

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Nanopartikel-basierte Applikation von Glykoprotein VI und
deren Auswirkung auf die Thrombusbildung**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Schönfeld, Carl-Alexander

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. R. Salih

Tag der Disputation: 21.07.2021

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Hämostase.....	1
1.2 Thrombozyten.....	1
1.2.1 Grundlagen.....	1
1.2.2 Aufbau und Oberflächenstruktur.....	2
1.2.3 Thrombozytenaggregation.....	2
1.2.4 Thrombozytenaktivierung.....	2
1.2.5 Bedeutung der Thrombozyten bei vaskulären Verschluss-erkrankungen.....	3
1.3 Der Glykoprotein VI-Rezeptor (GPVI-Rezeptor).....	4
1.3.1 Aufbau.....	4
1.3.2 Signalweg.....	5
1.3.3 Bedeutung des GPVI-Rezeptors für die Hämostase.....	6
1.3.4 Rolle des GPVI-Rezeptors in anderen Pathophysiologien.....	7
1.3.5 GPVI-Rezeptor und Atherosklerose.....	7
1.3.6 Therapeutischer Nutzen.....	8
1.4 Nanotechnologie.....	9
1.5 Nanopartikel und Herz-Kreislaufferkrankungen.....	9
1.6 Fragestellung.....	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Darstellung der Nanopartikel.....	12
2.2 Blutperfusion unter verschiedenen Scherraten im Flusskammer-Modell.....	13
2.2.1 Benötigte Materialien.....	13
2.2.2 Funktionsweise und Aufbau der Flusskammer.....	15
2.2.3 Vorbereitung der Deckgläser.....	17
2.2.4 Vorbereitung der Flusskammer.....	17
2.2.5 Durchführung der Flusskammerexperimente.....	18
2.3 Impedanzaggregometrie.....	21
2.3.1 Benötigte Materialien.....	21
2.3.2 Funktionsweise des Multiplate® Analysers.....	22

Inhaltsverzeichnis

2.3.3	Vorbereitung des Kollagenreagenz	23
2.3.4	Durchführung der Impedanzaggregometrie.....	23
2.4	Thrombelastographie (TEG)	23
2.4.1	Benötigte Materialien.....	23
2.4.2	Funktionsweise des TEG 6s-Hämostase-Analysegerätes	24
2.4.3	Durchführung der TEG unter Einfluss der GPVI-Nanopartikel	25
2.5	Durchflusszytometrie der Nanopartikel	25
2.5.1	Benötigte Materialien.....	25
2.5.2	Funktionsweise des Durchflusszytometers (FACS)	25
2.5.3	Durchführung der Nanopartikelanalyse	26
2.6	Statistische Methoden.....	26
2.7	Studienprofil	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Auswirkung der Scherrate auf die Thrombusbildung im Flusskammermodell 27	
3.2	Nanopartikel.....	28
3.2.1	Darstellung der Größe und Fluoreszenz mittels FACS	28
3.2.2	Mikroskopische Darstellung der Nanopartikel	30
3.2.3	Bindung der Nanopartikel an Kollagenstrukturen über den zeitlichen Verlauf	31
3.2.4	Spezifität der Bindung der Nanopartikel über den GPVI-Rezeptor	34
3.3	Einfluss der Nanopartikel auf die Thrombusbildung im Flusskammer-Modell 36	
3.3.1	Analyse der Thrombusfläche unter Einfluss der Nanopartikel.....	36
3.3.2	Analyse der Größenverteilung der einzelnen Thromben unter Einfluss der Nanopartikel	39
3.3.3	Einflüsse der Nanopartikel auf die Thrombusbildung und Thrombusstabilität mittels Thrombelastografie.....	41
3.3.4	Einfluss der Nanopartikel auf die Thrombusbildung in der Impedanzaggregometrie 42	
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	43
4	Diskussion	45
4.1	Nanopartikel fluoreszieren und können mittels FACS oder unter dem Mikroskop dargestellt werden	45

Inhaltsverzeichnis

4.2	Nanopartikel binden über den GPVI-Rezeptor an Kollagenstrukturen	47
4.3	Nanopartikel binden im dynamischen Modell mittels GPVI an Kollagenstrukturen.....	48
4.4	Einfluss der GPVI-Nanopartikel auf die Thrombus-bildung und -struktur im Flusskammer-Modell	49
4.5	Einfluss der GPVI-Nanopartikel auf die Thrombus-bildung sowie -stabilität im Thrombelastografie-Modell	51
4.6	Auswirkungen der GPVI-Nanopartikel auf die Thrombusbildung, impedanzaggregometrischer Nachweis.....	52
4.7	Ausblick der Nutzung von GPVI-Nanopartikeln	52
5	Zusammenfassung.....	54
	Literaturverzeichnis.....	55
	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertation	63
	Abbildungsverzeichnis	64
	Abkürzungsverzeichnis	66
	Danksagung	67

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Hämostase

Die Hämostase (Blutstillung) stellt das Zusammenspiel von Thrombozyten, Gefäßendothel und Gerinnungsfaktoren aus dem Blutplasma dar und spielt eine wichtige Rolle bei dem Verschluss von Schäden im Blutgefäßsystem. Grundsätzlich kann man die Hämostase in einen primären und einen sekundären Komplex unterteilen ^{1,2}.

Während bei der primären Hämostase hauptsächlich Thrombozyten mit Gefäßwandstrukturen interagieren, was zur Bildung eines weißen Abscheidungsthrombus (Thrombozytenpfropf) führt, basiert die sekundäre Hämostase auf dem Ablauf einer Gerinnungskaskade, bei der eine Vielzahl an Enzymen und Kofaktoren des Blutplasmas beteiligt sind. Diese sekundäre Hämostase bedingt die Bildung eines roten Ausscheidungsthrombus, der gegenüber dem Thrombozytenpfropf auch rote und weiße Blutzellen als Bestandteile enthält ¹⁻³.

1.2 Thrombozyten

1.2.1 Grundlagen

Thrombozyten (Blutplättchen) stellen mit einer Zellzahl von $150-400 \times 10^9/l$ nach den Erythrozyten die mengenmäßig größte Fraktion der im Blut vorkommenden Zellen dar. Die ca. 2-5 μm großen, kernlosen, in ihrer Form diskoiden Blutplättchen entstehen beim Zerfall von Megakaryozyten aus dem Knochenmark und zirkulieren bis zu zehn Tage im Blutkreislauf, bevor sie in Milz und Leber abgebaut werden ⁴⁻⁶.

Aufgrund ihrer diskoiden Form und der Flusseigenschaft des Blutes bewegen sich die Thrombozyten in enger räumlicher Nähe zu den Endothelzellen der Blutgefäße. Dies begünstigt einerseits die natürliche Hemmung der Blutplättchenanheftung am Endothel durch von Endothelzellen sekretierten Mediatoren wie Stickstoffmonoxid oder Prostacyclin, andererseits können

Einleitung und Fragestellung

Schäden im Gefäßendothel schnell von den Thrombozyten erkannt und behoben werden ^{4,7}.

