilaminar unit membrane, (CS) surface-connected canalicular system, (MT) zirkumferentes Band der Mikrotubuli, (Gly) Glykogen Granula, (GZ) Golgi-Apparat, (M) Mitochondrien, (DB) Dense Bodies, (G)  $\alpha$ -Granula, (DTS) Dense Tubular System (nach White 1994).

Zu den Membransystemen der Thrombozyten zählen das open canalicular system (OCS) und das dense tubular system (DTS). Die Hohlräume des OCS kommunizieren über Invaginationen des Plasmalemmes mit dem Extrazellulär- raum. Während der Thrombozytenaktivierung findet eine OCS-Evagination statt. Das kanalikuläre System stellt somit ein Membranreservoir für die Oberflächenvergrößerung der aktivierten Plättchen dar (Gentry 1992, Morgenstern et al. 1990). So dient es als Transportweg für Sekretionsprodukte der Granula und

für Stoffe aus dem Blutplasma (White 1972). Nach der Thrombozytenaktivierung konnte die Fusion zwischen OCS-Kanälen und  $\alpha$ -Granula beobachtet werden (Blockmans et al. 1995, White & Krumwiede 1987, Stenberg et al. 1984). Die Membranschläuche des DTS sind vor allem in der Nähe der Mikrotubuli lokalisiert und stammen wahrscheinlich vom glatten endoplasmatischen Retikulum der Megakaryozyten ab. Sie dienen als Calciumspeicher und halten über eine Calciumpumpe im Zytoplasma einen niedrigen Calciumspiegel aufrecht (White 1979, 1994, Ware und Coller 1995). Wird es aktiviert, setzt es Calcium frei. Darüber hinaus spielt das DTS eine Rolle in der Synthese von Prostaglandinen (White 1979, Ware und Coller 1995).

## 1.2 Aspekte zum Mechanismus der Aktivierung von Thrombozyten

Blutplättchen spielen bei der Hämostase eine entscheidende Rolle. Ihre Aktivierung ist ein komplexes, aus einer Reihe von sich überlappenden Teilreaktionen bestehendes Geschehen. Sind sie nicht beschädigt und unstimuliert, zirkulieren sie im Blut, ohne miteinander oder mit der Gefäßwand zu verkleben.

Sie können durch unterschiedliche Reize und Substanzen aktiviert werden. Auf eine Aktivierung reagieren Plättchen mit verschiedenen Mechanismen. Sie äußert sich in der shape change, der Aggregation und Sekretion (Ware und Coller 1995, Zucker und Nachmias 1985). Man unterscheidet dabei zwischen reversiblen Reaktionen, bestehend aus shape change, Adhäsion und primär reversibler Aggregation sowie irreversiblen Reaktionen, bestehend aus Sekretion von Inhaltsstoffen und der sekundär irreversiblen Aggregation. Der shape change manifestiert sich in der Ausbildung langer, dünner Pseudopodien mit einem Durchmesser von 0,1  $\mu\text{m}$ . Die Plättchen verlieren dann ihre diskoide Form nehmen eine sphärische Gestalt an und die Pseudopodien verbreitern sich (Deranleau 1985, Nachmias 1983, Barnhart 1972). Dies führt zu einer Oberflächenvergrößerung des Thrombozyten, die ein Mehrfaches des Ausgangsumfanges erreichen kann (Deranleau 1985, Nijja 1987).

Ausgelöst wird dieser Gestaltwandel durch die Aktivierung des kontraktile Systems der Blutplättchen durch Calciumionen. Im Zuge der shape changes

kommt es zur Zentralisierung der Granula. Die Mikrotubuli verlagern sich dabei zentralwärts und umgeben ringförmig, gemeinsam mit Mikrofilamenten, die Plättchengranula (White 1994, Zucker und Nachmias 1985).

Die Pseudopodienbildung ermöglicht den Thrombozyten in einen engen verzahnten Kontakt zu treten. Im Zuge der Umorganisation der Plasmamembran kommt es zur Exposition des Glykoproteins IIb/IIIa, das eine hohe Bindungsaktivität für Fibrinogen, Fibronectin und Calcium besitzt. So kommt es bei aktivierten Plättchen durch die Vermittlung von Fibrinogen und Fibronectin in Anwesenheit von Calcium zur Bildung von Fibrinbrücken untereinander (Rosenblum 1997).

Begleitet ist die sekundäre, dauerhafte Aggregation durch die gezielte Sekretion von Inhaltsstoffen der dense bodies und der  $\alpha$ -Granula (Rosenblum 1997, Zucker und Nachmias 1985). Diese Inhaltsstoffe dienen ihrerseits als Aktivatoren oder als Aggregationskofaktoren, wie zum Beispiel ADP, Serotonin, Calciumionen und Fibrinogen.

Es werden zwei unterschiedliche Wege als Sekretionsmechanismen beschrieben. Einerseits gibt es die Hypothese, dass die Granula zur Peripherie wandern und dort in membranassoziierte, multivesikuläre Strukturen umgewandelt werden, die sich auflösen und ihren Inhalt an die Umgebung abgeben (Polasek 1987). Andere Autoren vertreten die Auffassung, dass die Granula im Zentrum der Plättchen mit der Membran des OCS verschmelzen und ihren Inhalt über die Kanäle an die Oberfläche abgeben (Escolar 1991, Wencel-Drake 1991, White 1995).

### 1.3 Biomechanische Mechanismen der Aktivierung

Ein breites Spektrum von Substanzen ist für die Aktivierung von Blutplättchen verantwortlich. Zu ihnen gehören der Willebrand-Faktor und Kollagen, die die Adhäsion stimulieren; Thrombin als ein starker Agonist; Endoperoxide,  $\text{TxA}_2$  und ADP, die von aktivierten Plättchen sezerniert werden und so zum positiven Rückkopplungskreis gehören. Epinephrine und Vasopressin, und der Platelet activating factor (PAF), der von stimulierten Neutrophilen und Makrophagen freigesetzt wird, wirken ebenfalls aktivierend.

Die Aktivierung der Plättchen erfolgt zuerst über die Bindung von löslichen oder unlöslichen extrazellulären Agonisten, wie etwa Kollagen oder Thrombin, an einen oder mehrere Rezeptoren in der Plättchenmembran. Werden Plättchen zum Beispiel von Thrombin stimuliert, führt dies zu einer Aktivierung der Guanin-Nukleotid-bindenden Proteine, die ihrerseits Phospholipase C in der Plättchenmembran aktivieren (Kroll und Schafer 1989, Siess 1989). Phospholipase C hydrolysiert Phosphatidylinositolbiphosphat, einen Bestandteil der Membran, in Diacylglycerol (DAG) und 1,4,5-Triphosphat (IP3). DAG und IP3 sind second messenger (Brass 1993). IP3 bindet an einen Rezeptor im DTS und verursacht eine Mobilisierung von intrazellulärem Calcium (Siffert 1995, 1988, 1987), während DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, die bei der Formation des Cytoskeletts eine wichtige Rolle spielt (Asaoka 1993, Yoshida 1988). PKC ist der primäre intrazelluläre Rezeptor für Phorbolster und kann durch diesen aktiviert werden. Die Aktivierung der PKC und die Phosphorylierung ihrer Substrate korreliert mit der Plättchenaktivierung.

Der Konzentrationsanstieg von Calcium im Zytosol führt zu einer Aktivierung weiterer Effektorsysteme wie die Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK), die durch Proteinphosphorylierung die Interaktion von Myosinfilamenten mit Aktin ermöglicht. Dieser Mechanismus ist bedeutend für die shape change und die Sekretion der Inhaltsstoffe der Granula.

Beides, sowohl der intrazelluläre Konzentrationsanstieg von Calcium als auch die G-Proteine, stimulieren die Phospholipase  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>). PLA<sub>2</sub> setzt aus

Phospholipiden der Plättchenmembran Arachidonsäure frei. Dies ist der Initialschritt der Eicosanoidsynthese (Rosenthal 1995). Die freigesetzte, wie auch die von extrazellulär aufgenommene Arachidonsäure, werden von dem Enzym Cyclooxygenase zu den Endoperoxiden PGG<sub>2</sub> und PGH<sub>2</sub> umgesetzt, die ihrerseits durch die Thromboxansynthase in TxA<sub>2</sub> umgesetzt werden (Fitzgerald 1991). Die Endoperoxide, sowie in besonderem Maße TxA<sub>2</sub>, sind wichtige Aktivatoren der Plättchen. So sind sie Bestandteil eines weiteren Rückkopplungskreises der Plättchenaktivierung.

Die Sekretionsprodukte der elektronendichten Granula, ADP und Serotonin, verhalten sich wie lokale Hormone, binden sich an spezifische Rezeptoren und amplifizieren so die Plättchenantwort. ADP induziert einerseits die shape change und die Freisetzung der Fibrinogenrezeptoren; und andererseits hemmt es die PgE<sub>1</sub>- oder Prostazyklinstimulierte Adenylatcyclase und fördert so die Freisetzung von Calcium ins Zytosol. So wird die Aktivierungsreaktion im Sinne eines positiven Feedbacks, ähnlich einer Kaskadisierung, mehrfach verstärkt.

## 1.4 Neopterin

Neopterin wird bereits seit über 20 Jahren untersucht (Nixon 1980, Hausen 1982) und ist ein Marker zellvermittelter Immunität (Fuchs 1993, Müller 1998, Hamerlinck 2000, Murr 1999). Aufgrund seiner chemischen Struktur gehört es zur Gruppe der Pteridine, die erstmals 1889 aus biologischem Material isoliert wurden (Vrecko 1997, Millner 1998, Haavik 1989). Sie können in aromatische Pteridine, 7,8-Dihydropteridine, 5,6,7,8,-Tetrahydropteridine, Lumazine und andere Pteridine unterteilt werden.

Neopterin gehört zu den aromatischen Pteridinen (Oettl 1999). Es entsteht aus Guanosin-Triphosphat während der Biosynthese von Tetrahydrobiopterin. GTP Cyclohydrolase I spaltet das Purin zu 7,8 Dihydroneopterintriphosphat, welches durch eine Phosphatase zu Neopterin und 7,8-Dihydroneopterin konvertiert wird (Murr 2002).

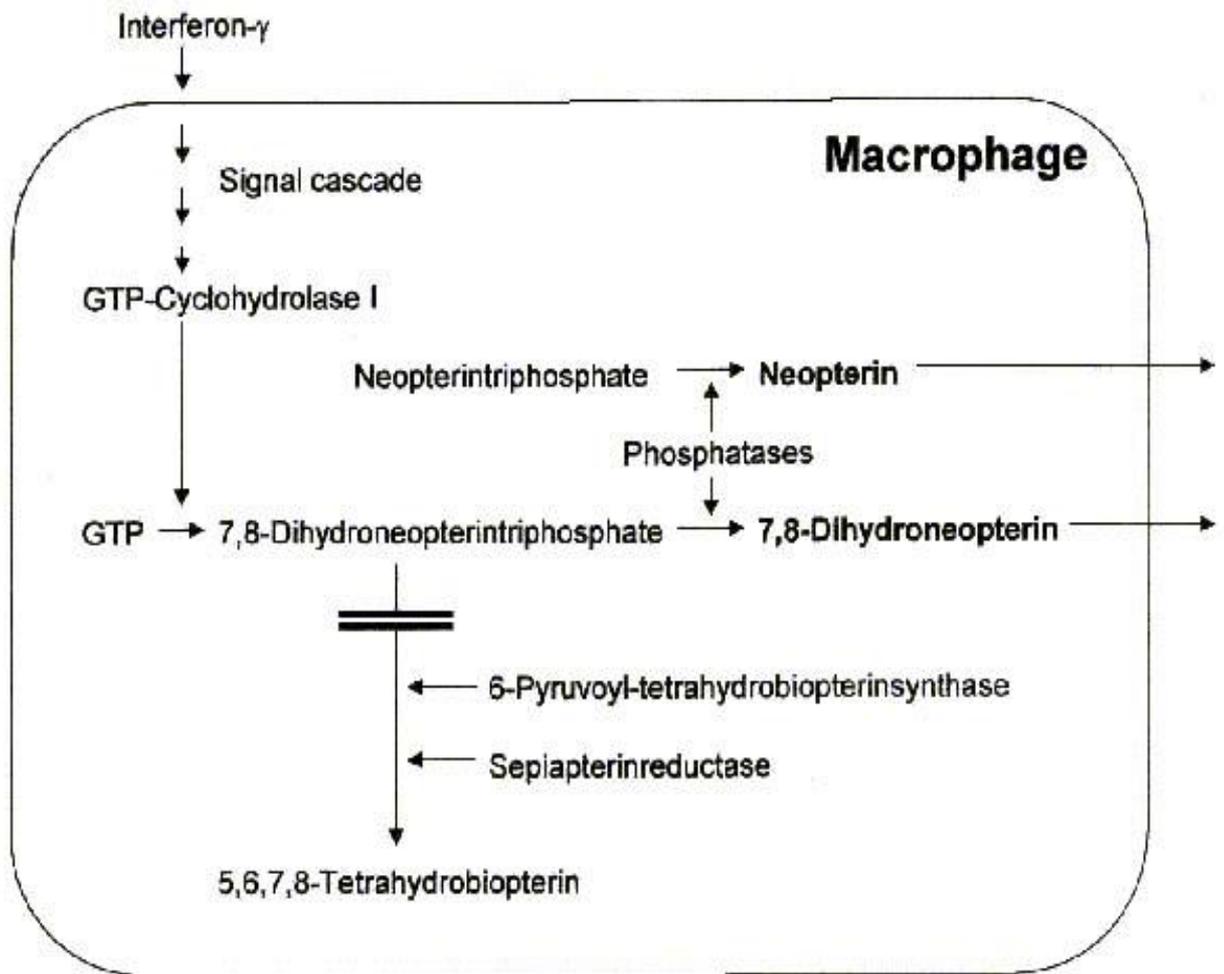


Abb. 1.2: Biosynthese von Neopterinderivaten in menschlichen Monozyten/Makrophagen. Aufgrund eines konstitutionellen Mangels an 6-pyruvoyl-tetrahydrobiopterinsynthase sammeln sich große Mengen von Neopterinderivaten auf Kosten von Biopterinderivaten. (aus Murr et al. 2002)

Wird die GTP Cyclohydrolase aktiviert, so produzieren die meisten Zellen, wie Fibroblasten oder Endothelzellen, Tetrahydrobiopterin und nur geringe Mengen Neopterin derivative. Da menschliche Makrophagen und Monozyten jedoch einen Mangel an 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterinsynthase, die 7,8-Dihydroneopterintriphosphat in Tetrahydrobiopterin umwandelt, aufweisen, führt dies in diesen Zellen zur Akkumulation von 7,8 Dihydroneopterintriphosphat. 7,8-Dihydroneopterintriphosphat wird durch Phosphatasen zu Neopterin und 7,8-Dihydroneopterin im Verhältnis 1:3 konvertiert (Wachter 1989, Fuchs 1988, 1989). Aus

diesem Grund scheinen Monozyten und Makrophagen die bedeutendste Quelle für Neopterin und 7,8-Dihydroneopterin darzustellen (Abb. 1.2) (Anwaar 1998).

Interferon (IFN)- $\gamma$  ist der zentrale Auslöser für die Aktivierung von GTP Cyclohydrolase I und vermittelt so die Akkumulierung von Neopterin und 7,8 Dihydroneopterin in Monozyten und Makrophagen (Huber 1984). Verschiedene Cytokine, wie zum Beispiel Interleukin (IL)-2, sind in der Lage, die IFN- $\gamma$  Freisetzung aus T-Helferzellen zu induzieren und so zusätzlich eine Neopterin-freisetzung zu provozieren (Brown 1989). IL-2 und besonders IFN- $\gamma$  werden typischerweise von T-Helferzellen des Subtyps 1 produziert, die die durch zytotoxische T-Zellen vermittelte Immunantwort fördern (Romagnani 1991). Eine erhöhte Neopterin-produktion in Körperflüssigkeiten, bei Krankheiten wie Virusinfektionen, spiegelt somit die Aktivierung der zellvermittelten Immunantwort wieder (Fuchs 1988).

In vitro kann die Neopterinproduktion auch durch eine Stimulierung mit Interferon- $\alpha$  induziert werden. Hierfür ist allerdings eine 1000-fach höhere Dosis als bei Interferon- $\gamma$  nötig (Huber 1984). Andere potente Aktivoren von Monozyten/Makrophagen induzieren zwar nicht die Freisetzung bedeutender Mengen Neopterin (Nathan 1986), einige können aber die Interferon- $\gamma$  vermittelte Neopterinproduktion superinduzieren (Werner-Felmayer 1989).

Neopterin kann auch in anderen Zellen, wie Nierenepithelzellen, durch Stimulierung mit IFN- $\gamma$  produziert werden, allerdings in geringeren Mengen als in Makrophagen (Moutabarrik 1994). Diese Produktion durch Epithelzellen wird von einer Tetrahydrobiopterinproduktion begleitet (Werner-Felmayer 1993).

Neopterin ist als ein Marker verbunden mit der Aktivität von Monozyten und Makrophagen, die es produzieren und in verschiedene Körperflüssigkeiten freisetzen, wie Serum (Werner 1987, Oda 1999, Diamondstone 1994) , Liquor (Millner 1998), Synovia, Pankreassaft, Urin (Werner 1987, Oda 1999, Zangerle 1994, Kronberger 1995), Speichel (Kato 1989) und Aszitesflüssigkeit (Zeimet 1998).

Zusätzlich besteht ein enger Zusammenhang zwischen der von diesen Zellen produzierten Menge Neopterin und ihrer Kapazität zur Freisetzung von Wasserstoffperoxid. Die Neopterinkonzentration reflektiert so das Ausmaß des durch die Aktivierung des Immunsystems verursachten oxidativen Stresses (Weiss 1998). Ausgeschieden wird Neopterin in unverändertem Zustand vornehmlich über die Nieren.

Monozyten und Makrophagen scheinen bei Menschen der Hauptursprung zu sein (Anwaar 1998). Die Obergrenze des Normwertes von Neopterin im Serum beträgt 10nmol/L (Millner 1998) und ist abhängig vom Alter (Ledochowski 1999), höher bei Kindern und älteren Menschen (Oettl 1999), jedoch nicht vom Geschlecht (Werner 1987, Diamondstone 1994).

Studien haben abnormal hohe Neopterinkonzentrationen in Körperflüssigkeiten in verschiedenen klinischen Zuständen, wie Allotransplantatabstoßung, Infektionen, Autoimmunkrankheiten, Herz- und Nierenfehlern, koronaren Herzkrankheiten, bösartigen Tumorerkrankungen, Arteriosklerose und bei Myokardinfarkten nachgewiesen.