1.2.2 Aufbau und Oberflächenstruktur

Thrombozyten besitzen ein sehr dynamisches Zytoskelett, mit hämostatischen Mediatoren befüllte Sekretgranula und eine Vielzahl verschiedener Oberflächenrezeptoren, um eine hinreichende Blutstillung zu gewährleisten,

Mithilfe dieser Rezeptoren können die Thrombozyten durch bestimmte Mediatorstoffe (Thromboxan A₂, ADP), andere Proteine (von-Willebrand-Faktor (vWF), Thrombin) sowie die Extrazellulärmatrix (Kollagen, Fibronectin, Laminin) aktiviert werden oder mit anderen Zellen (Thrombozyten, Leukozyten oder Tumorzellen) interagieren ^{8,9}.

1.2.3 Thrombozytenaggregation

Bei der Verletzung eines Blutgefäßes bilden Thrombozyten im Rahmen der primären Hämostase Aggregate (Thrombozytenpfropf). Dieser Vorgang beinhaltet mehrere Mechanismen und kann in drei Phasen unterteilt werden.

In der ersten Initiationsphase adhäriert eine erste Schicht Thrombozyten an freiliegendes Subendothel und wird dadurch aktiviert. Infolge dieser Bindung setzen die aktivierten Blutplättchen in einer zweiten Extensionsphase Mediatorstoffe ihrer Granula frei und rekrutieren dadurch weitere Thrombozyten. Schließlich bleibt der entstandene Thrombozytenpfropf in der dritten Stabilisationsphase weiterhin erhalten, bis die Wundheilung einsetzt ¹⁰.

1.2.4 Thrombozytenaktivierung

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, lassen sich Blutplättchen sowohl über bestimmte Mediatorstoffe anderer Thrombozyten oder Endothelzellen sowie durch den Kontakt zur Subendothelmatrix aktivieren. Dieser Vorgang im einzelnen Thrombozyten kann im Wesentlichen in vier Phasen unterteilt werden.

Einleitung und Fragestellung

In der ersten Phase kommt es zur Bindung von Liganden an die auf der Thrombozytenoberfläche exprimierten Rezeptoren. Viele dieser Bindungen bewirken im zweiten Abschnitt den Ablauf einheitlicher Signalwege, die zur Aktivierung der Blutplättchen führen.

Im nächsten Schritt kommt es durch „inside-out Signaling“ zur Aktivierung des wichtigsten Plättchen-Adhäsions-Rezeptor – dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, das wie andere Integrine die Fähigkeit besitzt, die Thrombozyten und deren Aggregate über die Bindung an verschiedene Extrazellulärmatrixbestandteile zu stabilisieren.

Zuletzt führt die Bindung verschiedener Liganden an die Integrine über das „outside-in Signaling“ wiederum zur Amplifizierung der Thrombozytenaktivierung¹¹.

1.2.5 Bedeutung der Thrombozyten bei vaskulären Verschluss-erkrankungen

Thrombotische Gefäßverschlüsse vor allem der Herzkranz- und Gehirnarterien und die damit verbundenen Erkrankungen Herzinfarkt und Schlaganfall zählen global zu den häufigsten Todesursachen^{12,13}. 2010 verstarben weltweit circa 25% der Menschen an den folgen ischämischer Herzgefäß- oder Gehirngefäß-erkrankungen¹⁴.

Nach wie vor liegt eine große Herausforderung der Therapiemaßnahmen darin, die Thrombozytenaggregation sowie die Blutgerinnung therapeutisch zu hemmen, um eine Reduktion der Mortalität und Morbidität zu erreichen¹⁵. Auf der anderen Seite müssen jedoch unkontrollierte Blutungen durch die Therapie vermieden werden^{15,16}.

Die meisten kardiovaskulären Ereignisse sind auf die Ruptur atherosklerotischer Plaques zurückzuführen^{17,18}. Bei der Ruptur einer Plaque werden Teile der subendothelialen Matrix frei und führen zur Aktivierung von Thrombozyten, wie in 1.2.4 beschrieben. Dabei spielt die Exposition von Kollagen Typ I und III eine wichtige Rolle. Vor allem bei hohen Scherraten, wie sie bei durch Atherosklerose stenosierte Gefäßen vorkommen, ist die Thrombozyten-Kollagen-Interaktion von maßgeblicher Bedeutung für die Plättchenaktivierung¹⁹.

Einleitung und Fragestellung

Die Thrombozyten stellen mittels GPIb-V-IX (Glykoprotein Ib-V-IX)-vWF eine erste Verbindung zu den Kollagenstrukturen her und binden darauffolgend über den Glykoprotein VI (GPVI)-Rezeptor direkt an Kollagen (vor allem Kollagen Typ I), wodurch die Thrombozyten-Aktivierung zu einem großen Teil initiiert wird²⁰. Damit spielt der GPVI-Rezeptor eine maßgebliche Rolle bei der Kollagen-vermittelten Thrombozytenaktivierung.

1.3 Der Glykoprotein VI-Rezeptor (GPVI-Rezeptor)

1.3.1 Aufbau

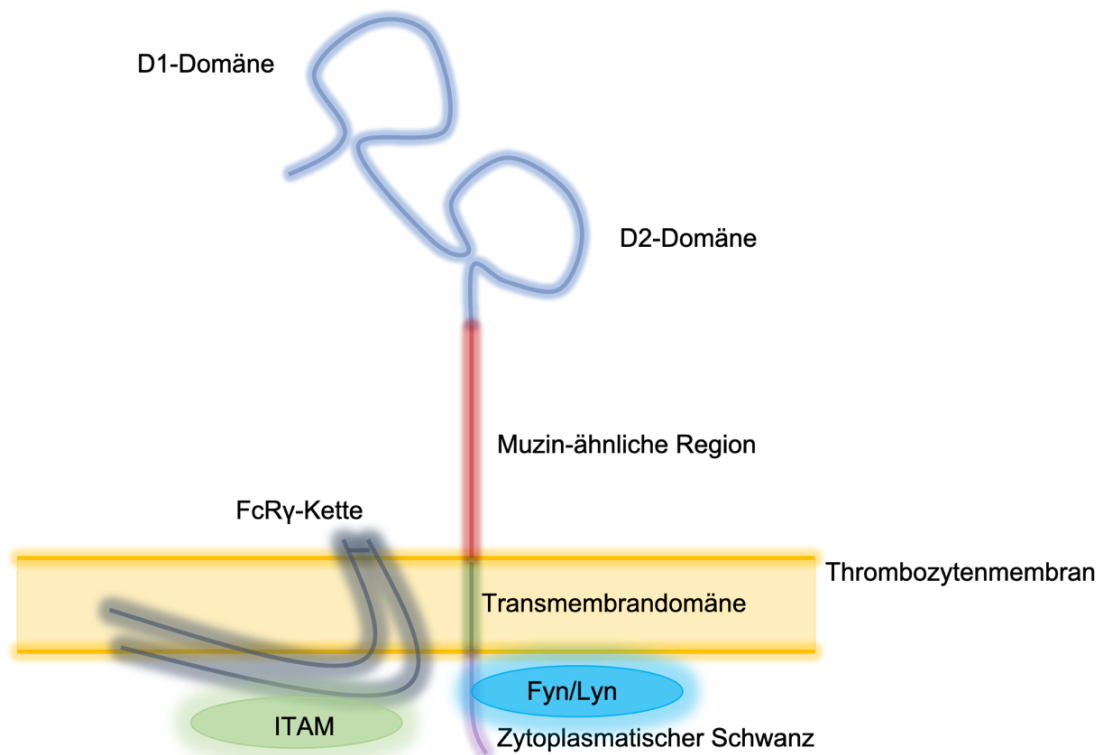


Abbildung 1: Schema GPVI-Rezeptor *modifiziert nach* ²¹. Der GPVI-Rezeptor ist ein Transmembranprotein der Thrombozyten. In Blau die D1- und D2-Domäne, in Rot die Muzin-ähnliche Region, in Grün die Transmembrandomäne, in violett der zytoplasmatische Schwanz mit den an der Prolin-reichen Region gebundenen Tyrosin-Kinasen Fyn und Lyn, in Grau die FcRγ-Kette mit dem angebundenen "Immunorezeptor-tyrosine-based activation

Einleitung und Fragestellung

Der GPVI-Rezeptor (Schema siehe Abbildung 1) wurde erstmals 1982 beschrieben^{22,23}. Er gehört zur Superfamilie der Immunglobulin-Rezeptoren²⁴. Er setzt sich aus 339 Aminosäuren zusammen und ist mit einer Größe von circa 62 kDa ein Transmembranrezeptor des Typs I¹⁹. Der extrazelluläre Anteil ist 55 kDa groß und besteht aus zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen.

Die D1-Domäne stellt die Bindungsstelle für die Kollagenstrukturen dar^{25,26}. Die D2-Domäne verbindet die D1- mit der Transmembrandomäne²⁴. Diese geht intrazellulär in den 51 Aminosäure-langen zytoplasmatischen Schwanz über¹⁹. Die Transmembrandomäne enthält eine positiv geladene Arginin-Aminosäure, über die die non-kovalente Verbindung zu einer FcR γ -Kette aufgebaut wird^{27,28}. Der zytoplasmatische Schwanz enthält eine Prolin-reiche Region, über die die Tyrosin-Kinasen Fyn und Lyn selektiv binden können²⁹. Die FcR γ -Kette ist an ein "Immunorezeptor-tyrosine-based activation motif" (ITAM) gebunden³⁰.

1.3.2 Signalweg

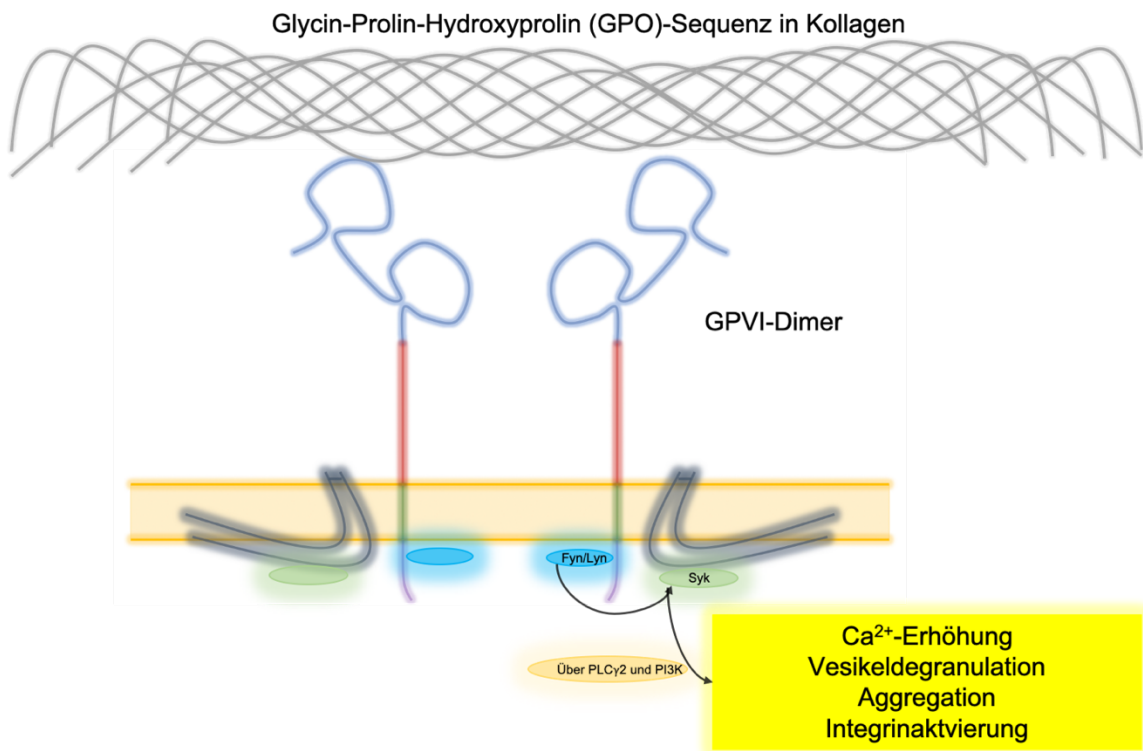


Abbildung 2: GPVI-Rezeptor-Kollagen-Interaktion. Der GPVI-Rezeptor bindet als Dimer an die Glycin-Prolin-Hydroxyprolin (GPO)-Sequenz von Kollagen und leitet somit eine Signalkaskade der Thrombozytenaktivierung ein.

Einleitung und Fragestellung

Der GPVI-Rezeptor liegt circa 4000 bis 6000 Mal aufgeteilt in seiner Monomer- und Dimer-Form auf der Thrombozytenmembran vor ³¹. Mehrere Untersuchungen belegten, dass lediglich die Dimerisation des Rezeptors zu einer spezifischen Bindung von Glycin-Prolin-Hydroxyprolin (GPO)-Strukturen von Kollagen führt ³²⁻³⁵.

Im Rahmen des ersten Kontakts der Thrombozyten zu exponierten Kollagenstrukturen mittels GPIb-V-IX und vWF kommt es zu einer Dimerisierung der GPVI-Rezeptor-Monomere. Dadurch wird die Interaktion von Thrombozyten und Kollagen verstärkt, wodurch es folglich zur Aktivierung der Thrombozyten über die mit dem GPVI-Rezeptor verbundenen Signalkaskaden kommt (siehe Abbildung 2) ³³.