Da die Dihydroformen der Pteridine sehr labil sind, ist die Sammlung und Speicherung von Proben in großem Umfang zur klinischen Diagnostik problematisch. Deshalb wird in der täglichen klinischen Routine nur das wesentlich stabilere Neopterin quantifiziert. Im Serum kann Neopterin leicht durch Immunoassays bestimmt werden; die Durchschnittskonzentration liegt bei gesunden Erwachsenen bei  $5,3 \pm 2,7$  nM (Wachter 1989, Fuchs 1989). Da Neopterin konstant ausgeschüttet wird, können alternative oder zusätzliche Messungen der Neopterinkonzentration in Urinproben unternommen werden.

## 1.5 Fragestellung

Nachdem schon zahlreiche biochemische Untersuchungen zu Neopterin vorliegen und sein Einfluss auf die Plättchenaktivierung diskutiert wurde (Anwaar 1998), soll diese Arbeit nun, mit Hilfe eines in der Vergangenheit erfolgreichen Untersuchungsmodells, eine wichtige Wissenslücke schließen. Anwaar et al. stellten in ihrer Studie aus dem Jahre 1998 einen möglichen Zusammenhang zwischen der vasodilatatorischen und vasokonstriktiven Funktion des Endothels und leukozytären Entzündungsmediatoren wie Neopterin bei Patienten mit Artherosklerose dar. Die Studie unterstützte die These eines möglichen anti-aggregierenden Effektes von Leukozyten beziehungsweise den von ihnen sezernierten Entzündungsmediatoren.

Die vorliegende Arbeit untersucht erstmalig eine direkte Beeinflussung des von Leukozyten sezernierten Entzündungsmediators Neopterin auf die Aktivierung von Thrombozyten, indem gewaschene Plättchen und plättchenreiches Plasma mit Neopterin inkubiert und anschließend mit Thrombin beziehungsweise Arachidonsäure aktiviert wurden. Das Modell basiert auf der von Patscheke beschriebenen Methode zur Gewinnung einer Suspension von ruhenden und funktionell intakten Plättchen in einer proteinarmen und von anderen korpuskulären Blutbestandteilen weitgehend befreiten Lösung (Patscheke 1981). Beruhend auf dieser Methode haben bereits frühere Studien die Wirkung verschiedenster Substanzen auf die Plättchenaktivierung getestet (Jandak 1989, Dierichs 1993, Pfennig 1996, Szuwart 1999, Zhao 1993). Die Aktivierungszustände sollen mit Hilfe der Aggregometrie und der Licht- und Elektronenmikroskopie untersucht werden.

## **2. Material und Methode**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Chemikalien**

Aceton: Carl Roth KG, Karlsruhe

Albumin: Sigma, Deisenhofen

Apyrase: Sigma, Deisenhofen

Arachidonsäure Sigma, Deisenhofen

Bleicitrat: Riedel de Haen, Hannover

Calciumchlorid: Merck, Darmstadt

Chloroform, Merck, Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat: Merck, Darmstadt

ERL: (Komponenten: Epoxy Resin Low Viskosity nach Spurr): Serva, Heidelberg

Glucose: Merck, Darmstadt

Glutaraldehyd: Serva (25%), Heidelberg

Kaliumchlorid: Merck, Darmstadt

Kaliumhydroxid-Plätzchen: Merck, Darmstadt

Magnesiumchlorid: Merck, Darmstadt

Natriumchlorid: Merck, Darmstadt

Natriumdihydratphosphat: Merck, Darmstadt

Natriumhydrogencarbonat: Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid: Merck, Darmstadt

Natronlauge: Merck, Darmstadt

Neopterin: Sigma, Deisenhofen

Osmiumtetroxid: Mikrotechnik EM GmbH, München

Prostaglandin E1: Sigma, Deisenhofen

Saccharose: Merck, Darmstadt

Salzsäure: Kraft, Duisburg

Thrombin: Behringwerke, Marburg

TRIZMA: Sigma, Deisenhofen

Uranylacetat: Merck, Darmstadt

### 2.1.2 Geräte

APACT-Aggregometer: Sekonic, Tokyo, Japan

Drucker: Sekonic S-200 GP, Tokyo, Japan

Elektronenmikroskop EM 109: Zeiss

Heizplatte Medax: Nagel KG, Kiel

IKA-Vibrax-VXR: Janke & Kunkel GmbH, Staufen

Laborwaage BP 210D: Sartorius

Lichtmikroskop: Fa. Leitz, Wetzlar

LKB Knife Maker Type 7801B: Stockholm-Bromma, Schweden

LKB Pyramitom Ultramicrotomy System: Stockholm-Bromma, Schweden

pH-Meter CG840: Schott-Geräte GmbH, Hofheim

Tischzentrifuge: Eppendorf

Ultracut Typ 701701: Reichert Jung, Wien

Universal-Wärmeschrank: Memmert, Schwabach

Zentrifuge Digifuge: Heraeus-Christ GmbH, Osterode

Vibrofix VF1 Electronic: Janke & Kunkel GmbH, IKA-Werk, Staufen

## 2.2 Blutentnahme

Eine wichtige Voraussetzung für Thrombozytenuntersuchungen ist die Verhinderung der Aktivierung des Gerinnungssystems bei der Präparation. Deshalb wurden bei allen Präparationsschritten Glasmaterialien und Hautkontakt vermieden. Die Thrombozytenpräparation erfolgte ausschließlich mit inerten Kunststoffmaterialien. So wurde eine Aktivierung des Gerinnungssystems durch Glasmaterialien, insbesondere über Faktor II - Aktivierung und das extrinsische System, und damit eine unerwünschte Adhäsion und Degranulation der Blutplättchen vermieden.

Von Spendern, die seit mindestens 10 Tagen weder Glucocorticoide noch nichtsteroidale Antiphlogistika eingenommen hatten, wurde mittels einer großlumigen Kanüle (G18) Blut aus einer Cubitalvene gewonnen. Zur Vermeidung einer Hämolyse und einer mechanischen Plättchenaktivierung, die das intrinsische Gerinnungssystem aktivieren würde, wurde bei der Blutentnahme weder gestaut noch aspiriert.

Das Blut wurde im freien Fluss in Kunststoffröhrchen aufgefangen, in denen 1ml ACD (acid-citrate-dextrose) vorgelegt war. ACD senkt den pH-Wert, chelatisiert die Calciumionen und verhindert so die Gerinnung.

Da die bei der Punktion freiwerdenden Gewebsthromboplastine das extrinsische Gerinnungssystem aktivieren, wurden die ersten 2 ml Blut verworfen. Pro Röhrchen wurden 7 ml Blut aufgefangen, so dass man auf ein Gesamtvolumen von 8 ml pro Röhrchen kommt.

### 2.3 PRP-Gewinnung

Dem ACD - Vollblut wurde als Antikoagulanzen anschließend pro Röhrchen jeweils 16 µl einer PgE<sub>1</sub> - Lösung (Prostaglandin-E<sub>1</sub>) bis zu einer Endkonzentration von 20 nM hinzugegeben und durch sofortiges langsames Schwenken eine gründliche Durchmischung erreicht. Die Proben wurden nun in einer Zentrifuge mit Ausschwingmotor 30 Minuten bei 160g und Raumtemperatur sedimentiert.

Nach dem Zentrifugieren wurde das überstehende plättchenreiche Plasma mit einer Plastikinsulinspritze abgesaugt und zur weiteren Verwendung in ein Plastikbecherglas gegeben.

### 2.4 Plättchenpräparation

Ziel der Waschvorgänge ist es, von anderen Blutbestandteilen weitgehend gereinigte und gleichzeitig ruhende und unversehrte Blutplättchen zu erhalten. Dies erfolgte nach dem Verfahren von Patscheke (1981). Das gewonnene PRP wurde mit 5µg/ml Apyrase versetzt und 10 Minuten ruhen gelassen. Die Apyrase spaltet das von Erythrozyten beim Zentrifugieren freigesetzte ADP und verhindert so die ADP - assoziierte Plättchenaktivierung. Nach zehnmütiger Inkubationszeit wurde das PRP zur weiteren Reduktion der Gerinnungsneigung mit ACD auf pH 6,5 titriert und auf Röhrchen mit jeweils 3ml verteilt. Pro Röhrchen wurden jetzt 20 nM PgE<sub>1</sub> hinzugefügt. Die Röhrchen wurden zur Durchmischung leicht geschwenkt und anschließend 10 Minuten bei 450g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Der daraus entstandene Überstand wurde nun vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und anschließend das Reagenzglas mit dem aus sedimentierten Plättchen bestehende Pellet mit 3 ml der Waschlösung 1 (Tab. 2.1) aufgefüllt. Nach zehnmütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Pellets resuspendiert, mit 20 nM PgE<sub>1</sub> versetzt und 10 Minuten bei 280g

zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgesaugt und 30 µl der Waschlösung 2 in die Röhrchen gegeben.

Es folgte eine zehninminütige Inkubationszeit mit anschließender Resuspendierung. Dann wurden die Plättchen in Eppendorfgefäße gepoolt und 30 Minuten in einem Wasserbad von 37°C gelagert.

<b>Substanz</b>	<b>Lösung 1</b>	<b>Lösung 2</b>	<b>Lösung 3</b>	<b>Lösung 4</b>
NaCl (mM)	100	110	135	98
KCl (mM)	5,0	5,0	5,0	5,0
CaCl (mM)	2,0	1,2	0,5	
MgCl (mM)	1,0	1,0		0,06
Glucose (mM)	5,0	5,0	5,0	5,0
Na-Citrat (mM)	30			
Phosphatpuffer (mM)		15		
Tris- Puffer (mM)				45
BSA (mg/ml)	0,5	2,0	0,65	0,53
Apyrase (µg/ml)	0,5	4,0	4,0	1,0
pH-Wert	6,5	6,5	6,5	7,4

**Tab. 2.1: Wasch- und Suspensionslösungen; nach Patscheke (1981)**

## 2.5 Antikoagulantien und Inhibitoren

- **ACD (Acid-Citrate-Dextrose):**

Glucose (120mM), Zitronensäure (41mM), Na-Citrat-2-hydrat (84mM)

- **PgE1-Stammlösung:**

PgE1 (1mM) in Ethanol, bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert

- **PgE1-Lösung:**

Direkt vor der Anwendung aus der Stammlösung hergestellt, Verdünnung 1:100 mit 0,9 % NaCl-Lösung, Endkonzentration: 0,01 mM in physiologischer NaCl-Lösung mit 0,1% Ethanol

- **Apyrase-Stammlösung:**

1 mg/ml NaCl (Grade VIII); bei  $-20^{\circ}\text{C}$

- **Apyrase-Lösung:**

Herstellung aus der Stammlösung, Verdünnung 1:10 mit 0,9 % NaCl-Lösung, Endkonzentration: 100  $\mu\text{g/ml}$  in physiologischer NaCl-Lösung

## 2.6 Aggregometermessung

Das Prinzip der Messung besteht in der Aufzeichnung der Lichttransmission durch eine Zellsuspension, in diesem Fall eine Plättchensuspension. Graphisch dargestellt ergibt sich eine Kurve, deren Verlauf Rückschlüsse auf zeitliche Veränderungen in Form, Größe und Aggregationsverhalten der Thrombozyten erlaubt.

Die Plättchensuspension wird im Aggregometer in einen definierten Strahlengang eingebracht und die Lichtstärke, die durch Absorption und Streuung verändert wird, nach Passage der Probe gemessen.

Entstehen nun Plättchenaggregate, werden also aus vielen einzelnen Plättchen, die das Licht streuen, wenige große Konglomerate, so bewirkt dies eine insgesamt geringere Ablenkung des Lichts. Gleichzeitig nimmt die Transparenz der Suspension und somit auch die Transmission zu.

Für die Messung wurden 20µl der Plättchen in Lösung 2 und 40 µl der Lösung 3 in Kunststoffküvetten gegeben. Anschließend wurde die Menge Waschlösung 4 dazugegeben, so dass das Gesamtvolumen nach Zugabe aller Testwirkstoffe 300µl entsprach. Dies bewirkte eine Anhebung des pH-Wertes von 6,5 auf 7,4.

Vor Beginn der Messung wurde zuerst eine Leerprobe durchgeführt, das heißt, ein Trübungswert von 0% gespeichert, mit der alle späteren Messungen verglichen wurden. Sich verändernde Transmissionswerte können so auf der %-Skala in positiver oder negativer Richtung abgetragen werden.

Lagen die ruhenden, diskoiden Plättchen in der Suspension nun ungerichtet vor, so richteten sie sich nach Einschalten des Rührers entsprechend des Rührerstromes aus, was zur Zunahme der Transmission und damit zum so genannten Rührsprung führte. Dieser stellt sich in der Kurve als abszissenparalleler Verlauf dar. Der Rührsprung ist ein Zeichen für den ruhenden Zustand der Plättchen, da sich aktivierte Plättchen aufgrund ihrer abgerundeten Form nicht ausrichten und somit keine Änderung der Transmission aufweisen (Patscheke 1983).

## 2.7 Versuchsablauf

Folgende Versuchsansätze wurden durchgeführt:

- 1.) Kontrollansätze ohne Neopterin
- 2.) Ansätze mit Neopterin in PRP
- 3.) Ansätze mit Neopterin in gewaschenen Plättchen
- 4.) Erstproben mit und ohne Neopterin ohne Aktivierung

Die ersten drei Versuchsansätze wurden in zwei unterschiedlichen Versuchsreihen jeweils mit Thrombin (0,005, 0,075 und 0,1U/ml) beziehungsweise Arachidonsäure (150, 200 und 250 $\mu$ M) aktiviert. Die Erstproben mit und ohne Neopterin wurden nicht aktiviert.

### 2.7.1 Neopterin in PRP

Bis zur Titration des plättchenreichen Plasmas auf pH 6,5 erfolgte die Präparation der Plättchen wie oben beschrieben. Nach der zehnmütigen Ruhepause wurde das PRP auf vier Reagenzgläser mit jeweils 3ml verteilt. Zwei Reagenzgläser dienten der Kontrolle und zwei den Ansätzen mit Neopterin.

Nun erfolgte die Zugabe von Neopterin in zwei der Reagenzgläser bis zu einer Endkonzentration von 20 nMol. In weiteren Versuchsreihen wurde die Endkonzentration auf 40, 80 beziehungsweise 160 nMol erhöht. In die Kontrollansätze erfolgte gleichermaßen die Zugabe der äquimolaren Menge TRIS-Puffer.

Der Waschvorgang setzte sich nun wie in Kapitel 2.4 beschrieben fort. Nach der 30-minütigen Inkubationszeit schloss sich nun die Aggregometermessung an.

Für den Kontroll- und den Neopterinansatz wurden jeweils vier Kunststoffküvetten mit Rührfischen bestückt, um eine gute Durchmischung der Proben durch den Magnetrührer zu erreichen. Wie bereits im Kapitel „Aggregometer-

messung“ beschrieben, wurden die Küvetten mit den Waschlösungen aufgefüllt. Nun erfolgte der Nullabgleich.

Anschließend wurden die Erstproben des Kontroll- und des Neopterinansatzes parallel in den Strahlengang gebracht und es wurde mit der Aufzeichnung der Aggregometerkurve begonnen. Nach einer Vorlaufzeit von ca. 60 Sekunden erfolgte die Gabe von 3µl Calcium. Nach der Vergewisserung, dass keine Aggregation erfolgte, wurden die Proben entnommen und in Glutaraldehyd (2,5%) fixiert. Anschließend wurden die Proben 2, 3 und 4 in derselben Weise in den Strahlengang gebracht und nach erfolgter Calciumgabe mit 0,05U, 0,075U beziehungsweise 0,1U Thrombin versetzt, um die Plättchen zu aktivieren. Die Kurve sollte nun so lange aufgezeichnet werden, bis sich keine Veränderungen im Kurvenverlauf mehr zeigten. Dann wurden die Proben gleichermaßen in Glutaraldehyd (2,5%) fixiert.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde statt Thrombin Arachidonsäure in den Konzentrationen 150, 200 beziehungsweise 250µM zur Aktivierung der Plättchen verwendet.

### 2.7.2 Neopterin in gewaschenen Plättchen

In dieser Versuchsreihe wurde der Waschvorgang zuerst, wie oben beschrieben, durchgeführt. Nach der Gabe von Waschlösung II wurden alle Zellen in ein Kunststoffcap gegeben und die Probe wurde zehn Minuten ruhen gelassen.

Anschließend wurden die Zellen in Waschlösung II auf zwei weitere Kunststoffcaps verteilt, eins für den Kontrollansatz und eins für den Ansatz mit Neopterin. Dann wurde die doppelte Menge der Waschlösung III in beide Caps gegeben und anschließend mit der Waschlösung IV bis zum Gesamtvolumen von 1,5 ml pro Cap aufgefüllt.

In den Kontrollansatz wurde nun, je nach Versuchsreihe, 20, 40, 80 beziehungsweise 160nMol TRIS-Puffer und in den zweiten Ansatz die äquimolare Menge Neopterin gegeben.

Dann wurden beide Proben für 30 Minuten bei 37°C ins Wasserbad gegeben. Die Aggregometermessung erfolgte wie im vorherigen Kapitel beschrieben, mit dem Unterschied, dass sich in dieser Versuchsreihe die Plättchen mit den Waschlösungen bereits in einer Suspension ohne Blutplasma befanden. Ziel war es, die Plättchen in einer proteinarmen und von anderen korpuskulären Bestandteilen befreiten Lösung mit Neopterin zu inkubieren.

Von dieser Suspension wurde nun so viel in die Küvetten gegeben, dass das Gesamtvolumen nach Zugabe aller Testwirkstoffe 300µl entsprach. Auch dieser Versuch wurde in einer zweiten Versuchsreihe mit Arachidonsäure (150, 200 bzw. 250µM) statt Thrombin (0,05, 0,075 bzw. 0,1U) durchgeführt.

Jede Versuchsreihe wurde dreimal durchgeführt. Insgesamt standen 15 Personen als Blutspender zur Verfügung.

## 2.8 Aufbereitung der Proben

### 2.8.1 Fixation und Entwässerung

Im Anschluss an die Versuche wurden die Ansätze mit 300µl von 2,5% Glutaraldehyd (in Cacodylatpuffer) 30 Minuten lang fixiert. Danach wurden die Proben in Kunststoffküvetten (Eppendorf, Hamburg) umgefüllt und dreimal in 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,3; 4% Saccharose gewaschen. Zwischen jedem Waschvorgang wurden die Pellets kurz angehoben und anschließend bei 1500 G fünf Minuten zentrifugiert, um eine gute Durchtränkung der Pellets zu erreichen.

Um die Proben nachzufixieren und den Kontrast im Elektronenmikroskop zu erhöhen, wurden die Pellets für eine Stunde mit 1% Osmiumtetroxid (OSO<sub>4</sub>) in 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,3; 4% Saccharose inkubiert. Nach demselben Prinzip des Waschvorgangs, wie oben beschrieben, wurden nun die Pellets wiederum viermal mit 0,1 M Cacodylatpuffer, pH 7,3; 4% Saccharose und anschließend dreimal mit Aqua dest gewaschen.