Nachdem der GPVI-Rezeptor als Dimer an die GPO-Sequenz von Kollagen bindet, kommt es zu einem "Crosslinking" des GPVI-Rezeptors, was wiederum die Tyrosin-Phosphorylierung des ITAM der FcR γ -Kette durch die am zytoplasmatischen Schwanz befindlichen Tyrosin-Kinasen Fyn und Lyn bewirkt. Dies bewirkt die Rekrutierung und Aktivierung der SH2-Domäne-enthaltenden Tyrosin-Kinase Syk, die letztlich zu einer komplexen Aktivierungskaskade der Thrombozyten beiträgt.

In dieser Aktivierungs-kaskade kommt es zur Aktivierung zahlreicher Effektormoleküle, unter anderem der Phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) und der Phosphoinosit-3-Kinase (PI3K) ³⁰. Dies führt letztendlich zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciums, zur Degranulation von Vesikeln, zur Thrombozytenaggregation und zur Integrinaktivierung – vor allem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ¹⁶.

1.3.3 Bedeutung des GPVI-Rezeptors für die Hämostase

Wie bereits in Kapitel 1.2.5 beschrieben, spielt der GPVI-Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der Kollagen-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Die Bedeutung des Rezeptors für die Physiologie der Hämostase ist jedoch noch nicht gänzlich geklärt.

Einleitung und Fragestellung

Während die meisten Patienten mit einem GPVI-Defekt eine milde Blutungs-symptomatik zeigten, konnte bei einigen Patienten auch eine starke Blutungsneigung festgestellt werden ³⁶⁻³⁸.

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein Knockout des GPVI-Gens ^{39,40}, ein Defekt der FcR γ -Kette ⁴¹⁻⁴³ und eine antikörpervermittelte Hemmung des GPVI-Rezeptors ⁴⁴ nicht zu einer verlängerten Blutungszeit, wohl aber zu einer fehlenden kollageninduzierten Thrombozytenaggregation führt.

1.3.4 Rolle des GPVI-Rezeptors in anderen Pathophysiologien

Transitorische ischämische Attacken und Schlaganfälle resultieren häufig aus thromboembolischen Ereignissen als Folge rupturierter atherosklerotischer Plaques. Es konnte gezeigt werden, dass sich bei Patienten mit Zustand nach einem Cerebralgefäßereignis Thrombozyten mit erhöhter GPVI-Rezeptorexpression nachweisen lassen ⁴⁵. Auch die Menge an löslichem GPVI im Plasma dieses Patientenkollektivs scheint erhöht ⁴⁶. Zusätzlich spielt der GPVI-Rezeptor eine Rolle bei der Reperfusionproblematik cerebralarterieller Ereignisse, wobei die genauen Zusammenhänge noch nicht hinreichend geklärt werden konnten ⁴⁷. Es wird jedoch eine thromboinflammatorische Bedeutung des GPVI-Rezeptors angenommen ⁴⁸. Auch an anderen Entzündungsreaktionen scheint der GPVI-Rezeptor beteiligt zu sein ^{49,50}. In der Onkologie zeigen einige Arbeiten einen Einfluss des GPVI-Rezeptors auf Metastasierungsprozesse ^{51,52}.

1.3.5 GPVI-Rezeptor und Atherosklerose

In Kapitel 1.2.5 wurde bereits beschrieben, dass der GPVI-Rezeptor bei der Entstehung arterieller Thromben beteiligt ist. Dies ist vor allem auf seine Kollagen-Spezifität zurückzuführen. Bei der Ruptur arterieller Plaques wird Kollagen in das Gefäßlumen exponiert und initiiert somit die Thrombozytenaggregation.

Arterielle Thromben entstehen unter hohen Scherraten. Dies ist zum einen auf die Tatsache zurückzuführen, dass der Druck im arteriellen Stromgebiet hoch ist. Auf der anderen Seite wird die hohe Scherrate durch die partielle Okklusion der

Einleitung und Fragestellung

Gefäße bedingt durch Atherosklerose hervorgerufen. Durch die hohe Scherrate werden autokrine Mediatorstoffe und auch das an der Gerinnungskaskade beteiligte Thrombin, das von den Thrombozyten aus ihren Vesikeln freigesetzt wird, teilweise weggespült. Das könnte eine Erklärung sein, warum der GPVI-Rezeptor vor allem bei der Entstehung arterieller Thromben – oder generell bei der Thrombusbildung unter hohen Scherraten eine entscheidende Rolle spielt⁵³. Andere Arbeiten zeigten, dass der GPVI-Rezeptor nur eine untergeordnete Rolle bei der Entstehung arterieller Thromben spielt und diese hauptsächlich durch die Anwesenheit von Thrombin initiiert wird^{54,55}. *In vitro* konnte die Bedeutung des GPVI-Rezeptors für die Entstehung arterieller Thromben nachgewiesen werden^{20,56,57}.

1.3.6 Therapeutischer Nutzen

Der GPVI Rezeptor hat zwar in der physiologischen Hämostase einen eher geringen Anteil an der Thrombozytenaggregation, wohingegen *in vivo* eine wichtige Rolle in der Entstehung arterieller Thromben vermutet wird⁵⁸.

In verschiedenen Ansätzen wurde bereits versucht, den GPVI-Rezeptor auf den Thrombozyten auf verschiedene Arten zu hemmen.

Ein erster Ansatz besteht darin, die Kollagenbindungsstelle des GPVI-Rezeptors durch Antikörper zu blockieren, ohne jedoch die Oberflächenexpression zu beeinflussen. In ersten Experimenten an Mäusen konnte eine Reduzierung der Thrombusbildung an Ratten und Mäusen *in vivo* festgestellt werden. Eine vermehrte Blutungsneigung blieb jedoch aus^{59,60}.

Durch Antikörper der JAQ Familie konnte eine längerfristige, irreversible Hemmung der GPVI-Oberflächenrezeptoren auf Thrombozyten in Mäusen *in vivo* erreicht werden⁴⁴. Dies lag vor allem daran, dass diese Antikörper in das Knochenmark eindringen und dort bereits eine irreversible Hemmung des GPVI-Rezeptors auf Thrombozyten bewirken und dass Thrombozyten aufgrund ihres fehlenden Zellkerns nicht in der Lage sind, den Rezeptor nachzubilden. Diese Hemmung entsprach der Wirkung autoimmuner Antikörper in Menschen³⁶. Neben einer kurzzeitigen Thrombozytopenie konnte eine moderate Verlängerung

Einleitung und Fragestellung

der Blutungszeit und ein antithrombotischer Effekt arterieller Thromben festgestellt werden ⁴⁴.

Ein weiterer Ansatz zur Hemmung des GPVI-Rezeptors ist, den Signalweg zu inhibieren. Dies ist aufgrund der Komplexität der Signalkaskade jedoch noch nicht sehr etabliert ¹⁶.