Um eine Entwässerung der Pellets zu erreichen, wurden die Pellets mit 30%, 50%, 70%, 90% und dreimal 100%igem Aceton gewaschen. Die Pellets wurden mit der jeweiligen Konzentration überschichtet, vorsichtig mit Hilfe der Pipette vom Boden der Küvette gelöst, 5 Minuten lang geschüttelt und 5 Minuten bei 1500 G zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und mit Aceton der nächsthöheren Konzentration überschichtet.

### 2.8.2 Einbettung in Kunstharz

Zur Einbettung der Pellets diente Epoxy Resin Low Viskosity (ERL) nach Spurr (Spurr 1969), das über die Pellets in die Eppendorf-Küvetten gegeben wurde. Um die Pellets vollständig zu durchtränken, wurden sie mit der Plastikpipette vom Boden gelöst. Dann wurden die Proben zur Verdampfung des restlichen Acetons für 1 Stunde bei 60°C im Wärmeschrank inkubiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt und anschließend wurden die Pellets in Gelatinekapseln mit frischem ERL gegeben. Diese Kapseln kamen für 8 Stunden oder über Nacht zur Auspolymerisation bei 80°C in den Wärmeschrank.

### 2.9 Herstellung von Semidünnschnitten

Mit einem LKB-Pyramitom (Bromma, Schweden) wurde bis zum Erreichen des Pellets eine plane Fläche aus der Kunstharzblockspitze getrimmt. Anschließend wurde aus dieser Fläche ein Quadrat der Größe 1x1 mm herausgetrimmt.

Die Herstellung der Semidünnschnitte erfolgte am Ultramikrotom (Ultracut, Reichert Jung, Wien) mit den bereits getrimmten Kunstharzblöckchen. Zur Anfertigung der 1µm dicken Schnitte wurde ein Histo-Diamant-Messer benutzt.

Um die Schnitte zu strecken, wurde ein Tropfen Aqua bidest auf eine Glasplatte aufgebracht. Die wiederum wurde auf eine 60°C warme Wärmeplatte

gelegt. Die angefertigten Schnitte wurden nun mit einer Wimper auf den Tropfen gelegt, bis der Tropfen verdampft war.

Die Schnellfärbung der Schnitte erfolgte mit Methylenblau-Azur II, eine Mischung von 1% Methylenblau in 1%iger wässriger Boraxlösung und 1% Azur II in Aqua dest. Die Schnitte wurden auf der Wärmeplatte bei 60°C eine Minute gefärbt, mit Aqua bidest gespült und anschließend getrocknet. Basophile und osmiophile Strukturen färben sich blau, metachromatische Substanzen rotviolett (Romeis 1989).

## 2.10 Herstellung von Ultradünnschnitten

An den getrimmten Blöckchen wurden nun am Ultramikrotom mit Diamantmessern Schnitte in einer Dicke von ca. 80 nm angefertigt. Die Schnitte wurden mit Chloroform gestreckt und mit Kupfernetzchen aufgefangen.

Die Kontrastierung der Schnitte erfolgte, indem die Kupfernetzchen für 30 Minuten und unter Ausschluss von Licht auf jeweils einen Tropfen Uranylacetat (5% in Aqua bidest) aufgebracht wurden. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit wurden die Netzchen mit Aqua bidest gespült und zum Trocknen auf Papierfilter gelegt. Anschließend wurden die Netzchen, wiederum unter Ausschluss von Licht, für 5 Minuten jeweils auf einen Tropfen Bleicitrat gelegt, gespült und getrocknet, wie oben beschrieben. Um bei diesem Vorgang Niederschläge auf den Schnitten zu vermeiden, wurde die Kontrastierung in Glaspetrischalen in Anwesenheit von Natriumhydroxidpellets vorgenommen.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten an einem Transmissions-Elektronenmikroskop EM 109 (Zeiss). Die Thrombozyten wurden bei einer Primärvergrößerung von 1950 bis 22000 exemplarisch fotografiert.

### **3. Ergebnisse**

Folgende Versuchsansätze wurden durchgeführt:

- 1.) Kontrollansätze ohne Neopterin
- 2.) Ansätze mit Neopterin in PRP
- 3.) Ansätze mit Neopterin in gewaschenen Plättchen
- 4.) Erstproben mit und ohne Neopterin ohne Aktivierung

Die ersten drei Versuchsansätze wurden in zwei unterschiedlichen Versuchsreihen jeweils mit Thrombin (0,05, 0,075 und 0,1U/ml) beziehungsweise Arachidonsäure (150, 200 und 250 $\mu$ M) aktiviert. Die Erstproben mit und ohne Neopterin wurden nicht aktiviert.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe dreier Verfahren:

- 1.) Beobachtung der Transmission im Aggregometer
- 2.) Untersuchung im Lichtmikroskop
- 3.) Untersuchung im Elektronenmikroskop

#### **3.1 Untersuchungen zum Zustand der Plättchen nach den Waschvorgängen**

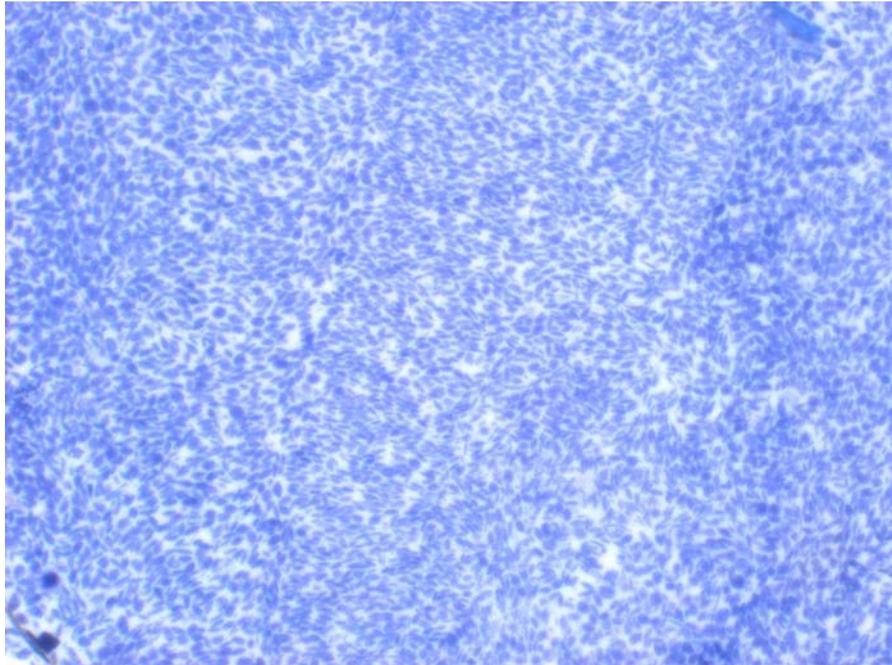
Um beurteilen zu können, ob die Blutplättchen innerhalb der Waschvorgänge nicht aktiviert wurden und vor Beginn der Aggregometermessung ruhende Plättchen vorlagen, wurde der Erstprobe eines jeden Ansatzes kein Aktivator, sondern lediglich Calcium hinzugefügt und für ca. 3 Minuten die Transmission beobachtet.

Anschließend wurden die Proben in 2,5% Glutaraldehyd fixiert.

Die Aggregometerkurven zeigten nach erfolgtem Rührsprung durch das Anstellen des Rührers einen absolut abszissenparallelen Verlauf und somit keine Veränderungen in der Transmission. Die Zugabe von Calcium ist durch einen

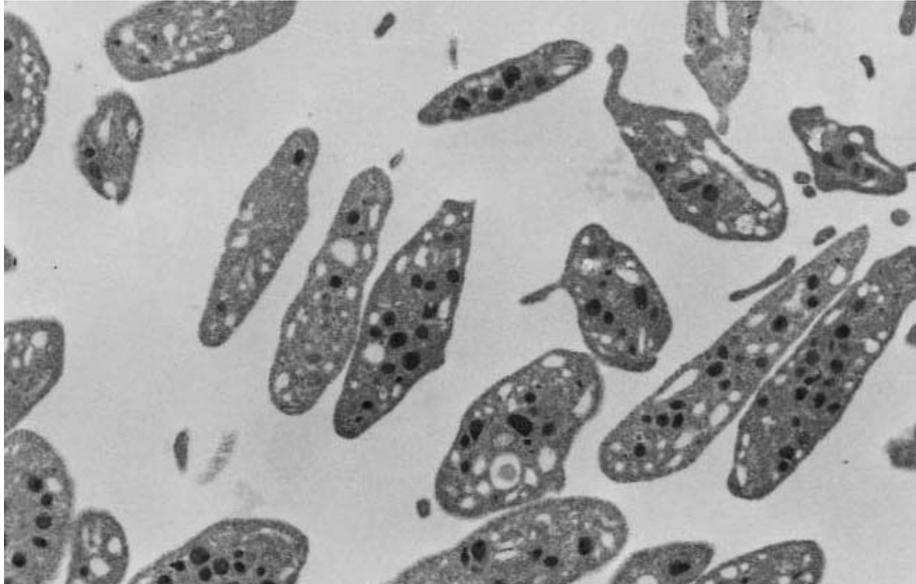
negativen Ausschlag und einen anschließenden leichten Transmissionsanstieg aufgrund der Verdünnung der Plättchensuspension gekennzeichnet.

Im Lichtmikroskop (Durchlicht) betrachtet, waren die Thrombozyten, soweit beurteilbar, spindelförmig. Eine mögliche Adhäsion und Aggregation der Plättchen ist nicht beurteilbar (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1: Lichtmikroskopische Aufnahme der mit Neopterin inkubierten Erstprobe. (x 25)**

Bei der Untersuchung im Elektronenmikroskop zeigte sich größtenteils die für ruhende Plättchen typische Spindelform ohne Ausbildung von Pseudopodien (Abb. 3.2). Die Granula waren innerhalb der Plättchen gleichmäßig verteilt, und es sind Glykogeneinschlüsse zu erkennen. Die membranumhüllten Lumina des OCS zeigten keine Erweiterungen. Es lagen keine Zeichen einer Degranulation vor. Adhäsion oder Aggregation waren nicht zu erkennen.



**Abb. 3.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme der mit Neopterin inkubierten Erstprobe. (x 3400)**

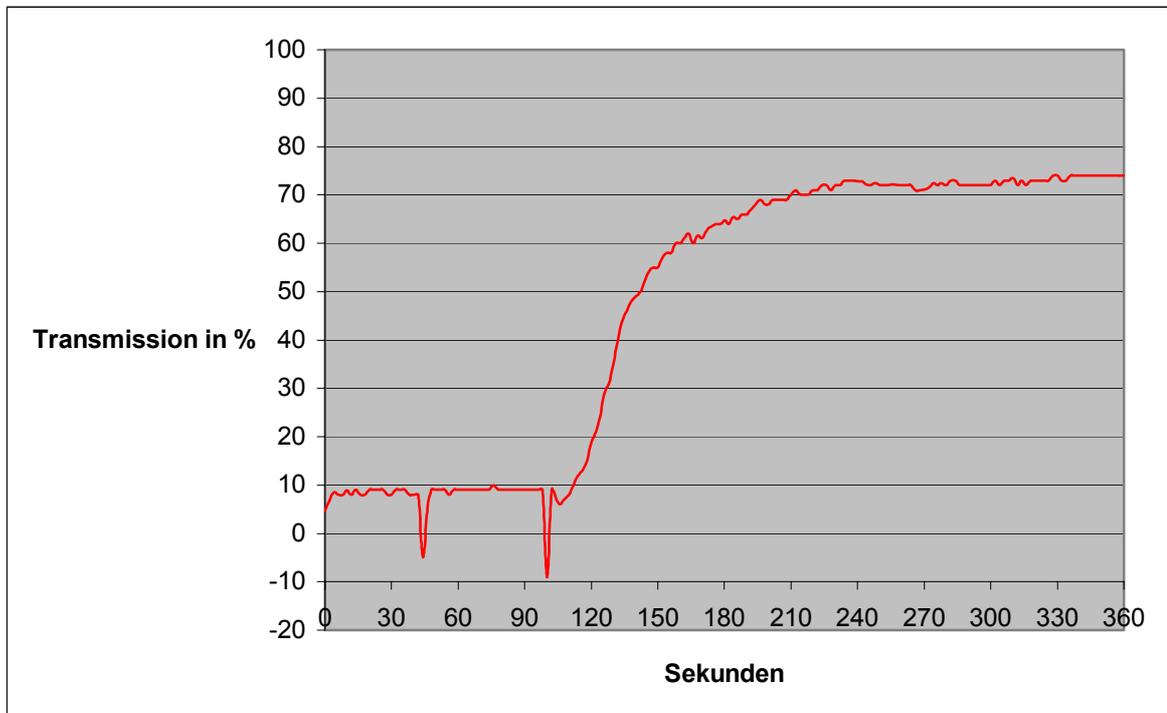
### 3.2 Untersuchungen zum Zustand der Plättchen nach erfolgter Aktivierung mit 0,05 U/ml, 0,075 U/ml bzw. 0,1 U/ml Thrombin

#### Ansatz 1: Kontrollansatz

Nach Einschalten des Magnetrührers zeigt sich in der Kurve ein deutlicher Rührsprung.

Durch die Verdünnung der Suspension nach der Gabe von 1mM Calcium, die durch einen kurzzeitigen negativen Ausschlag gekennzeichnet ist, erfolgt ein leichter Transmissionsanstieg. Nach der Zugabe von 0,075U Thrombin, an einem weiteren Peak in der Kurve zu erkennen, zeigt sich ein kurzer konkaver Abfall der Aggregometerkurve um ca. 5%, der auf die shape change der Plättchen zurückzuführen ist. Anschließend steigt die Transmission innerhalb von zwei Minuten exponentiell bis zu einem Maximum zwischen 70 und 80% an und verläuft horizontal weiter. Zu diesem Zeitpunkt ist eine vollständige Aggregation abgelaufen, da durch den Rührer Zell-Zellkontakte stattgefunden und die Plättchen über ihre Pseudopodien Aggregate gebildet haben.

Die Aggregometerkurve zeigt somit einen für thrombinaktivierte Plättchen typischen Verlauf (s. Abb. 3.3).

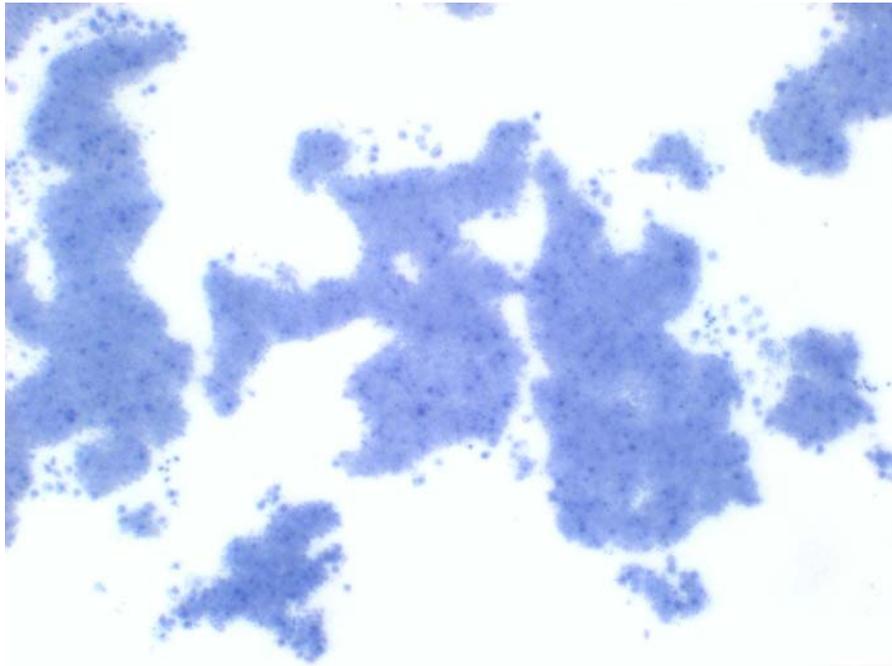


**Abb. 3.3:** Transmissionsverlauf im Aggregometer nach erfolgter Aktivierung mit 0,075 U/ml Thrombin. Die beiden negativen Peaks kennzeichnen die Calcium- bzw. Thrombingabe.

Durch die Erhöhung der Thrombinkonzentration auf 0.075 U/ml beziehungsweise 0.1 U/ml verändert sich der Kurvenverlauf nicht. Es kommt zu keinem schnelleren oder stärkeren Transmissionsanstieg.

Die Gabe von Thrombin führt zu einer sphärischen Formveränderung der Plättchen und zur Ausbildung von Pseudopodien. Aufgrund einer scheinbaren Vermehrung von kleinen, das Licht streuenden Partikeln führen diese Veränderungen zu einer verminderten Transmission des Lichts.

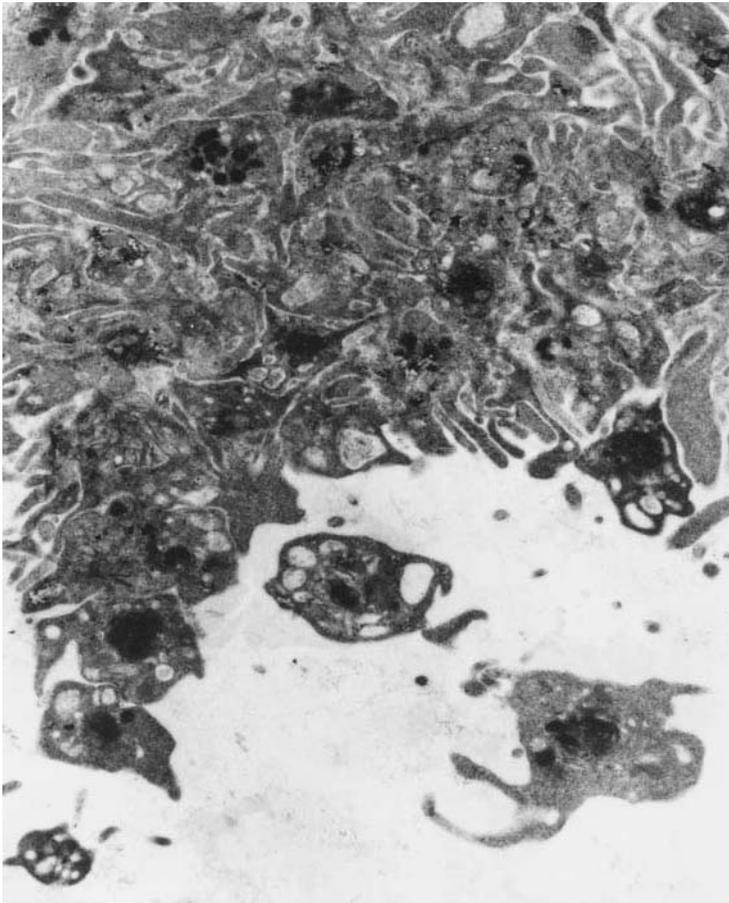
Der darauf folgende starke Anstieg der Transmission ergibt sich infolge von Sekretion und Aggregation der Thrombozyten. Durch die Sekretion von Inhaltsstoffen nimmt die Transparenz zu, die Bildung von Aggregaten bewirkt eine Abnahme der Lichtstreuung.



**Abb. 3.4:** Lichtmikroskopische Aufnahme der Plättchen 240 sek. nach erfolgter Aktivierung mit 0.075 U/ml Thrombin. (x 25)

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Bildung großer kompakter Aggregate. Um die Aggregate herum sind einzelne Thrombozyten zu erkennen (Abb. 3.4).

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Kontrollgruppe erkennt man, dass sich eine shape change mit Abrundung und der Ausbildung von Pseudopodien vollzogen hat. Es sind große kompakte Aggregate entstanden und die geringe Anzahl der Granula deutet auf eine Sekretion der Inhaltsstoffe hin. Die Lumina des OCS haben sich erweitert. Die wenigen freien Thrombozyten sind abgerundet, haben Pseudopodien ausgebildet und die Granula ausgeschüttet (Abb. 3.5).

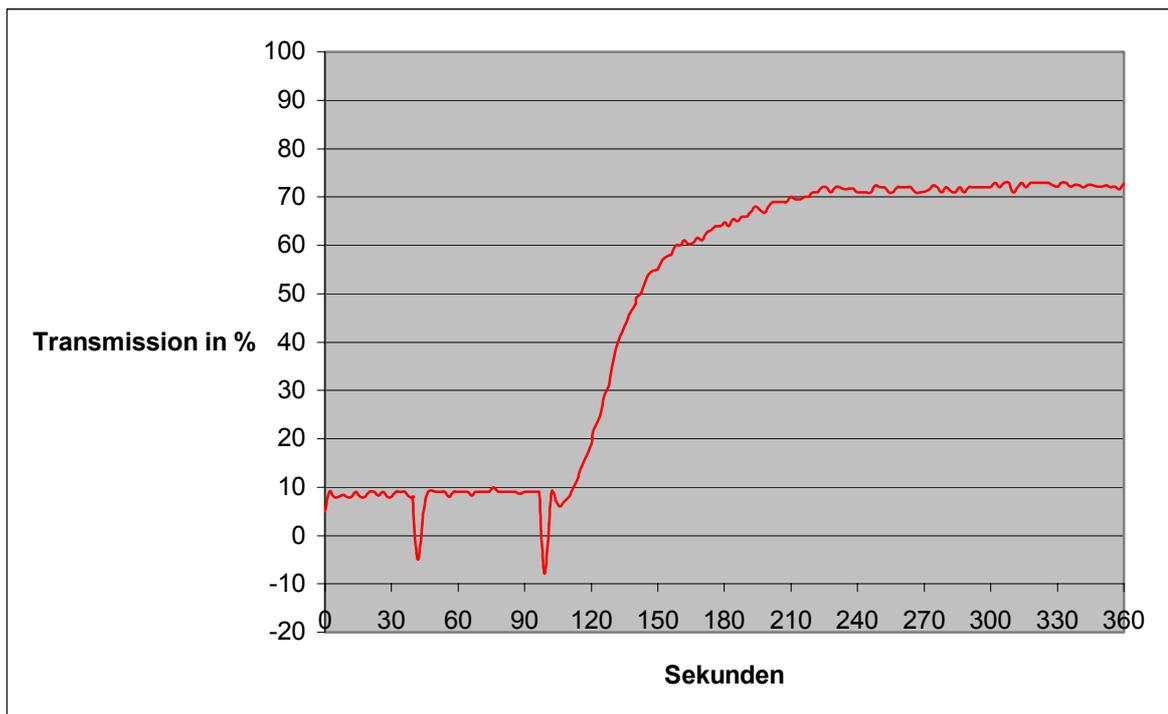


**Abb.3.5:** Elektronenmikroskopische Aufnahme der Plättchen 240 sek. nach erfolgter Aktivierung mit 0.075 U/ml Thrombin. (x 1950)

## Ansatz 2: Neopterin mit PRP

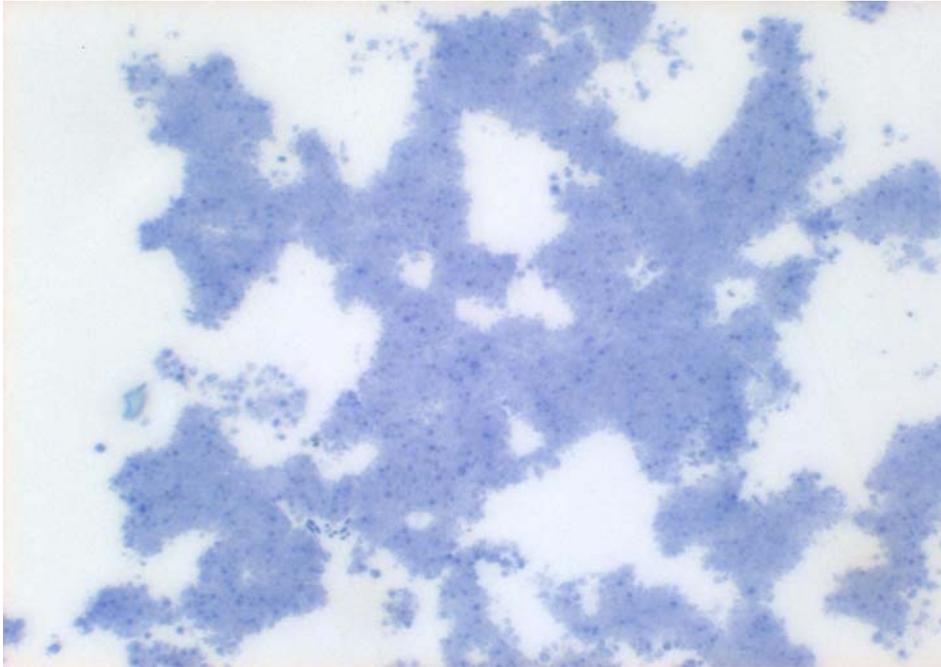
Der Verlauf der Transmissionskurve zeigt dieselben charakteristischen Merkmale wie die der Kontrollgruppe. Nach Einschalten des Magnetrührers ist der Rührsprung zu erkennen. Nach Calcium- und Thrombingabe, in der Kurve durch zwei negative Peaks nachzuweisen, fällt die Kurve leicht ab, um innerhalb von zwei Minuten auf ca. 70% exponentiell anzusteigen und horizontal weiter zu verlaufen. Dies lässt auf eine Aktivierung der Plättchen mit shape change, Sekretion und Aggregation schließen (Abb. 3.5).

Eine Änderung der Thrombin- beziehungsweise Neopterinkonzentration nimmt keinen Einfluss auf den Verlauf der Kurve.



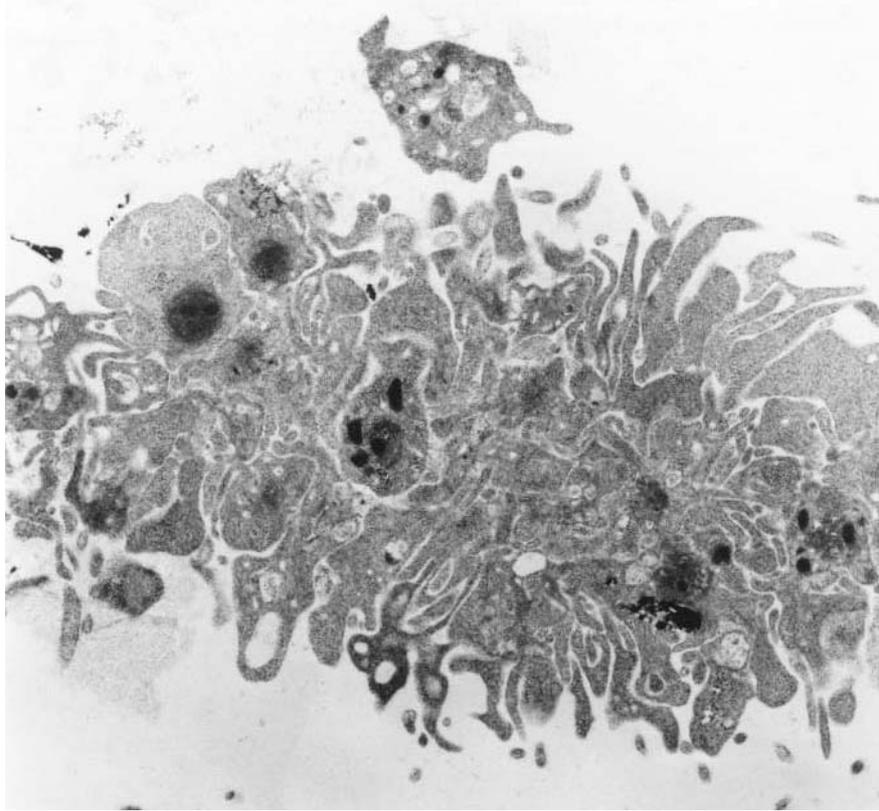
**Abb. 3.6:** Transmissionsverlauf im Aggregometer nach erfolgter Aktivierung mit 0,075 U/ml Thrombin. Die beiden negativen Peaks kennzeichnen die Calcium- bzw. Thrombingabe.

Unter dem Lichtmikroskop zeigt sich das Bild kompakter Aggregate mit nur wenigen freien Blutplättchen die sich zum größten Teil im Umkreis der Aggregate befinden (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7: Lichtmikroskopische Aufnahme der im PRP mit 80 nMol Neopterin inkubierten Plättchen 240 sek. nach erfolgter Aktivierung mit 0,075 U/ml Thrombin. (x 25)**

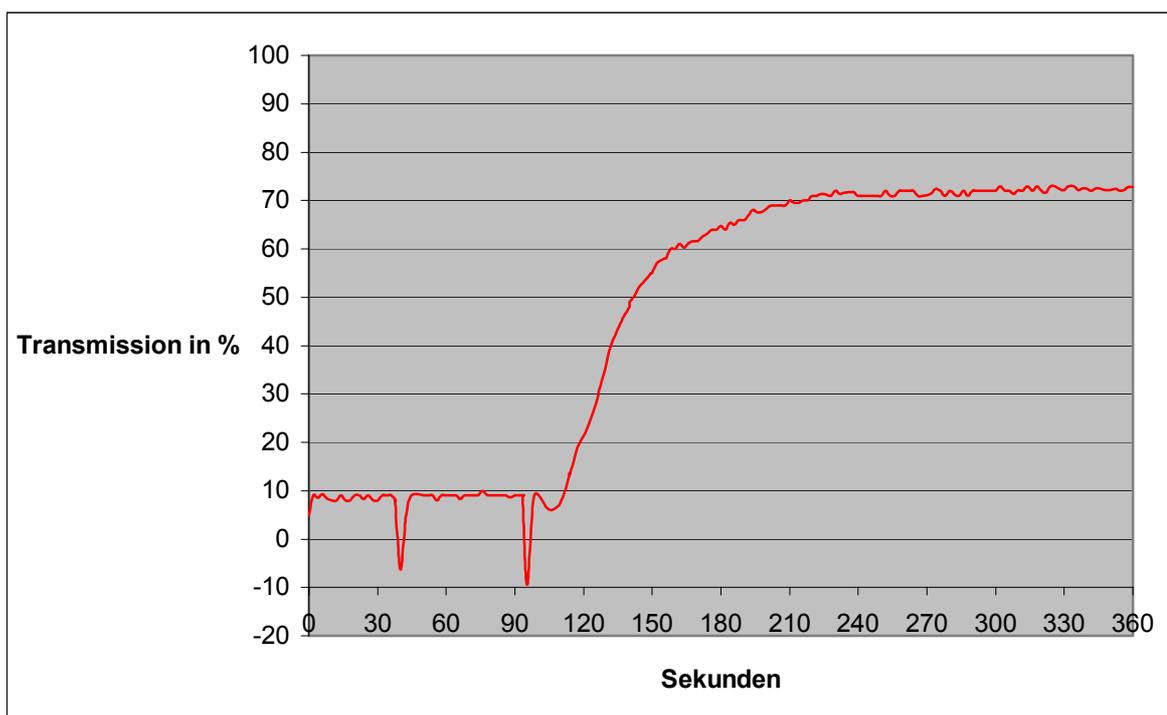
Im Elektronenmikroskop ist eine vollständigen Aktivierung der Thrombozyten zu erkennen. Es ist zur Shape change der Plättchen mit der Ausbildung von Pseudopodien gekommen. Die Plättchen haben dichte Aggregate gebildet und ihre Granula zum größten Teil ausgeschüttet. Es sind nur noch wenige freie Thrombozyten zu erkennen (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8:** Elektronenmikroskopische Aufnahme der im PRP mit 80 nMol Neopterin inkubierten Plättchen 240 sek. nach erfolgter Aktivierung mit 0,075 U/ml Thrombin. (x 1950)

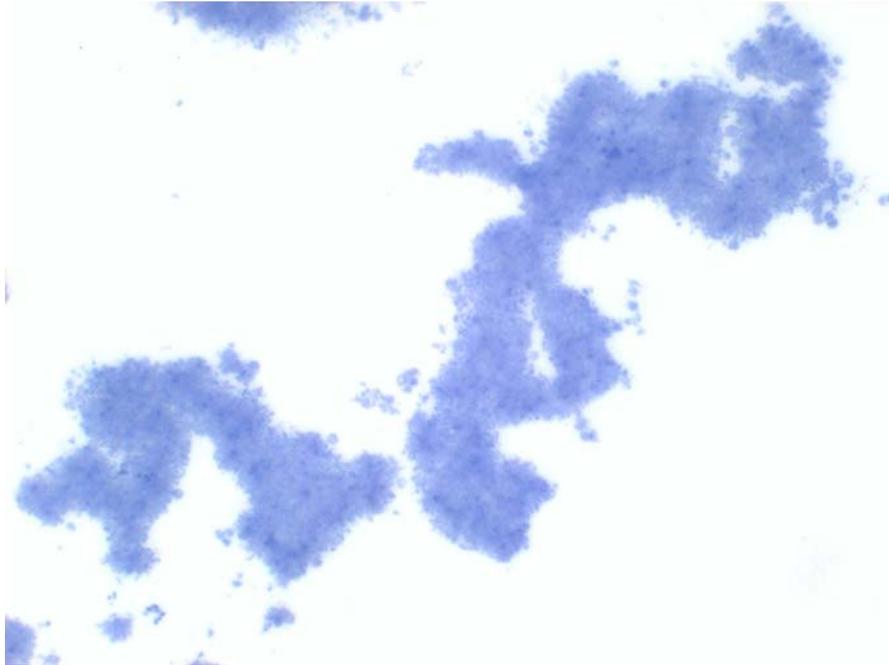
### Ansatz 3: Neopterin mit gewaschenen Plättchen

Auch die Blutplättchen, die erst nach den Waschvorgängen mit Neopterin inkubiert wurden, zeigen nach Aktivierung mit Thrombin einen aggregations-typischen Kurvenverlauf. Der durch die shape change erfolgende Transmissionsabfall ist ebenso zu sehen, wie der anschließende durch Sekretion und Aggregation gekennzeichnete Transmissionsanstieg (Abb. 3.9). Der Kurvenverlauf erreicht nach ca. zwei Minute mit knapp über 70% sein Maximum und verläuft danach horizontal weiter. Weder eine Änderung der Thrombin- noch der Neopterinkonzentration haben einen Einfluss auf den Verlauf der Transmissionskurve.



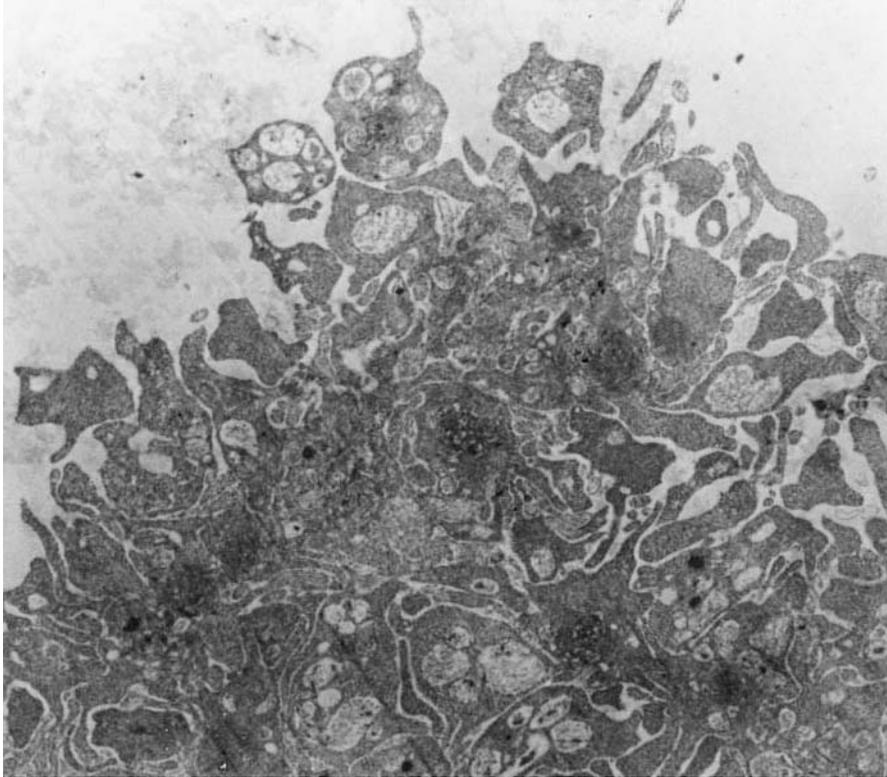
**Abb. 3.9:** Transmissionsverlauf im Aggregometer nach erfolgter Aktivierung mit 0,075 U/ml Thrombin. Die beiden negativen Peaks kennzeichnen die Calcium- bzw. Thrombin-gabe.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen lassen eine Aggregatbildung mit nur wenigen freien Blutplättchen erkennen (Abb. 3.10). Die entstandenen Aggregate sind groß und kompakt. Die freien Plättchen befinden sich in der unmittelbaren Umgebung der Aggregate.