Außerdem besteht die Möglichkeit, den GPVI-Rezeptor der Thrombozyten kompetitiv mit einem löslichen GPVI-Fc-Fusionsprotein zu hemmen. In einer Arbeit wurde die kompetitive Hemmung des GPVI-Rezeptors als weniger effizient als die direkte Antikörper-vermittelte Hemmung des GPVI-Rezeptors auf Thrombozyten beschrieben ⁶¹. In einer anderen Arbeit konnten jedoch Effekte auf die verminderte Thrombusbildung mittels kompetitiver Hemmung durch lösliches GPVI-Fc nach Verletzung der Arteria carotis bei Mäusen nachgewiesen werden ⁶². In einer ersten klinischen Phase I Studie mit dem Wirkstoff "Revacept" (GPVI-Fc-Dimer) konnte festgestellt werden, dass die kompetitive Hemmung des GPVI-Rezeptors durch lösliches GPVI-Fc nicht zu einer erhöhten Blutungsneigung führt ⁶³.

1.4 Nanotechnologie

Die Nanotechnologie ist heute Gegenstand zahlreicher Forschungsbereiche der Medizin. So finden Nanopartikel beispielsweise in der Applikation von Pharmaka, in der diagnostischen Bildgebung, als Biosensoren oder in der Blutentgiftung Anwendung. Auch im "Tissue Engineering" (dt. Gewebezüchtung) baut man auf Nanotechnologie in Form sogenannter Nanoroboter.

Die Verwendung von Nanopartikeln bei der Applikation von Pharmaka ist insbesondere bei der Therapie von Krebserkrankungen, Infektionen, Diabetes, sowie hämatologischen und orthopädischen Krankheitsbildern von Relevanz ⁶⁴.

1.5 Nanopartikel und Herz-Kreislaufkrankungen

Auch in der Therapie von Herz-Kreislaufkrankungen gibt es erste Ansätze zur Verwendung von Nanopartikeln.

Einleitung und Fragestellung

In einer Arbeit wurden Nanopartikel mit "tissue plasminogen activator" (tPA) beladen und auf ihren Einfluss auf die Thrombenbildung hin untersucht. Dabei wurden die circa 180 nm großen Nanopartikel zu circa 2-5 µm großen Konglomeraten zusammengelagert, die sich erst unter besonders hohen Scherkräften in ihre Untereinheiten zerteilen. Es konnte festgestellt werden, dass die mit tPA beladenen Nanopartikel eine Reduzierung der Thrombusbildung bewirkten und die Menge an benötigtem tPA deutlich kleiner ausfiel als vergleichbare Mengen löslichen tPAs bei einer systemischen Lysetherapie ⁶⁵.

1.6 Fragestellung

Verschlussereignisse von arteriellen Gefäßen zählen nach wie vor zu den häufigsten Todesursachen weltweit ^{12,13}. Dabei sind häufig Rupturen chronisch entstandener Plaques ursächlich, die die Bildung eines Thrombus initiieren ^{17,18}. Dabei kommt es zur Interaktion von Thrombozyten und der subendothelialen Matrix, die als wichtigen Bestandteil Kollagen enthält.

Der GPVI-Rezeptor ist ein Kollagenrezeptor auf Thrombozyten ^{34,66}. Er spielt eine entscheidende Rolle bei der Kollagen-vermittelten Aktivierung der Thrombozyten und somit bei der Pathogenese von atherosklerösen Plaques ^{20,67}.

Der GPVI-Rezeptor ist vor allem aufgrund der Tatsache, dass eine Hemmung des Signalwegs nach aktueller Studienlage allenfalls zu leichten Blutungen als Nebenwirkung führt, ein vielversprechendes Ziel der antithrombotischen Therapie ⁶⁸.

Ein möglicher Ansatz zur Hemmung der GPVI-Kollagen-Interaktion besteht in der kompetitiven Hemmung der GPVI-Rezeptor-Bindungsstellen auf Kollagen. Für lösliches GPVI konnte der Effekt noch nicht einheitlich beschrieben werden ^{61,62}. In ersten Arbeiten konnte eine erfolgsversprechende Verwendung von mit tPA-beladenen Nanopartikeln in der Therapie von thrombotischen Ereignissen nachgewiesen werden. Dabei wurden die Nanopartikel in Gefäßabschnitten mit hohen Scherraten, wie sie bei pathologischen Plaques vorkommen, aktiviert ⁶⁵.

Einleitung und Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll die Frage erörtert werden, ob eine Nanopartikel-basierte Applikation von GPVI Auswirkungen auf die Thrombusbildung hat. Dafür werden die Nanopartikel in ihrer Beschaffenheit, das Bindungsverhalten der Nanopartikel an Kollagen und der Einfluss der Nanopartikel-basierten Applikation von GPVI auf die Thrombusbildung in verschiedenen Modellen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Darstellung der Nanopartikel

Die Nanopartikel bestehen aus Poly(lactic-co-glykolic acid) (PLGA). Sie sind laut Herstellerangaben 200 nm groß. In den folgenden Experimenten werden zwei verschiedene Arten von Nanopartikeln mit jeweils unterschiedlicher Oberflächenmodifikation verwendet. Zum einen sind die Nanopartikel mit dem GPVI-Rezeptor in einer Konzentration von 40 µg pro mg Nanopartikel sowie dem Fluoreszenzfarbstoff "nile red" beladen. Die als Kontrolle dienenden Nanopartikel sind mit BSA und dem Fluoreszenzfarbstoff "coumarin 6" beladen. Abbildung 3 zeigt das allgemeine Schema der verwendeten Nanopartikel. Die Nanopartikel sind nicht zu Konglomeraten zusammengelagert, so wie in 1.5 beschrieben. Sie werden daher nicht erst durch Scherkräfte aktiviert.

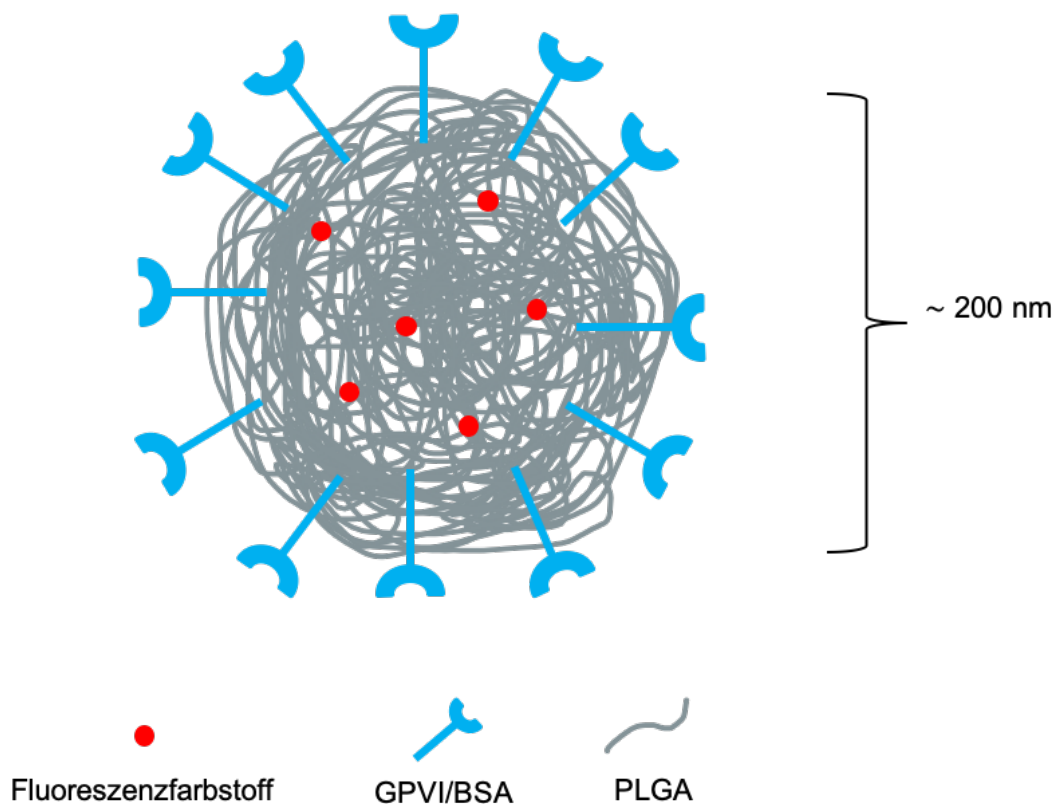


Abbildung 3: Schema eines 200 nm-Nanopartikels.

2.2 Blutperfusion unter verschiedenen Scherraten im Flusskammer-Modell

2.2.1 Benötigte Materialien

Reagenzien

Bovines Serum Albumin Fraction V (pH 7,0)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dulbeccos Phosphat Buffered Saline (ohne Calcium)	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, Missouri, USA
Kollagenreagens Horm®	Takeda Austria GmbH, Linz, Österreich
Nanopartikel mit Fluoreszenzfarbstoffen „Nile Red“ und „Coumarin 6“	Technion- Israel Institute of Technology, Haifa, Israel
GPVI-Fc	advanceCOR GmbH, Martinsried, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

S-Monovette® 8.5 ml CPDA	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Deckgläser mikroskopisch (24 x 60 mm, Stärke: 0,13 - 0,16 mm)	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Injekt® Luer Solo (Einmalspritze 5ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Insulinspritze (1ml)	Becton Dickson S.A., Madrid, Spanien
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	
SafeSeal Reagiergef. 2 ml, PP	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Material und Methoden

Spritzenpumpenleitung SARSTEDT AG & Co. KG,
Nümbrecht, Deutschland
Fresenius Kabi AG, Bad Homburg,
Deutschland

Geräte

Lichtmikroskop: Axiovert 200 Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Kamera: Axio Cam Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Flusskammer (Höhe: 50 μm , Breite: Maastricht Instruments BV,
5mm) Maastricht, Niederlande
Perfusor kd Scientific, Holliston,
Massachusetts, USA
Kreisschüttler KS 260 basic IKA®-Werke GmbH & CO. KG,
Staufen, Deutschland
ebq 100 isolated - z 101.26l Leistungselektronik JENA GmbH,
(Quecksilberlampe) Jena, Deutschland

Software

Software: Axio Vision (AxioVS40 V Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
4.8.2.0)
Image J National Institutes of Health,
Bethesda, Maryland, USA

Probe

CPDA-Vollblut gesunde humane Spender

2.2.2 Funktionsweise und Aufbau der Flusskammer

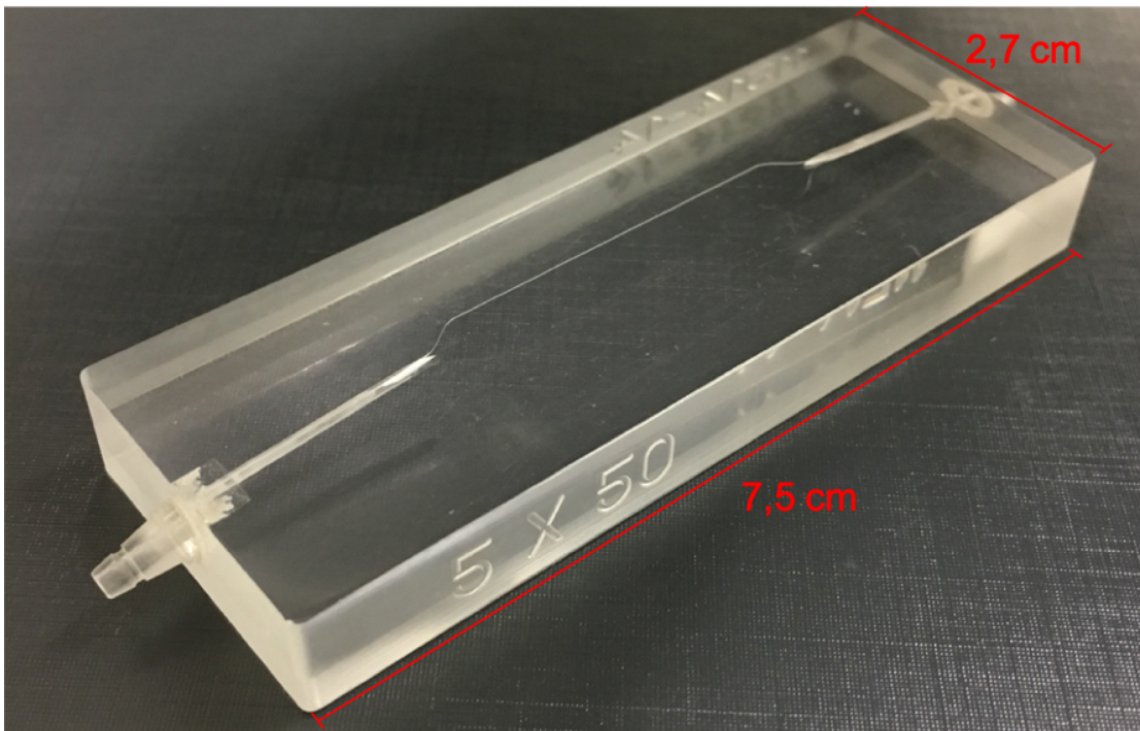


Abbildung 4: Fotoaufnahme der Flusskammer. An den beiden Seiten werden Schläuche zur Blutperfusion angeschlossen. Cover-Slips verschließen die Flusskammer nach oben und ermöglichen die Perfusion.