**Abb. 3.10:** Lichtmikroskopische Aufnahme der nach den Waschvorgängen mit 80 nMol Neopterin inkubierten Plättchen 240 sek. nach Aktivierung mit 0,075 U/ml Thrombin. (x 25)

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Bildung von ausgeprägten Aggregaten (Abb. 3.11). Die Thrombozyten haben sich abgerundet und Pseudopodien ausgebildet. Ihre Granula sind zum Teil sezerniert und die Lumina des OSC haben sich erweitert.

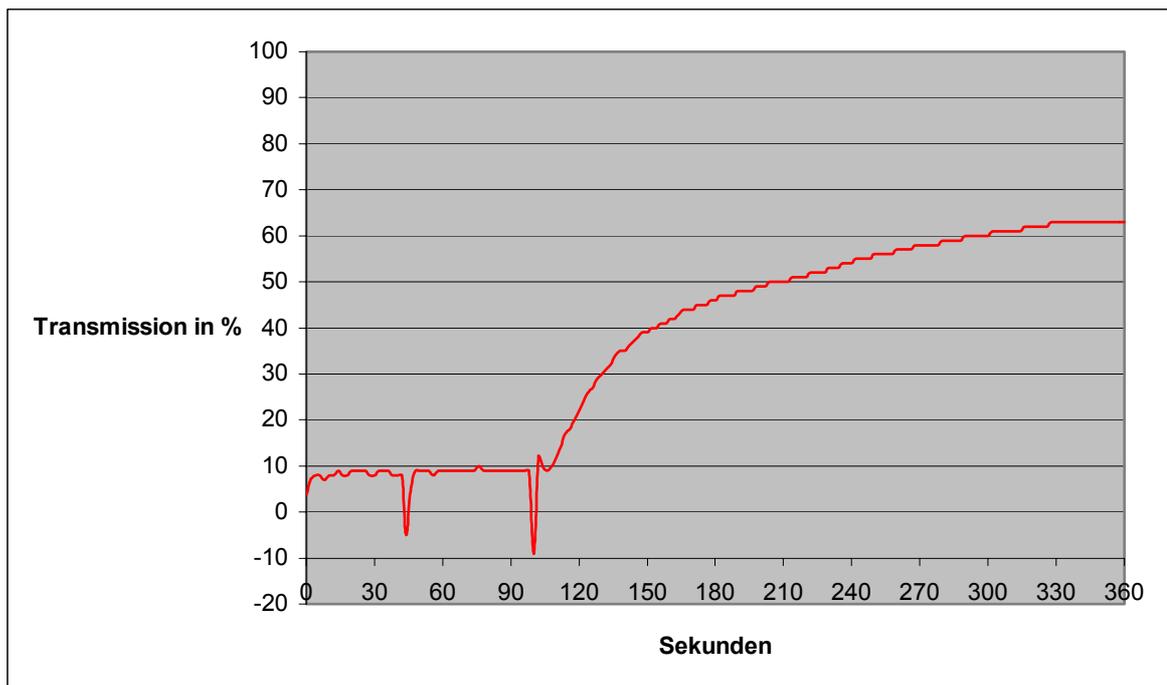


**Abb. 3.11: Elektronenmikroskopische Aufnahme der nach den Waschvorgängen mit 80 nMol Neopterin inkubierten Plättchen 240 sek. nach Aktivierung mit 0,075 U/ml Thrombin. (x 1950)**

### 3.3 Untersuchungen zum Zustand der Plättchen nach erfolgter Aktivierung mit Arachidonsäure

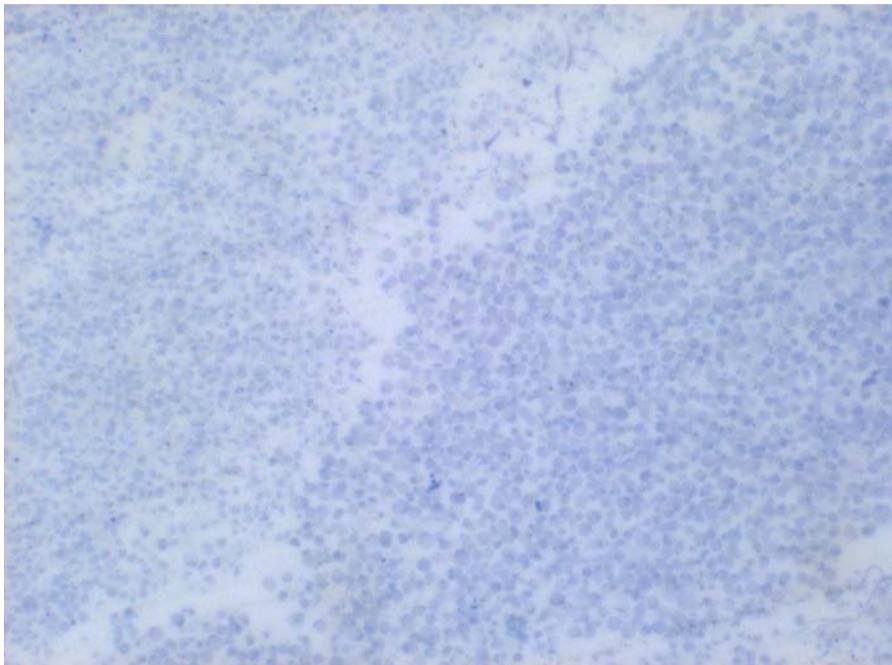
#### Ansatz 1: Kontrolle

Beim Einschalten des Magnetrührers ist ein deutlicher Rührsprung zu erkennen. Die Zugabe von 1mM Calcium führt, nach einem kurzen negativen Auschlag, zu einem leichten Anstieg der Transmission. Nach Aktivierung der Blutplättchen durch die Gabe von 150 $\mu$ M Arachidonsäure erfolgt die durch einen leichten Abfall der Kurve charakterisierte shape change. Anschließend steigt die Transmission innerhalb von einer Minute bis auf ca. 60% an.



**Abb. 3.11:** Transmissionsverlauf im Aggregometer nach erfolgter Aktivierung mit 250 $\mu$ M Arachidonsäure. Die beiden negativen Peaks kennzeichnen die Calcium- bzw. Arachidonsäuregabe.

Die Kurve sinkt, nachdem sie ihr Maximum erreicht hat, innerhalb von drei Minuten auf ca. 20% ab. Werden die Plättchen mit 200 $\mu$ M Arachidonsäure schließt sich der ersten Welle, nach einem kurzen Absinken der Kurve, eine zweite Welle der Aggregation an. Die Transmission erreicht einen maximalen Wert von ca. 60%. Bei einer Steigerung der Arachidonsäurekonzentration auf 250 $\mu$ M aktiviert, so sind die zwei Wellen nicht mehr zu erkennen. Die Kurve steigt kontinuierlich innerhalb von vier Minuten auf ca. 60% an (Abb. 3.11)

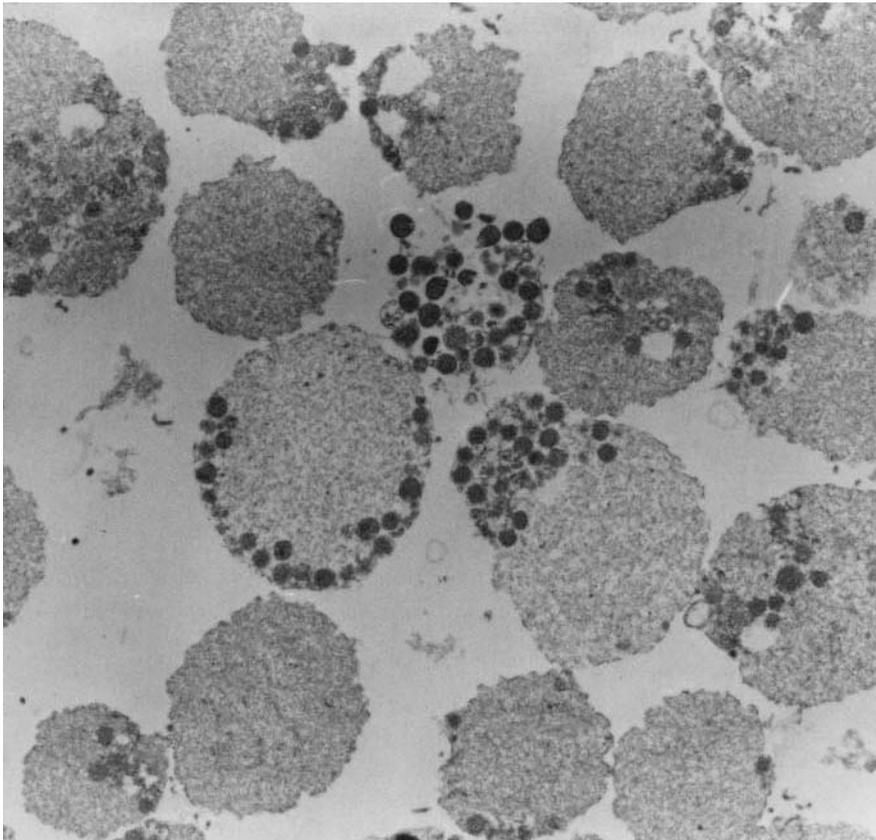


**Abb. 3.12: Lichtmikroskopische Aufnahme der nach den Waschvorgängen mit 80 nMol Neopterin inkubierten Plättchen 240 sek. nach Aktivierung mit 250 $\mu$ M Arachidonsäure. (x 25)**

Betrachtet man die mit dem Fotomikroskop erstellten Aufnahmen, so lässt sich feststellen, dass es nicht zur Bildung von Aggregaten gekommen ist (Abb. 3.12). Vielmehr liegen die Plättchen einzeln vor und scheinen sich, soweit beurteilbar, abgerundet zu haben.

Elektronenmikroskopisch erkennbar ist es zur Formveränderung gekommen, die sich in der Abrundung der Plättchen und der Bildung von Pseudopodien äußert.

Es haben sich keine Aggregate gebildet, die Plättchen liegen alle einzeln vor (Abb 3.12). Die Plättchenmembran hat sich zum größten Teil aufgelöst und es sind viele Zelltrümmer zu erkennen. Die Zellorganellen sind, abgesehen von den elektronendichten Granula in der Peripherie der Plättchen, nicht mehr erkennbar.

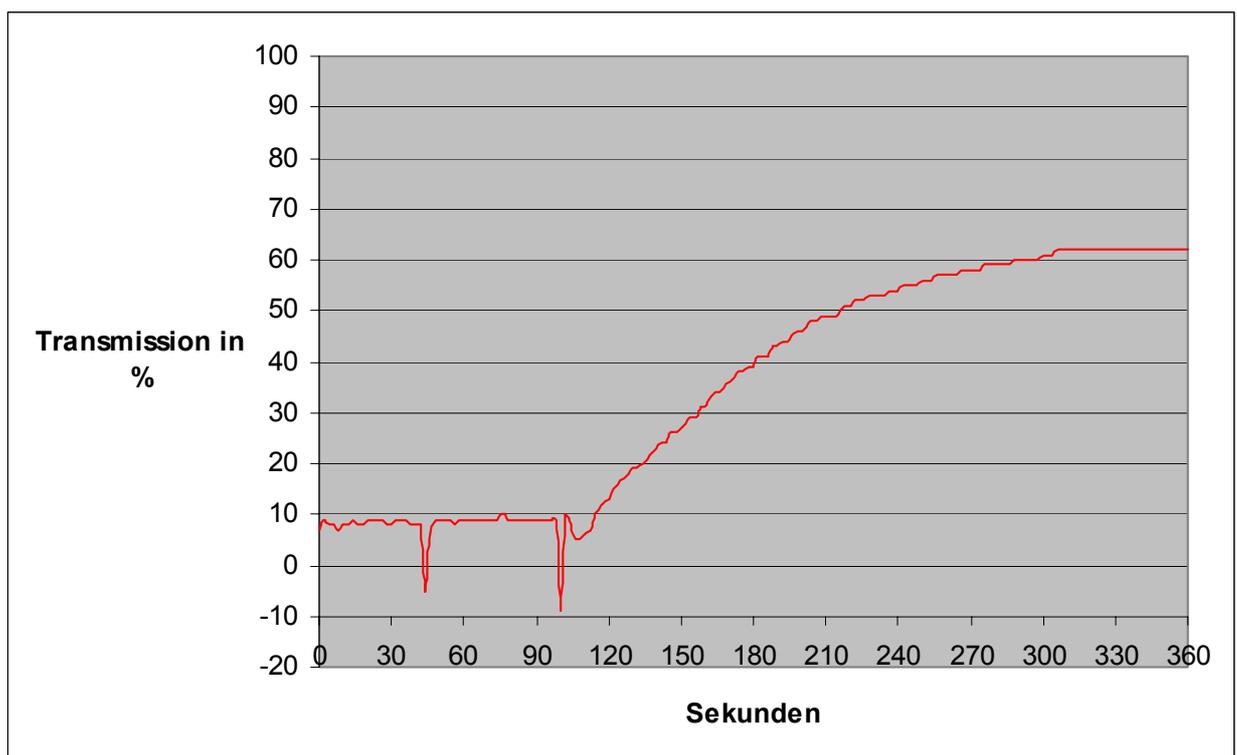


**Abb. 3.13: Elektronenmikroskopische Aufnahme der nach den Waschvorgängen mit 80 nMol Neopterin inkubierten Plättchen mit 250µM Arachidonsäure. (x 1950)**

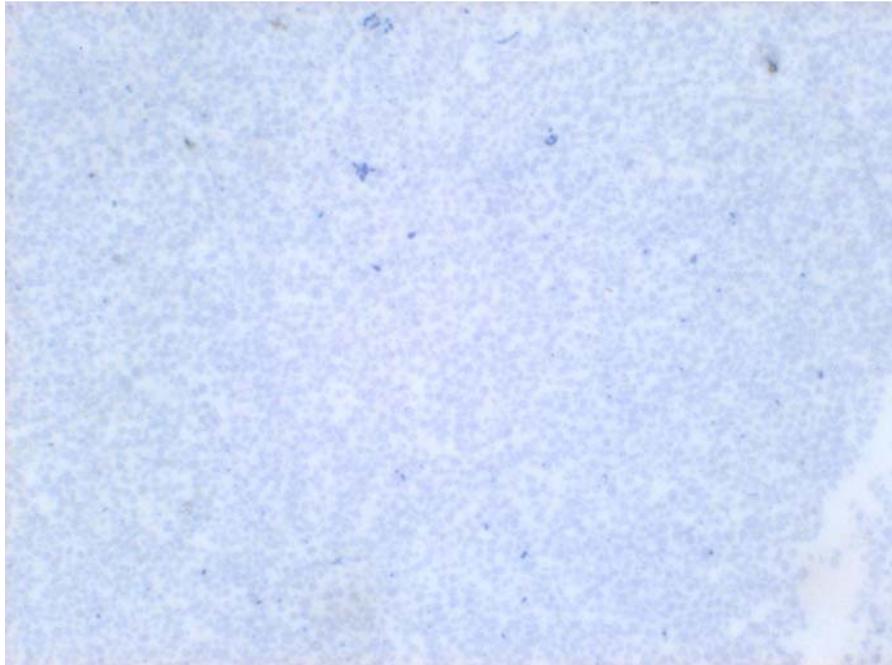
## Ansatz 2: Neopterin mit PRP

Das Einbringen von Calcium und Arachidonsäure ins plättchenreiche Plasma ist durch zwei kurzzeitige Peaks im Kurvenverlauf gekennzeichnet. Nach Gabe von 150 $\mu$ M Arachidonsäure kommt es, infolge der shape change der Plättchen, zu einem kurzfristigen Abfall der Kurve. Danach steigert sich die Lichttransmission in einer ersten Welle bis auf ca. 60%. Nachdem die Kurve ihr Maximum erreicht hat, sinkt sie bis ca. 20-30 % ab.

Nach Aktivierung der Plättchen mit 200 $\mu$ M bzw. 250 $\mu$ M Arachidonsäure steigt die Kurve kontinuierlich bis auf ca. 60% beziehungsweise 70% an. Im ersten Fall erreicht die Kurve nach fünf Minuten, nach Gabe von 250 $\mu$ M (Abb. 3.14) nach ca. vier Minuten ihr Maximum.



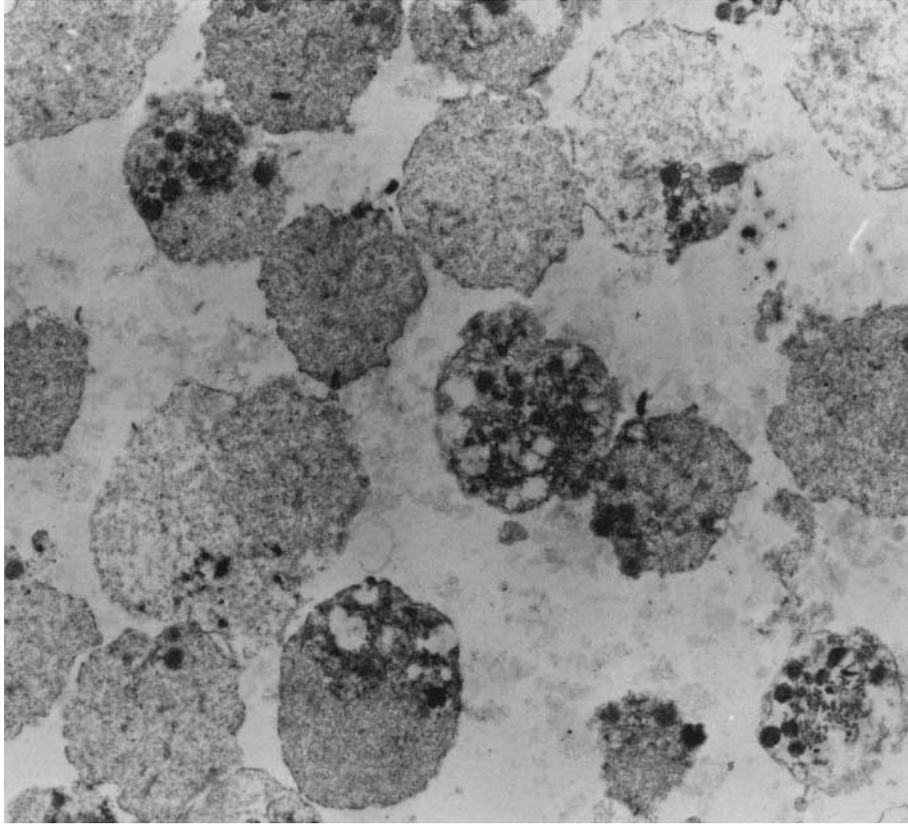
**Abb. 3.14:** Transmissionsverlauf im Aggregometer nach erfolgter Aktivierung mit 250 $\mu$ M Arachidonsäure. Die beiden negativen Peaks kennzeichnen die Calcium- bzw. Arachidonsäuregabe.