Das Flusskammer-Modell dient der Simulation unterschiedlicher Scherraten *in vitro*^{69,70}. Wie in Abbildung 4 gezeigt, besitzt die Flusskammer jeweils einen Ein- und Ausfluss, über die Blut in die Flusskammer eintreten und diese auf der anderen Seite wieder verlassen kann. Durch das Anbringen eines Deckglases an die Oberseite der Flusskammer können während der Perfusion humanen Vollbluts neben dem Strömungsverhalten auch die zellulären Interaktionen der Thrombozyten untereinander sowie die Wechselwirkungen der Thrombozyten mit der beschichteten Matrix untersucht werden.

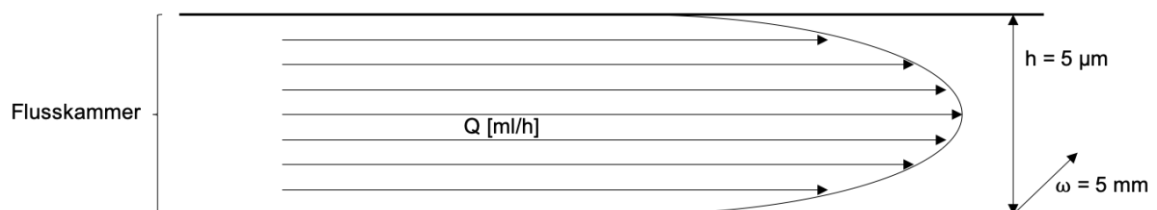


Abbildung 5: Schematischer Blutfluss durch die Flusskammer modifiziert nach ⁷⁰.

Material und Methoden

In der 50 µm hohen und 5 mm breiten Flusskammer kommt es zum Kontakt des Blutes mit der sich auf dem Deckglas befindlichen Matrix ⁷⁰.

Bei der Perfusion kommt es, wie in den natürlichen Blutgefäßen auch, zu verschiedenen Flussgeschwindigkeiten innerhalb des Blutstroms, was auf die Viskosität des Blutes zurückzuführen ist. Dabei herrscht im Zentrum die höchste Flussgeschwindigkeit, die in Richtung Wand zirkulär abnimmt (vergleiche Abbildung 5). Aus diesen ungleichen Strömungsgeschwindigkeiten resultiert eine auf die im Blut bewegten Zellen wirkende Kraft, die Scherrate ⁷¹.

Diese kann laut Herstellerangaben der Flusskammer durch folgende mathematische Formel dargestellt werden:

$$\gamma = 100 \frac{Q}{h^2 \cdot \omega} [\text{s}^{-1}]$$

wobei γ die Scherrate, Q der Volumenstrom, h die Höhe der Flusskammer (in diesem Fall 50 µm) und ω die Breite der Flusskammer (in diesem Fall 5 mm) darstellt. Bei der Berechnung der Scherrate mit oben genannter Formel sind die Einheiten der Höhe und Breite in mm, der Volumenstrom in ml/min und die Scherrate in s^{-1} einzusetzen ⁷⁰. Durch unterschiedliche Perfusionsgeschwindigkeitsraten im Flusskammermodell kann der Volumenstrom und somit die Scherrate modifiziert werden. Der Volumenstrom kann außerdem durch verschiedene Spritzengrößen verändert werden. Der Volumenstrom (Q) hängt von der Fläche des Spritzenstempels (A) und der Geschwindigkeit (v), mit der der Stempel durch die Spritze gedrückt wird, ab:

$$Q = A \cdot v \left[\frac{\text{ml}}{\text{h}} \right]$$

Somit ist der Volumenstrom direkt proportional zur Fläche A (zu r^2) des Stempels. Für die Experimente mit der Flusskammer wurden zwei Arten von Spritzen verwendet, eine 1 ml-Spritze mit einem Radius von 2,25 mm und eine 5 ml-Spritze mit einem Radius von 6 mm.

Material und Methoden

2.2.3 Vorbereitung der Deckgläser

Die Deckgläser mit der Fläche 24 x 60 mm wurden in eine Färbekammer gelegt. Um eine feuchte Inkubation der Deckgläser zu ermöglichen, wurde Zellstoff mit Wasser getränkt und zu den Deckgläsern in die Färbekammer gelegt.

Als Matrix diente in diesem Flusskammerversuch das Kollagenreagens Horm® (Suspension mit Kollagenfibrillen Typ I aus Pferdesehnen). Um eine Konzentration von 100 µg/ml Kollagenlösung zu erreichen, wurde das Kollagen Reagens mit SKF-Lösung, einer Glukoselösung, vermischt. Anschließend wurden 200 µl dieser Kollagenlösung auf die Deckgläser gegeben und mit einer Pipettenspitze verteilt. Die Deckgläser wurden über Nacht bei 4 °C in der Feuchtkammer inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die über Nacht inkubierten Deckgläser mit 200 µl einer 1% BSA-Lösung (in PBS gelöst) für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde der Überstand auf den Deckgläsern mit einem Tuch abgesaugt.

Schließlich wurden die Deckgläser in vier verschiedenen Ansätzen nochmals für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 200 µl vier verschiedener Reagenzien auf dem Schüttler inkubiert.

Neben der Inkubation mit PBS + Ca²⁺ und in PBS + Ca²⁺ gelöstem Glykoprotein-VI-Fc (GPVI-Fc) in einer Konzentration von 40 µg/ml wurden zwei Arten von Nanopartikeln (200 nm) verwendet.

Diese Nanopartikel wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml (in PBS + Ca²⁺ gelöst) auf die Deckgläser gegeben. Zum einen waren es mit 40 µg GPVI pro mg Partikel beladene Nanopartikel mit dem Fluoreszenzfarbstoff „nile red“, zum anderen waren es mit BSA beladene Nanopartikel, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff „coumarin 6“ versetzt waren.

2.2.4 Vorbereitung der Flusskammer

Nach der Inkubation auf dem Schüttler wurde der Überstand auf den Deckgläsern erneut mit einem Tuch abgesaugt. Danach wurde das Deckglas mithilfe einer 1 ml-Spritze PBS + Ca²⁺-gefüllt in die Flusskammer eingespannt. Zur Fixierung

Material und Methoden

dienten die für die Flusskammer hergestellten Schraubvorrichtungen (siehe Abbildung 6).