**Abb. 3.15: Lichtmikroskopische Aufnahme der nach den Waschvorgängen mit 80 nMol Neopterin inkubierten Plättchen 240 sek. nach Aktivierung mit 250 $\mu$ M Arachidonsäure. (x 25)**

Lichtmikroskopisch ist das Vorliegen einzelner Thrombozyten zu erkennen (Abb. 3.15). Es sind keine größeren Zellinseln entstanden.

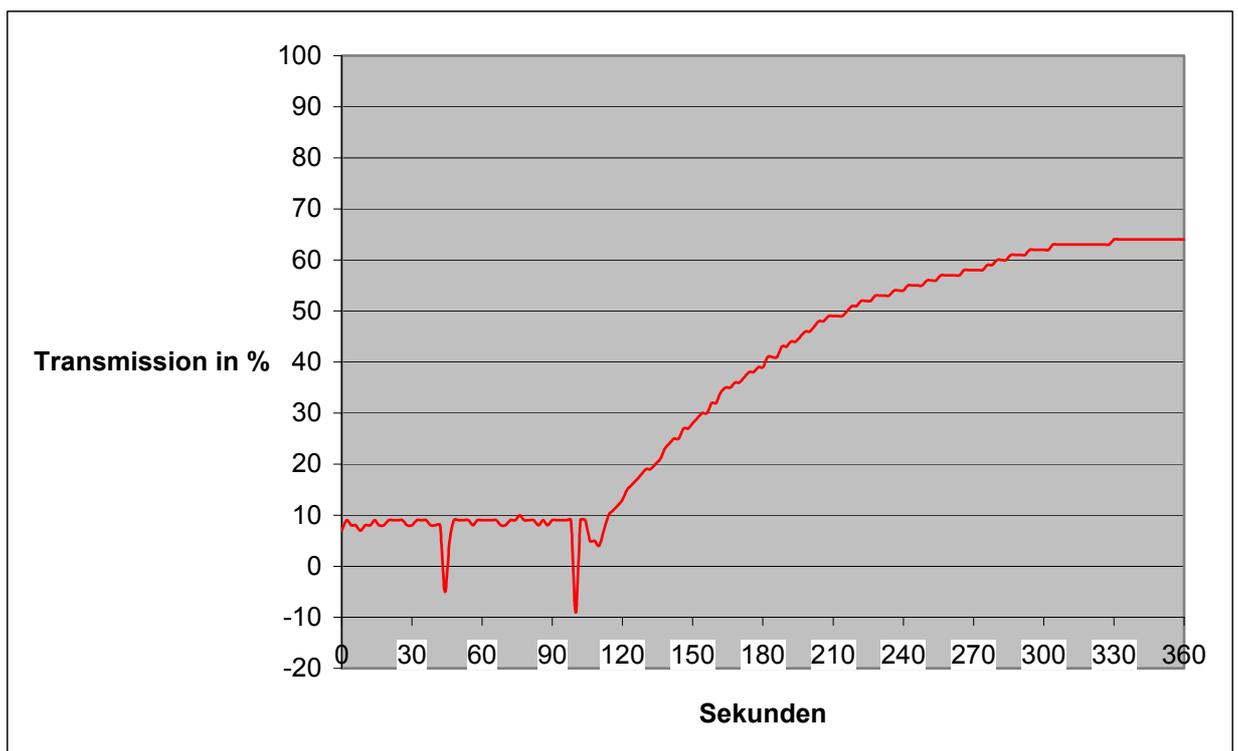
Deutlich elektronenmikroskopisch erkennbar ist es zur Lyse der Plättchen gekommen (Abb. 3.15). Die Membran ist nur noch zum Teil erhalten und es sind viele Zelltrümmer zu sehen. Die Plättchen haben sich abgerundet, eine Pseudopodienbildung ist nicht erkennbar. Es haben sich keine Aggregate gebildet, die Plättchen liegen alle frei vor. Zellorganellen sind nur noch undeutlich in einigen Plättchen zu sehen.



**Abb. 3.16:** Elektronenmikroskopische Aufnahme der nach den Waschvorgängen mit 80 nMol Neopterin inkubierten Plättchen 240 sek. nach Aktivierung mit 250 $\mu$ M Arachidonsäure. (x 1950)

### Ansatz 3: Neopterin mit gewaschenen Plättchen

Die beiden negativen Peaks kennzeichnen die Gabe des Calciums und der 250  $\mu\text{M}$  Arachidonsäure (Abb. 3.17). Sekunden nach der Zugabe der Arachidonsäure kommt es zu einem leichten Abfall der Kurve, die anschließend innerhalb von ca. vier Minuten bis auf ca. 60% ansteigt.

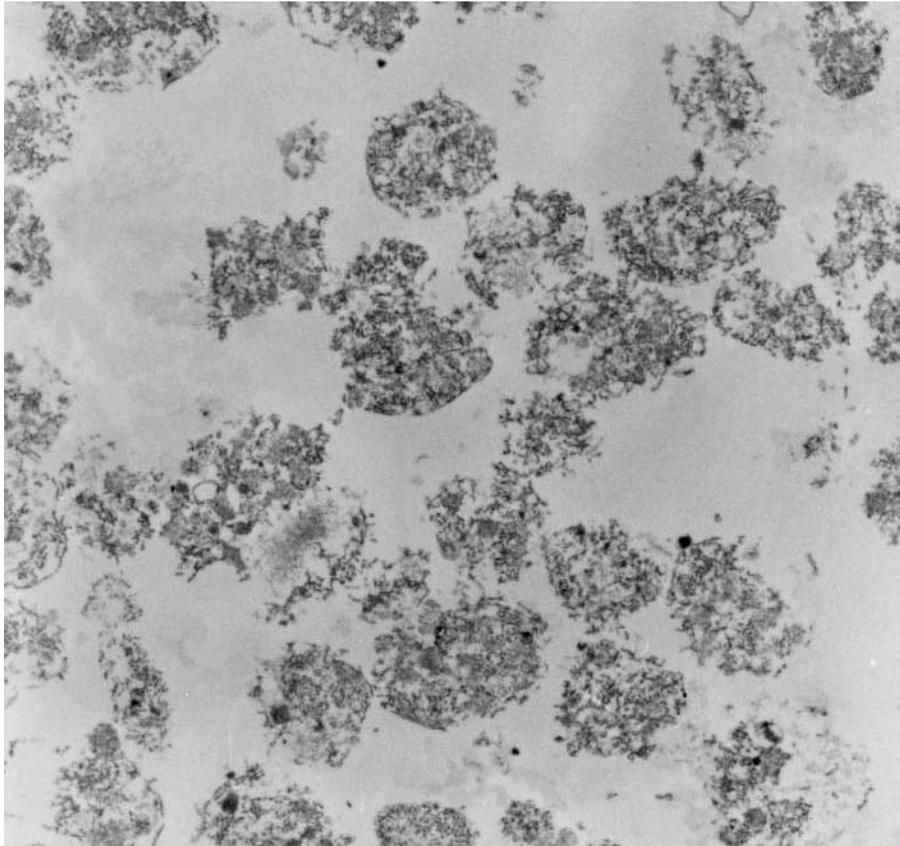


**Abb. 3.17: Transmissionsverlauf im Aggregometer nach erfolgter Aktivierung mit 250 $\mu\text{M}$  Arachidonsäure. Die beiden negativen Peaks kennzeichnen die Calcium- bzw. Arachidonsäuregabe.**



**Abb. 3.18: Lichtmikroskopische Aufnahme der nach den Waschvorgängen mit 80 nMol Neopterin inkubierten Plättchen 240 sek. nach Aktivierung mit 250 $\mu$ M Arachidonsäure. (x 25)**

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass sich die Plättchen abgerundet und zum Teil Pseudopodien ausgebildet haben (Abb. 3.19). Aggregate haben sich, soweit beurteilbar, nicht gebildet. Im Zytoplasma sind keine Zellorganellen sondern nur Trümmer erkennbar. Die Plättchenmembran hat sich aufgelöst.



**Abb. 3.19:** Elektronenmikroskopische Aufnahme der nach den Waschvorgängen mit 80 nMol Neopterin inkubierten Plättchen 240 sek. nach Aktivierung mit 250 $\mu$ M Arachidonsäure. (x 1950)

## 4. Diskussion

Diese Untersuchung leistet einen Beitrag zu der Frage, ob und inwieweit eine Inkubation von Blutplättchen mit Neopterin ihre Aktivierbarkeit durch Thrombin und Arachidonsäure beeinflusst.

### 4.1 Präparation der Blutplättchen

Zur Durchführung der Experimente der vorliegenden Arbeit werden Suspensionen von ruhenden, funktionell intakten Thrombozyten in einer proteinarmen und von anderen korpuskulären Blutbestandteilen weitgehend befreiten Lösung benötigt.

Die Methode zur Präparation der Plättchen ist die oft eingesetzte Waschmethode nach Patscheke (Patscheke 1981).

Bei einem sauren pH-Wert von 6,5 liegen die Plättchen inaktiv vor. Dieser pH-Wert wird mit dem Antikoagulant ACD eingestellt und während des gesamten Waschvorgangs aufrecht erhalten. Ein weiterer antikoagulierender Effekt des ACD ist die Komplexbildung mit Calcium, das ein wichtiger Faktor in der plasmatischen Gerinnung ist (Patscheke 1981).

Da die Thrombozytenpräparation bei Raumtemperatur erfolgt und die Abkühlung von physiologischen 37°C auf Raumtemperatur einen aktivierenden Effekt auf die Blutplättchen haben kann (Terres 1990, Nachmias et al 1985), wird diese Wirkung ebenfalls durch den sauren pH-Wert gehemmt. Die angewandte Methode von Patscheke bietet den Vorteil, dass alle Präparationsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt werden können. Die Anhebung des pH-Wertes in den physiologischen Bereich erfolgt erst wieder nach Erwärmung auf 37°C durch die Gabe der Waschlösung 4.

Der Zusatz von Apyrase zum PRP und in den Waschlösungen dient dem enzymatischen Abbau von ADP, das aus Erythrozyten freigesetzt werden kann und ein Plättchenagonist ist (Born 1962, 1970, Ollgaard 1961).

Bei den Zentrifugationsschritten entstehen Scherkräfte, die zu einer Aktivierung der Plättchen führen können (O'Brien 1990, O'Brien und Etherington 1996). Deshalb wird jeweils unmittelbar zuvor  $\text{PGE}_1$  hinzugefügt.  $\text{PGE}_1$  führt zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase, die den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht und so eine Hemmung der Plättchen erreicht (Mustard et al 1980, Siess 1989). Durch die kurze Wirkdauer des Prostaglandins ist seine Wirkung reversibel. Ein weiterer Nebeneffekt der Zentrifugation ist die mögliche ADP-Freisetzung aus den roten Blutkörperchen (Hensler et al 1992).

Bei den durchgeführten Methoden werden die Blutplättchen durch verschiedene Agentien in den Zustand verminderter Aktivierbarkeit versetzt. Durch die Zugabe der Waschlösungen wird nun stufenweise ein annähernd physiologisches Milieu wiederhergestellt, in dem sich die Reaktionsfähigkeit der Plättchen auf Stimuli regeneriert.

Zeichen für eine erfolgreiche Präparation der Thrombozyten ist das Vorliegen ruhender und funktionstüchtiger Plättchen nach den Waschvorgängen. Die Plättchen haben im ruhenden Zustand eine charakteristische oval-diskoide Zellform (Zucker 1980). Durch Aktivierung und ablaufende Aggregationsprozesse folgt die shape change der Thrombozyten. Es handelt sich dabei um eine Formveränderung, die sich in der Annahme einer rundlich-sphärischen Gestalt und der Ausbildung von Pseudopodien äußert (White 1974). Durch Stimulationsreize kann es schließlich zur Degranulation, zur Adhäsion und Aggregation der Plättchen untereinander kommen (Zucker 1980, Packham 1994).

Bei der Kontrolle der Thrombozyten nach den Waschvorgängen zeigt sich das typische Bild ruhender Plättchen. Sie besitzen eine oval-diskoide Form ohne Ausbildung von Pseudopodien. Sie liegen einzeln ohne Adhäsion oder Aggregation vor. Unter dem Elektronenmikroskop kann man die gleichmäßige Verteilung der Granula innerhalb der Plättchen sehen, die Lumina des OCS zeigen keine Erweiterungen.

In der Aggregationskurve zeigt sich nach Einschalten des Magnetrührers eine deutliche Steigerung der Lichttransmission, der so genannte Rührsprung. Das Phänomen des Rührsprungs lässt auf eine diskoide Form der Plättchen schlie-

ßen, die nach ihrer Ausrichtung im Rührerstrom eine geringere Streuung in der Suspension bewirken.

Die Präparation der Blutplättchen ist somit erfolgreich verlaufen.

## 4.2 Aktivierung und Hemmung von Blutplättchen

Die Aktivierung der Blutplättchen erfolgt durch zwei verschiedene Präparate, nämlich Thrombin und Arachidonsäure. Thrombin ist ein potenter physiologischer Agonist und führt über eine intrazelluläre Signalkaskade zur Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten (Packham 1994). Gewaschene Plättchen zeigen schon bei geringer Konzentration von 0,05 U/ml Reaktionen (Maschke 1991). Aus diesem Grunde werden Konzentrationen von 0,05U/ml, 0,075U/ml beziehungsweise 0,1U/ml gewählt. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Konzentrationen zu einer erfolgreichen Aktivierung der Blutplättchen führen.

Exogen zugeführte Arachidonsäure ist in der Lage, Thrombozyten zu aktivieren und Aggregation und Sekretion auszulösen, indem es von Blutplättchen aufgenommen wird und durch das Enzym Cyclooxygenase in Prostaglandin  $G_2$  und  $PGH_2$  gespalten wird. Thromboxansynthetase setzt die Endoperoxide dann zum größten Teil zu  $TxA_2$  um (Packham 1994).  $TxA_2$  ist ein wichtiger Aktivator der Blutplättchen. Wird die Freisetzungs- oder Aggregationsreaktion von Blutplättchen untersucht, so führt der Zusatz steigender Konzentrationen Arachidonsäure zu einer glockenförmigen, dosisabhängigen Kurve. Niedrige Konzentrationen steigern, hohe Konzentrationen wirken sich zunehmend hemmend auf diese Reaktionen aus (Fratantoni 1981). Zusätzlich können hohe Konzentrationen dosisabhängig zur Zellyse und zu einer Verflüssigung der Membran und so zu einer Hemmung der Plättchenantwort führen (Sato 1989, Fratantone 1981). Für diese Studie werden Konzentrationen von 150 $\mu$ M, 200 $\mu$ M und 250 $\mu$ M verwendet, die eine Aktivierung, allerdings auch eine partielle Lyse, der Thrombozyten induzieren.

Viele Faktoren und Substanzen wirken sich hemmend auf die Plättchenaktivierung aus. Als wichtiger Faktor gilt der Blutfluss, weshalb Veränderungen in der Gefäßwand, die zur lokalen Stase und so zur Konzentrierung von Plättchen und Gerinnungsfaktoren führen, als gefährlich einzustufen sind (Coller 1991, Goldsmith 1986).

Endothelzellen sind in der Lage, zwei potente Inhibitoren zu sezernieren, Prostazyklin und NO. Die physiologische Prostazyklinsynthese ist zu gering um die Plättchenaggregation zu beeinflussen, allerdings steigern aktivierte Endothelzellen ihre Produktion und auch aktivierte Plättchen sind in der Lage über einen Rezeptor-vermittelten Mechanismus die Prostazyklinsynthese zu erhöhen (Ware und Coller 1995). Prostazyklin steigert über das Enzym Adenylatzyklase die Produktion von cAMP, das die Funktion der Blutplättchen über verschiedene Mechanismen hemmt (Limbird 1988, Zavoico 1984). NO entsteht aus Arginin in stimulierten Endothelzellen, erhöht den cGMP-Spiegel und hemmt so die Adhäsion (Coller 1992).

Dass sich gewaschene Plättchen und das gewählte Untersuchungsmodell zum Nachweis inhibitorischer oder stimulierender Effekte verschiedener Substanzen auf ihre Aktivierung durch Thrombin und Arachidonsäure eignen, zeigten bereits verschiedene Arbeiten (Jandak et al 1989, Szuwart et al 2000, Pfenig 1995, Linder 1981, Dierichs 1993). So zeigte Dierichs, mit Hilfe des in dieser Arbeit gewählten Untersuchungsmodells, in seiner Studie aus dem Jahre 1993, dass  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) einen hemmenden Einfluss auf die Aktivierbarkeit gewaschener Thrombozyten durch Thrombin hat. In einer anderen Studie aus dem Jahre 1993 stellten Zhao et al einen stimulierenden Einfluss von LDL auf die Aktivierung von Plättchen durch Thrombin fest (Zhao 1993).

## 4.3 Aggregometermessungen und mikroskopische Befunde

Zur Auswertung der Versuche werden drei Verfahren verwendet:

- 1.) photometrisch: Aggregometermessung
- 2.) mikroskopisch: Lichtmikroskop
- 3.) ultrastrukturell: TEM

### 4.3.1 Aggregometermessungen

Die photometrische Messung der Thrombozytenaggregation nach Aktivierung mit einem Agonisten geht auf Aggregometermessungen zurück, die erstmals von Born 1960 beschrieben wurden. Die Aggregometermessungen dienen in dieser Arbeit als Kontrolle für die Qualität der präparierten Thrombozyten und der Überprüfung der Thrombozytenaktivierung nach Zugabe von Thrombin beziehungsweise Arachidonsäure.

Aktivierungs- und Aggregationsprozesse führen zu Formveränderungen der Blutplättchen, die morphologisch fassbar sind (White 1974). Diese morphologischen Veränderungen werden im Aggregometer durch eine Änderung der Lichttransmission sichtbar. Die bei der Formation von Plättchenaggregaten vom Aggregometer aufgezeichneten Kurven variieren entsprechend dem verwendeten Agonisten und seiner Konzentration. Allen Agonisten, mit Ausnahme von Epinephrin, ist gemeinsam, dass aufgrund der shape change der Blutplättchen, die von der diskoiden zu einer stachelig sphärischen Form führt, eine Abnahme der Lichttransmission erfolgt. Hingegen führen die folgende Aggregation und Sekretion zu einem Transmissionsanstieg (Gear 1994, Zucker und Nachmias 1985, Milton und Frojmovic 1983). Dieser Anstieg der Lichttransmission äußert sich durch zwei „Wellen“, die die Plättchenaggregation beschreiben (Charo 1977). Die erste Welle repräsentiert die primäre reversible Aggregation, die nicht mit einer Sekretion von Inhaltsstoffen verbunden ist. Die zweite Welle, die sekundäre Aggregation, entsteht aufgrund der Bildung großer irreversibler

Plättchenaggregate. In dieser Phase tritt auch die Sekretion der Inhaltsstoffe auf. Ist die Konzentration des Plättchenagonisten ausreichend hoch, verschmelzen die beiden Wellen zu einer einzelnen kontinuierlichen Kurve.

So lässt die Aggregometrie Rückschlüsse auf die Aktivierungszustände von Thrombozyten, die sich in shape change, der Aggregation und Sekretion äußern, zu. Anhand der bei der Messung aufgezeichneten Kurven kann nun nach erfolgter Aktivierung der Transmissionsverlauf der mit Neopterin inkubierten Plättchensuspension mit einer Kontroll suspension verglichen und somit der Aktivierungsprozess beurteilt werden. Durch eine Aktivierung bedingte morphologische Veränderungen der Plättchen, sowie die Bildung von Aggregaten und die Sekretion von Inhaltsstoffen, führen zu einer erhöhten Transmission und somit zu einem Anstieg der Aggregometerkurve.

Der Verlauf der Aggregometerkurven spricht dafür, dass nach erfolgter Thrombingabe eine shape change der Plättchen innerhalb weniger Sekunden eingetreten ist. Dies ist deutlich an einem kurzfristigen Transmissionsabfall zu erkennen. Ursächlich hierfür sind die Entstehung der sphärischen Gestalt und die Ausbildung von Pseudopodien (Zucker und Zaccardi 1964, MacMillan und Oliver 1965).

In Gegenwart von Calcium erfolgt bei Zell-Zell-Kontakt eine Aggregation der Thrombozyten und eine Sekretion ihrer Granula. Hieraus entsteht ein Transmissionsanstieg, der in Gegenwart von 0,05 U/ml Thrombin nach ca. zwei Minuten sein Maximum erreicht. Diese Merkmale sind nach der Aktivierung mit Thrombin bei den mit Neopterin inkubierten Blutplättchen als auch bei der Kontrollgruppe zu erkennen. Aus den Aggregometerkurven ist folglich kein Einfluss von Neopterin auf die Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin ersichtlich.

Die Aktivierung durch Arachidonsäure führt zu einem im Vergleich zur Thrombinaktivierung insgesamt langsameren Anstieg und flacheren Verlauf der Transmissionskurve. Aktivierung mit 150µM Arachidonsäure führt zur Bildung primärer Aggregate, die sich in der Folge lösen. Dies äußert sich im Kurvenverlauf durch eine erste Welle der primären Aggregation und anschließendem Abfall aufgrund der durch Auflösung der Aggregate bedingten sinkenden Licht-

transmission. Die Steigerung der Konzentration führt zu einem langsamen, kontinuierlichen Anstieg der Lichttransmission, der nicht charakteristisch ist für eine vollständige Aktivierung mit Bildung sekundärer irreversibler Aggregate. Die erreichten Transmissionswerte entsprechen denen früherer Studien (Sato 1989, Linder 1981). Die Kontrollgruppe zeigt dieselben Charakteristika, so dass ein direkter Einfluss von Neopterin auf die Aktivierung der Blutplättchen mit Arachidonsäure durch die Aggregometermessungen nicht nachweisbar ist.

#### 4.3.2 Lichtmikroskopie

Die Lichtmikroskopie als Mittel zur Darstellung von Thrombozyten wird orientierend angewandt. So lässt sich beurteilen, wie sich die entstandenen Aggregate in der Übersicht darstellen.

Die schwache Anfärbung der mit Arachidonsäure aktivierten Blutplättchen ist auf die ausgeprägte Zellyse zurückzuführen. Die Schnitte der mit Thrombin aktivierten Blutplättchen zeigen eine erfolgreiche Aktivierung mit der Bildung großer kompakter Aggregate. Es lassen sich keine Unterschiede zwischen den mit Neopterin inkubierten Plättchen und der Kontrollgruppe und somit keine Wirkung des Neopterins auf die Aktivierung feststellen. Die Ergebnisse der mit Arachidonsäure aktivierten Blutplättchen bestätigen die Aggregometermessungen mit dem Ausbleiben sekundär irreversibler Aggregate. Es ist durch die Aktivierung lediglich zur shape change im Sinne einer Abrundung gekommen.

Die Tatsache, dass die Kontrollgruppe identisch erscheint, lässt einen fehlenden Einfluss des Neopterins ableiten.

### 4.3.3 Elektronenmikroskopie

Mit dem Elektronenmikroskop lässt sich die Ultrastruktur der Thrombozyten beurteilen. Ruhende Plättchen haben eine diskoide Form ohne Pseudopodienbildung. Werden die Plättchen aktiviert, kommt es zur Änderung der diskoiden Form in eine sphärische. Diese „shape change“ geht einher mit der Ausbildung fingerförmiger Ausstülpungen der Zellmembran, die als zytoplasmatische Fortsätze oder auch Pseudopodien bezeichnet werden (Deranleau 1987, Patscheke 1980).

Auch die Zellorganellen lassen elektronenmikroskopisch Veränderungen erkennen. Durch Aktivierung kommt es zu einer Zentralisation der Granula, und es erscheint am Rand der Plättchen ein heller Hyaloplasmasaum. Durch die Zusammenballung der Organellen wird das Zentrum der Plättchen elektronendichter (Ruzicka 1976). Mit fortschreitender Aktivierung kommt es im Zuge der Bildung sekundär irreversibler Aggregate zur Sekretion (Degranulation), die sich in der Verringerung der dense bzw.  $\alpha$ -Granula im Zellinnern äußert (Ruzicka 1976). Die gespeicherten Inhaltsstoffe werden über das OCS ins Plasma ausgeschüttet (White 1984). Das OCS zeigt ein erweitertes Lumen. Diese im Elektronenmikroskop als Aufhellungen erscheinenden Strukturen beinhalten teilweise wenig elektronendichtes Material. Die mit der Sekretion einhergehende sekundär irreversible Aggregation ist durch eine intensive Verzahnung von Pseudopodien gekennzeichnet.

Bei den mit Thrombin aktivierten Plättchen finden sich auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen alle diese Merkmale wieder. Es ist also eine vollständige Aktivierung der Thrombozyten mit Bildung sekundär-irreversibler Aggregate und einhergehender Sekretion der Granula eingetreten. Es ist kein Unterschied zwischen den mit Neopterin inkubierten Plättchen und der Kontrollgruppe zu erkennen. Es macht auch keinen Unterschied, ob sie im PRP oder nach den Waschvorgängen inkubiert wurden.

Die mit Arachidonsäure aktivierten Plättchen weisen Unterschiede auf. So kommt es nicht zur Bildung von Aggregaten, die Membran der Plättchen wird

zerstört und es finden sich viele Zelltrümmer. Es kommt zur shape change der Thrombozyten, die sich abrunden und teilweise Pseudopodien ausbilden. Dies spricht für eine zumindest unvollständige Aktivierung der Plättchen. Da sich die nicht mit Neopterin inkubierte Kontrollgruppe in der Übersicht identisch darstellt, ist dieser Effekt nicht auf den Einfluss des Neopterins zurückzuführen. Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, können hohe Arachidonsäurekonzentrationen zu Schäden an Thrombozyten führen. Die unphysiologisch hohe Konzentration der Arachidonsäure verursacht vermutlich die Verflüssigung und Lyse der Plättchenmembran. Ein inhibitorischer Einfluss von Neopterin auf die Plättchenaktivierung lässt sich somit nicht feststellen.

#### 4.4 Neopterin

Neopterin gehört zur Klasse der Pteridine und leitet sich biochemisch von Guanosintriphosphat ab. Interferon- $\gamma$  ist der zentrale Stimulus zur Aktivierung der GTP Cyclohydrolase, die das Purin zu 7,8-Dihydroneopterintriphosphat spaltet. Dieses Zwischenprodukt wird in den meisten Zellen, wie Fibroblasten oder Endothelzellen, durch das Enzym 6-Pyruvoyl-Tetrahydropterin-Synthase in Tetrahydrobiopterin umgewandelt. Aufgrund eines relativen Mangels des Enzyms in Monozyten und Makrophagen kommt es nach Aktivierung der GTP Cyclohydrolase I zu einer Anhäufung von 7,8-Dihydroneopterintriphosphat auf Kosten von Tetrahydrobiopterin. 7,8 Dihydroneopterintriphosphat wird durch Hydrolyse und Oxidation in Neopterin umgewandelt (Vrecko 1997, Millner 1998, Müller 1991).

Die Erhöhung der Neopterinkonzentration ist ein Zeichen für eine Aktivierung des Immunsystems. Monozyten und Makrophagen sind die Hauptquelle und geben das Neopterin an die Körperflüssigkeiten ab (Ziegenhagen 1997, Werner 1987, Katoh 1989). Neopterin zeigt außerdem verschiedene biochemische Funktionen über Wechselwirkungen mit zellulären Redoxmechanismen und der Förderung von oxidativem Stress. So wurde gezeigt, dass Neopterin die Toxizität gegenüber Bakterien steigert und die Apoptose bestimmter Zelltypen fördert

(Murr 1994, Hoffmann 1998). Bekanntermaßen hemmt oxidativer Stress intrazelluläre Ca-Kanäle verschiedener Zelltypen (Agostinho 1997). So wurde bereits eine direkte hemmende Wirkung von Neopterin auf die ATP-induzierte Calciumfreisetzung von Lungen-epithelzellen nachgewiesen (Hoffmann 2002). Dieser Umstand würde bei Blutplättchen zu einer Herabsetzung ihrer Aktivierungsfähigkeit führen.

Es ist bekannt, dass eine funktionelle Kopplung zwischen dem thrombozytären Anteil des Gerinnungssystems und Leukozyten besteht. So kann der „platelet activating factor“, PAF, ein im Zuge des Aktivierungsprozesses synthetisiertes Phospholipidderivat, auch von aktivierten Leukozyten an die Umgebung abgegeben werden (Chignard 1979). Andere Arbeiten beschreiben eine antiaggregierende Wirkung von Leukozyten auf Blutplättchen (Salvemini 1989, Nicolini 1990). Der PAF aktiviert nicht nur Thrombozyten, sondern wirkt auch chemotaktisch und phagozytoseaktivierend auf neutrophile Granulozyten und Makrophagen. Er ist also ein Thrombozytenaktivator, der gleichzeitig als Entzündungsmediator dient. Vielleicht wirkt Neopterin in ähnlicher Weise, also als Entzündungsmediator und, im Gegensatz zum PAF, als Thrombozytenhemmer.

Anwaar et al. untersuchen in ihrer Studie aus dem Jahre 1998 einen möglichen Zusammenhang zwischen der vasodilatatorischen und vasokonstriktiven Funktion des Endothels und leukozytären Entzündungsmediatoren bei Patienten mit Arteriosklerose (Anwaar et al. 1998). Diese Arbeit unterstützt die These eines möglichen antiaggregierenden Effektes von Leukozyten beziehungsweise der von ihnen sezernierten Entzündungsmediatoren. So wurde in der genannten Studie gezeigt, dass erhöhte Neopterinwerte im Blut mit einem Anstieg von cGMP und cAMP einhergehen.

Dies reflektiert den Zusammenhang in der Biosynthese von Stickstoffmonoxid und Neopterin. Der Zusammenhang erklärt sich durch die Tatsache, dass Tetrahydrobiopterin, ein Produkt der Pteridinsynthese, ein essentielles Coenzym der NO-Synthase ist. Stickstoffmonoxid, der sogenannte Endothelium-derived-relaxing-factor, ist ein kurzlebiges Abbauprodukt von Arginin. Es stimu-

liert die Guanylatzyklase in Plättchen, deren Aktivierung zu einer Erhöhung von cGMP führt.

Prostazyklin ist ein Abbauprodukt der Arachidonsäure und wird aus Endothelzellen freigesetzt. Es wirkt vasodilatierend. Prostazyklin stimuliert die Adenylatzyklase und erhöht so die Bildung von cAMP, das über verschiedene Mechanismen an der Hemmung von Blutplättchen beteiligt ist. cGMP und cAMP sind second messenger, die u. a. Arachidonsäure aus Membranen freisetzen. Beide wirken hemmend auf Blutplättchen.

Ergebnisse früherer Studien zeigen verschiedene Mechanismen auf, die die Wirkung von Leukozyten auf Blutplättchen erklären könnten. Blutplättchen besitzen eine NO-Synthase und sind so selbst in der Lage, Stickstoffmonoxid und cGMP zu bilden (Mehta 1995). Leukozyten könnten durch ihre Mediatoren, zum Beispiel Neopterin, die Synthese von cGMP durch Stickstoffmonoxid in Blutplättchen stimulieren, wie es auch in Endothelzellen geschieht (Werner-Felmayer 1993). Ein weiterer möglicher Mechanismus wäre eine Wirkung leukozyitärer Entzündungsmediatoren auf Rezeptoren vaskulärer Endothelzellen. Dies könnte zu einer Freisetzung von Stickstoffmonoxid (Moncada 1993) und Prostazyklin (Dinerman 1990) führen, die ihrerseits einen Anstieg von cGMP und cAMP in zirkulierenden Blutplättchen auslösen würden.

Zur Beurteilung einer direkten Wirkung des Neopterin auf die Aktivierungsfähigkeit der Thrombozyten werden zwei Versuchsansätze gewählt. Einerseits wird das Neopterin zu den gewaschenen Plättchen gegeben, also in eine proteinarme und von anderen korpuskulären Blutbestandteilen befreite Lösung. Andererseits wird in einem zweiten Versuchsansatz das Neopterin bereits in das plättchenreiche Plasma gegeben, um zu untersuchen, ob die im Plasma gelösten Substanzen, wie zum Beispiel Fibrinogen oder andere Proteine, einen Einfluss auf die Wirkung von Neopterin auf Thrombozyten haben. Um zeigen zu können, ob konzentrationsabhängige Veränderungen auftreten, werden verschiedene Konzentrationen des Neopterin, nämlich 20, 40, 80 beziehungsweise 160nMol gewählt.

In unseren Versuchen kann kein Einfluss des Neopterin auf die Aktivierung der Blutplättchen in vitro nachgewiesen werden.

#### 4.5 Abschluss und Ausblick

Inhalt der Arbeit ist die erstmalige Untersuchung des Einflusses von Neopterin auf die Aktivierbarkeit gewaschener Thrombozyten. Die verwendete Waschmethode nach Patscheke eignet sich zur Gewinnung von Suspensionen inaktiver Plättchen in einer proteinarmen Lösung. Da Blutplättchen durch Scherkräfte während der Zentrifugation, durch fehlende Strömung in den Lösungen, Abkühlung auf Raumtemperatur, freiwerdendes ADP aus zerfallenden Erythrozyten und Konzentrationsänderungen bei der Zugabe von Waschlösungen aktiviert werden können, wurden sie während des gesamten Waschvorgangs reversibel gehemmt.

Die Blutplättchen wurden vor beziehungsweise nach den Waschvorgängen mit Neopterin inkubiert und im gewaschenen Zustand mit Thrombin und Arachidonsäure aktiviert. Die Auswertung der Versuche erfolgte mit Hilfe der Aggregometrie, der Lichtmikroskopie und der Elektronenmikroskopie. Mit diesen Verfahren konnte die funktionelle Morphologie der Blutplättchen nach erfolgter Aktivierung beurteilt werden.

Die Ergebnisse zeigen keine Zeichen einer Veränderung der Aktivierungsfähigkeit von Blutplättchen unter dem direkten Einfluss von Neopterin in vitro. Die Aktivierung mit Thrombin weist alle Merkmale einer vollständigen Aktivierung, resultierend in der Bildung kompakter Aggregate, auf. Die Gabe unphysiologischer Mengen Arachidonsäure hatte starke Zelllyse zur Folge, doch führte auch sie zur Aktivierung der Blutplättchen.

Die Ergebnisse waren unabhängig von den verschiedenen gewählten Neopterinkonzentrationen. Die gemachten Beobachtungen waren identisch mit der nicht mit Neopterin inkubierten Kontrollgruppe. Eine Inkubation der Blutplättchen mit Neopterin, sei es im PRP oder in gewaschenem Zustand, hatte keinen nachweisbaren Effekt auf die Aktivierung mit Thrombin oder Arachidonsäure.

Dies schließt einen Zusammenhang zwischen Neopterin und der Aktivierbarkeit von Thrombozyten nicht aus. Vielmehr stellt diese Studie den Anfang für weiterführende Untersuchungen zu diesem Thema dar. Es wird Gegenstand weiterer Studien sein müssen, die aufgezeigten Theorien zu untersuchen und eine etwaige Verbindung zwischen Neopterin und dem thrombozytären Gerinnungssystem herstellen zu können.

## **5. Literaturverzeichnis**

1. Anwaar I, Gottsäter A, Hedblad B, Palmqvist B, Mattiasson I, Lindgärde F (1998) Endothelial derived vasoactive factors and leukocyte derived inflammatory mediators in subjects with asymptomatic atherosclerosis. *Angiology* 49: 957-966.
2. Asaoka Y, Nakamura S, Nishizuka Y (1993) Intracellular signaling by phospholipid hydrolysis and protein kinase C activation. *Bio-medical Research* 14: 93-98.
3. Barnhart MI, Walsh T, Robinson JA (1972) A three-dimensional view of platelet responses to chemical stimuli. *Annuary of the New York Academy of Science* 201: 360-390.
4. Blockmans D, Dechmyn H, Vermylen J (1995) Platelet Activation. *Blood Reviews* 9: 143-156.
5. Born GVR (1962) Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and his reversal. *Nature* 194: 927-929.
6. Born GVR (1970) Observations on the change in shape of blood platelets brought about by adenosine diphosphate. *J Physiol Lond* 209: 487-511.
7. Brass LF, Hoxie JA, Manning DR (1993) Signaling through G proteins and G protein-coupled receptors during platelet activation. *Thrombosis And Hemostasis* 70: 217-223.
8. Brown RR, Lee CM, Kohler PC, Hank JA, Storer BE, Sondel PM (1989) Altered tryptophan and neopterin metabolism in cancer patients treated with recombinant interleukin 2. *Cancer Res* 49: 4941-4944.
9. Charo IF, Feinman RD, Detwiler TC (1977) Interrelations of platelet aggregation and secretion. *J Clin Invest* 60: 866.

10. Chignard M, LeCouedic JP, Tence M, Vargaftig BB, Benveniste J (1979) The role of platelet activating factor in platelet aggregation. *Nature* 279: 799-800.
11. Coller BS (1991) Platelets in cardiovascular thrombosis and thrombolysis. *The Heart and Cardiovascular System*, 2d ed, edited by FOZZARD HA, Haber E, Jenings RB, Katz AM, Morgan HE, 219-274.
12. Deranleau DA (1987) Blood platelets shape change ABCs. *Trends Biochemical Science* 12: 439-442.
13. Diamondstone L, Tollerud DJ, Fuchs D, et al (1994) Factors influencing serum neopterin and  $\beta$ 2-microglobulin levels in a healthy diverse population. *Journal of Clinical Immunology* 14: 368-374.
14. Dierichs R, Maschke U (1993) Effects of  $\alpha$ -tocopherol (Vitamin E) on the ultrastructure of human platelets in vitro. *Platelets* 4: 129-134.
15. Dierichs R, Ahonen-Sann R, Marquardt T (1992) The influence of the microtubule-acting drug, Nocodazole, and the ATP-depleting system, Desoxyglucose-dinitrophenol, on the functional morphology of human platelets. *Platelets* 3: 255-263.
16. Dinerman JL, Mehta JL (1990) Endothelial, platelet and leukocyte interactions in ischemic heart disease: Insights into potential mechanism and their clinical relevance. *J Am Coll Cardiol* 16: 207-222.
17. Escolar G, White JG (1991) The platelet open canalicular system: a final common pathway. *Blood cells* 17: 467-485.
18. Fitzgerald GA (1991) Mechanism of platelet activation: Thromboxane A<sub>2</sub> as an amplifying signal for other agonists. *The American J of Cardiology* Vol.68 No.3: 11B-15B.
19. Fox JE, Boyles JK, Berndt MC, et al (1988) Identification of a membrane skeleton in platelets. *J Cell Biol* 106,: 1525.

20. Fratantoni JC, Poindexter BJ (1981) Characterization of the platelet response to exogenous arachidonic acid. *Thrombosis Research* 22: 157-166.
21. Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Dierich MP, Wachter H (1988) Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in HIV infection. *Immunol Today* 9: 150-155.
22. Fuchs D, Milstien S, Krämer G, Reibnegger G, Werner ER, Dierich MP, Wachter H (1989) Urinary neopterin concentrations vs total neopterins for clinical utility. *Clin Chem* 35: 2305-2307.
23. Fuchs D, Weiss G, Wachter H (1993) Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions. *International archives of Allergy and Immunology* 101: 1-6.
24. Gear ARI (1994) Platelet adhesion, shape change and aggregation: rapid initiation and signal transduction events. *Can J Physiol Pharmacol* 72: 285-294.
25. Gentry PA (1992) The mammalian blood platelet: its role in haemostasis, inflammation and tissue repair. *J Comp Path* 107: 243-270.
26. Goldsmith HC, Turitto VT (1986) Rheologic aspects of thrombosis and hemostasis: Basic principles and applications. *Thromb Haemost* 55: 415.
27. Haavik J (1989) From butterflies to neurobiology and the diagnosis of AIDS. The 100th anniversary of the discovery of pteridines. *Tidsskrift for den Norske Laegeforening* 109: 1986-1989.
28. Hamerlinck FF, van Gool T, Faber WR, Kager PA (2000) Serum neopterin concentrations during treatment of leishmaniasis: useful as test for cure? *FEMS Immunology and medical Microbiology* 27: 31-34.

29. Hausen A, Fuchs D, Grunewald K, Huber H, Konig K, Wachter H (1982) Urinary neopterin in the assessment of lymphoid and myeloid neoplasia, and neopterin levels in haemolytic anaemia and benign monoclonal gammopathy. *Clin Biochem* 15 (1): 34-7.
30. Hensler ME, Frojmovic M, Taylor RG, Hantgan RR, Lewis JC (1992) Platelet morphologic changes and fibrinogen receptor localization. Initial responses in ADP-activated human platelets. *Am J Pathol* 141: 707-719.
31. Hoffmann G, Gollnick G, Mayer R (2002) Neopterin inhibits ATP-induced calcium release in alveolar epithelial cells in vitro. *Mediators of Inflammation* 11: 181-185.
32. Hoffmann G, Kenn S, Wirleitner B, et al (1998) Neopterin induces nitric oxid-dependent apoptosis in rat vascular smooth muscle cells. *Immunobiology* 199: 63-73.
33. Holmsen H (1982) Platelet secretion. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW (Hrsg): *Hemostasis and Thrombosis*. J. B. Lippincott Company, Philadelphia, Toronto, S. 390-403.
34. Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, Hausen A, Lang A, Niederwieser D, Reibnegger G, Swetly P, Troppmair J, Wachter H (1984) Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *J Exp Med* 160: 310-316.
35. Jandak J, Steiner M, Richardson PD (1988) Reduction of platelet adhesiveness by vitamin E supplementaion in humans. *Thromb Res* 49: 393-404.
36. Katoh S, Sueoka T, Matsuura S, Sugimoto T (1989) Biopterin and neopterin in human saliva. *Life Sciences* 45: 2561-2568.

37. Koyama M (1994) The studies on the mechanism of platelet activation induced by exogenous arachidonic acid with special reference to intraplatelet Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Hokkaido Igaku Zasshi* 69 (4): 168-73.
38. Kroll MH, Schafer AI (1989) Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood* 74: 1181-1195.
39. Kronberger P, Weiss G, Tschmelitsch J, et al (1995) Predictive value of urinary neopterin in patients with lung cancer. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 33: 831-837.
40. Ledochowski M, Murr Ch, Widner B, Fuchs D (1999) Association between insulin resistance, body mass and neopterin concentrations. *Clinica Chimica Acta* 282: 115-123.
41. Limbird LE (1988) Receptors linked to inhibition of adenylate cyclase: Additional signalling mechanisms. *FASEB J* 2: 11239.
42. Mehta JL, Chen LY, Kone BC, et al (1995) Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med* 125: 370-377.
43. Millner MM, Franthal W, Thalhammer GH, et al (1998) Neopterin concentrations in cerebrospinal fluid and serum as an aid in differentiating central nervous system and peripheral infections in children. *Clinical Chemistry* 44: 161-167.
44. Milton JG, Frojmovic MM (1983) Turbidometric evaluations of platelet activation: relative contribution of measured shape change, volume, and early aggregation. *J of Pharmacological Methods* 9: 101-115.
45. Moncada S, Higgs A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012.

46. Morgenstern E, Patscheke H, Mathieu G (1990) The origin of the membrane convolute in degranulating platelets. A comparative study of normal and "gray" platelets. *Blut* 60: 15-22.
47. Moutabarrak A, Takahara S, Nakanishi I, Kokado Y, Takano Y, Kameoka H, Ishibashi M, Zaid D (1994) Interferon-gamma stimulates neopterin release from cultured kidney epithelial cells. *Scand J Immunol* 39: 27-30.
48. Müller MM, Curtius HCh, Herold M, Huber ChH (1991) Neopterin in clinical practice. *Clinica Chimica Acta* 201: 1-16.
49. Müller TF, Vogl M, Neumann MC, Lange H, Grimm M, Müller MM (1998) Noninvasive monitoring using serum amyloid A and serum neopterin in cardiac transplantation. *Clinica Chimica Acta* 276: 63-74.
50. Murr C, Fuchs D, Gossler W, et al (1994) Enhancement of hydrogen peroxide-induced luminol-dependent chemiluminescence by neopterin depends on the presence of iron chelator complexes. *FEBS Lett* 338: 223-226.
51. Murr C, Widner B, Wirleitner W, Fuchs D (2002) Neopterin as a marker for immune system activation. *Current Drug Metabolism* 3: 175-187.
52. Murr Ch, Bergant A, Widschwendter M, Heim K, Schröcksnadel H, Fuchs D (1999) Neopterin is an independent prognostic variable in females with breast cancer. *Clinical chemistry* 45: 1998-2004.
53. Mustard JF, Kinlough-Rathbone RL, Packham MA (1980) Prostaglandins and platelets. *Ann Rev Med*, 31: 89-96.
54. Nachmias VT (1983) Cytoskeleton of human platelets at rest and after spreading. *J Cell Biology* 86: 795-802.
55. Nachmias VT, Kavalier J, Jacobowitz S (1985) Reversible association of myosin with the platelet cytoskeleton. *Nature* 313: 70-72.

56. Nathan CF (1986) In: Gresser I, Vilcek J (Hrsg): Interferon 7, Academic Press, London, S. 125-143.
57. Nicolini FA, Wilson AC, Mehta P, et al (1990) Comparative platelet inhibitory effects of human neutrophils and lymphocytes. *J Lab Clin Med* 116: 147-152.
58. Nijja K, Hodson E, Bader R, Koziol JA, Plow EF, Ruggeri ZM (1987) Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation, Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood* 70: 475-483.
59. Nixon JC, Lee CL, Milstien S, Kaufman S, Bartholome K (1980) Neopterin and biopterin levels in patients with atypical forms of phenylketonuria. *J Neurochem* 35 (4): 898-904.
60. O'Brien JR, Etherington MD (1996) High shear-induced platelet activation and inactivation: The importance of methodology. *Blood Coagul Fibrinolysis* 7: 228-232.
61. O'Brien JR (1990) Shear-induced platelet aggregation. *Lancet* 335: 711-713.
62. Oda K, Arai T, Nagase M (1999) Increased serum and urinary neopterin in nephrotic syndrome indicate cell-mediated immune dysfunction. *American Journal of Kidney Diseases* 34: 611-617.
63. Oetl K & Reibnegger G (1999) Pteridines as inhibitors of xanthine oxidase: structural requirements. *Biochimica et Biophysica Acta* 1430: 387-395.
64. Ollgaard E (1961) Microscopic studies of platelet aggregation. Nature of an aggregating factor in red blood cells and platelets. *Thromb Diath Haemorrh* 6: 86-97.
65. Packham MA (1994) Role of platelets in thrombosis and hemostasis. *Can J Physiol Pharmacol* 72: 278-284.

66. Patscheke H, Dubler D, Deranleau D, Lüscher EF (1983) Optical shape change analysis in stirred and unstirred human platelet suspensions. A comparison of aggregometric and stopped-flow turbidimetric measurements. *Thrombosis Research* 33: 341-353.
67. Patscheke H (1981) Shape and functional properties of human platelets washed with acid citrate. *Haemostasis* 10: 14-27.
68. Peerschke EIB (1992) Platelet membrane glycoproteins. Functional characterization and clinical applications. *Am J Clin Pathol* 98: 455-463.
69. Pfennig O, Zhao B, Dierichs R (1995) High-density lipoprotein fails to inhibit serotonin-induced activation of blood platelets. *Am J Hematol* 50: 307-309.
70. Pfennig O, Zhao B, Dierichs R (1996) Influence of purified apo-protein E on platelet activation induced by serotonin. *Am J Hematol* 52 (4): 319-21.
71. Polasek J, Richardson M, Moore MA, Blajchman MA (1987) Evidence for an alternative mechanism of human platelet secretion involving peripheralization of secretory granules and formation of membrane-associated multivesicular structures. *Thrombosis Research* 45: 771-782.
72. Romagnani S (1991) Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* 12: 256-257.
73. Romeis (1989) *Mikroskopische Technik*. U&S, 17.Aufl., S. 248-249.
74. Rosenblum WI (1997) Platelet adhesion and aggregation without endothelial denudation or exposure of basal lamina and/or collagen. *J Vasc Res* 34: 409-417.
75. Rosenthal MD, Rzigalinski BA, Blackmre PF, Franson RC (1995) Cellular regulation of arachidonate mobilization and metabolism. *Prostaglandins, Leukotrienes and essential fatty acids* 52: 93-98.

76. Ruzicka (1976) Elektronenmikroskopische Hämatologie. Springer, Wien, 177-185.
77. Salvemini D, De Nucci G, Gryglewski RJ, et al (1989) Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. Proc Natl Acad Sci USA 86: 6328-6332.
78. Sato T, Hashizume T, Nakao K, Akiba S, Fujii T (1989) Platelet desensitization by arachidonic acid is associated with the suppression of endoperoxide/thromboxane A<sub>2</sub> binding to the membrane receptor. Biochim Biophys Acta 18, 992(2): 168-173.
79. Siess W (1989) Molecular mechanisms of platelet activation. Physiol Rev 69: 58-178.
80. Siffert W, Akkermann JWN (1988) Na/H exchange as a modulator of platelet activation. Trends in Biochemical Sciences Vol.13 No.14: 148-151.
81. Siffert W. (1987) Na/H-Austausch und Thrombozytenaktivierung. Hämostaseologie 7: 147-150.
82. Siffert W (1995) Regulation of platelet function by sodium-hydrogen exchange. Cardiovascular Research 29: 160-166.
83. Spurr AH (1969) A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J Ultrastruct Res 26: 31-41.
84. Stenberg PE, Shuman MA, Levine SP, Bainton DF (1984) Redistribution of  $\alpha$ -granules and their contents in thrombin-stimulated platelets. J Cell Biol 98: 748-760.
85. Szuwart T et al (2000) Vitamin E reduces platelet adhesion to human endothelial cells in vitro. American Journal of Hematology 65: 1-4.

86. Szuwart T, Zhao B, Fritsch A, Mertens K, Dierichs R (1999) Oxidized low-density lipoprotein inhibits the binding of monoclonal antibody to platelet glycoprotein IIB-IIIA. *Thromb Res* 96 (2): 85-90.
87. Terres W (1990) Messung der Thrombozytenaggregation: Methode, diagnostische Bedeutung und Indikation. *Ärztliches Laboratorium* 36: 56.
88. Thews G, Mutschler E, Vaupel P (1991) *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
89. Vrecko K, Staedtler P, Mischak I, Maresch L, Reibnegger G (1997) Periodontitis and concentrations of the cellular immune activation marker neopterin in saliva and urine. *Clinica Chimica Acta* 268: 31-40.
90. Wachter H, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER (1989) Neopterin as marker for activation of cellular immunity: immunologic basis and clinical application. *Adv Clin Chem* 27: 81-141.
91. Ware JA, Collier BS (1995) Platelet morphology, biochemistry and function. In: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ (Hrsg): *Williams Hematology*. McGraw-Hill, Inc. Health Professions Division, 5. Aufl, S. 1161-1201.
92. Weiss G, Widner B, Zoller H, Schobersberger W, Fuchs D (1998) Immune response and iron metabolism. *British Journal of Anaesthesia* 81: 6-9.
93. Wencel-Drake JD (1991) Platelet secretion and receptor cycling. *Blood Cells* 17: 467-485.
94. Werner ER, Bichler A, Daxenbichler G, et al (1987) Determination of neopterin in serum and urine. *Clinical Chemistry* 33: 62-66.

95. Werner-Felmayer G, Werner ER, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Schmidt K, Weiss G, Wachter H (1993) Pteridine biosynthesis in human endothelial cells. Impact on nitric oxide-mediated formation of cyclic GMP. *J Biol Chem* 268: 1842-1846.
96. Werner-Felmayer G, Werner ER, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H (1989) Tumour necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide enhance interferon-induced tryptophan degradation and pteridine synthesis in human cells. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 370: 1063-1069.
97. White JG (1994) Platelet ultrastructure, In: Bloom AL, Forbes CD, Duncan PT, Tuddenham EGD (Hrsg): Hemostasis and Thrombosis, Churchill Livingstone, Edinburgh. S. 49-88.
98. White JG, Krumwiede M. (1987) Further studies of the secretory pathway in thrombin-stimulated human platelets. *Blood* 69 (4): 1196-1203.
99. White JG (1972) Interaction of membrane systems in blood platelets. *Am J Pathol* 66: 295-312.
100. White JG (1979) Current Concepts of platelet structure. *Am J Clin Pathol* 71: 363-378.
101. White JG (1994) Anatomy and structural organization of the platelet. In: Colman W, Hirsh J, Marder VJ, Salzman E (Hrsg): Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. W. J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 3. Aufl, S. 397-413.
102. White JG, Krumwiede MD, Johnson DK, Escolar G (1995) Redistribution of GP Ib/IX and GP IIb/IIIa during spreading of discoid platelets. *British J. of Hematology* 90: 633-644.
103. White JG (1984) The secretory process in platelets. *Cell Biology of the secretory process*. Cantin M, Montreal, Karger, 546-569.

104. Yoshida K, Stark F, Nachmias VT (1988) Comparison of the effects of phorbol 12-myristate 13-acetate and prostaglandin E1 on calcium regulation in human platelets. *Biochemical J* 249: 487-493.
105. Zangerle R, Sarcletti M, Gallati H, Reibnegger G, Wachter H, Fuchs D (1994) Correlation of body mass index with urinary neopterin in individuals infected with human immunodeficiency virus. *International Archives of Allergy and Immunology* 104, 150-154.
106. Zavoico GB, Feinstein MB (1984) Cytoplasmatic Ca<sup>2+</sup> in platelets is controlled by cyclic AMP: Antagonism between stimulators and inhibitors of adenylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 120, 579.
107. Zeimet AG, Widschwendter M, Knabbe C, et al (1998) Ascitic interleukin-12 is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *Journal of Clinic Oncology* 16: 1861-1868.
108. Zhao B, Dierichs R, Ahonen-Sann R (1993) Low concentrations of LDL enhances platelet reactivity in vitro-a morphological study. *Platelets* 4: 41-44.
109. Ziegenhagen MW, Benner UK, Zissel G, Zabel P, Schlaak M, Muller-Quernheim J (1997) Sarcoidosis: TNF-alpha release from alveolar macrophages and serum level of sIL-2R are prognostic markers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 156: 1586-1592.
110. Zucker MB, Nachmias VT (1985) Platelet activation. *Arteriosclerosis* 5: 2-18.
111. Zucker MB, Zaccardi JB (1964) Platelet shape change induced by adenosine diphosphate and prevented by adenosine monophosphate. *Fed. Proc* 23: 299.
112. Zucker MB (1980) Die Blutplättchen. *Spektrum der Wissenschaft* 8: 22-32.

## **6. Danksagung**

Ich danke allen Damen und Herren, die mich bei der Planung und Erstellung der Arbeit beraten und begleitet haben.

Für die wissenschaftliche Betreuung gilt mein Dank Herr Dr. Thomas Szuwart.

Im Rahmen der praktischen Versuchsdurchführung standen mir Frau Petra Hassmann und Frau Daniela Aschhoff mit Rat und Tat zur Seite.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern ohne deren Unterstützung und Motivation diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## **7. Lebenslauf**

Name: Philipp Wolff

Geburtsdatum: 26.4.1976

Geburtsort: Bielefeld

Eltern: Otto Wolff und  
Daphne Wolff, geb. Chamitzer

Wohnort: Overbergstraße 17  
48145 Münster

Schulbildung: Stapenhorst-Grundschule Bielefeld (1982 bis 1986)  
Bavink-Gymnasium Bielefeld (1986 bis 1995)  
Allgemeine Hochschulreife am 12. Juni 1995

Studium: Jurastudium an der Universität Bielefeld:  
WS 1995 bis WS 1997  
Studium der Zahnmedizin an der Universität Münster:  
SS 1997 – WS 2002  
Naturwissenschaftliche Vorprüfung am 13. August  
1998  
Zahnärztliche Vorprüfung am 28. September 1999  
Staatsexamen Zahnmedizin am 2. Juli 2002  
Studium der Humanmedizin an der Ruhr-Universität  
Bochum:  
Beginn WS 2002  
Ärztliche Vorprüfung am 15. September 2003

Münster, 14. Mai 2004