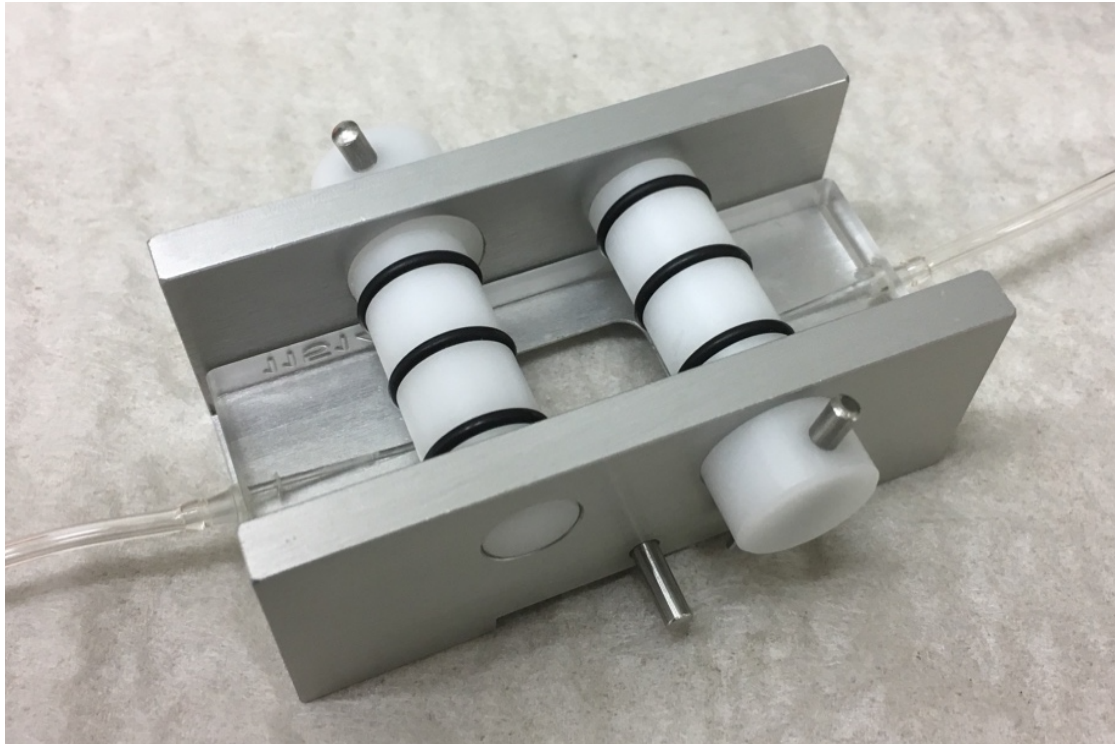


Abbildung 6: Flusskammer mit eingespanntem Cover-Slip.

2.2.5 Durchführung der Flusskammerexperimente

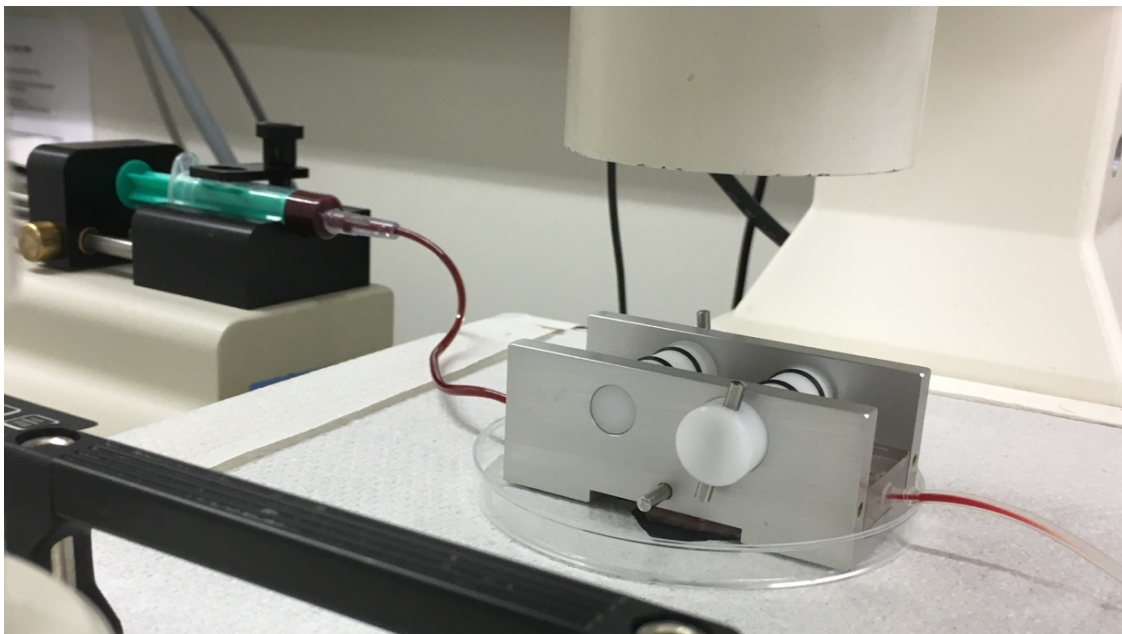


Abbildung 7: Flusskammer unter dem Mikroskop während der Blutperfusion. Im Bildhintergrund: im Perfusor eingespannte Spritze mit Blutprobe.

Material und Methoden

2.2.5.1 Scherraten-abhängige Thrombusbildung im Perfusionsmodell

Im Folgenden wurde CPDA-Blut (in Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin-Lösung) von gesunden humanen Spendern entnommen und im Verhältnis 5:1 mit PBS + Ca^{2+} vermischt. Wie in Kapitel 2.2.2 erklärt, hängt die in der Flusskammer wirkende Scherrate vom Volumenstrom ab, sodass im Folgenden stets von der Scherrate im Versuchssystem gesprochen wird. Die untersuchten Scherraten betragen 1000 s^{-1} , 1700 s^{-1} und 3500 s^{-1} . Bei den Scherraten 1000 s^{-1} und 1700 s^{-1} wurde 1 ml dieses Gemisches in eine 1 ml Spritze aufgezogen, wohingegen bei der Scherrate 3500 s^{-1} eine 5 ml Spritze verwendet wurde, die jedoch nur mit 2 ml des Blut-Puffer-Gemisches befüllt wurde. Dann wurde das Blut mit einem definierten Volumenstrom durch die Flusskammer perfundiert (siehe Abbildung 7 und schematisch Abbildung 8). Nach der Blutperfusion wurde die Flusskammer mit einer PBS + Ca^{2+} -befüllten Spritze gleicher Größe gespült. Das war notwendig, um eine mikroskopische Fotodokumentation und anschließende Bildauswertung zu ermöglichen, da das Licht des Mikroskops vom Blut (vor allem von den Erythrozyten) in großem Ausmaß abgeschwächt wurde.

Unter 20-facher Vergrößerung wurden mit dem Lichtmikroskops Axiovert 200 und der Axio Cam die verschiedenen Abschnitte der Flusskammer (vorderer, mittlerer und hinterer) dokumentiert, wobei von jedem Durchlauf der Flusskammer sechs Bilder, je zwei Bilder von jedem Abschnitt, gemacht wurden. Bei der Auswertung mithilfe der Axio Vision-Software (AxioVS40 V 4.8.2.0) wurde dann je ein Bild aus jedem Abschnitt der Flusskammer für die Analyse der Thrombengröße verwendet.

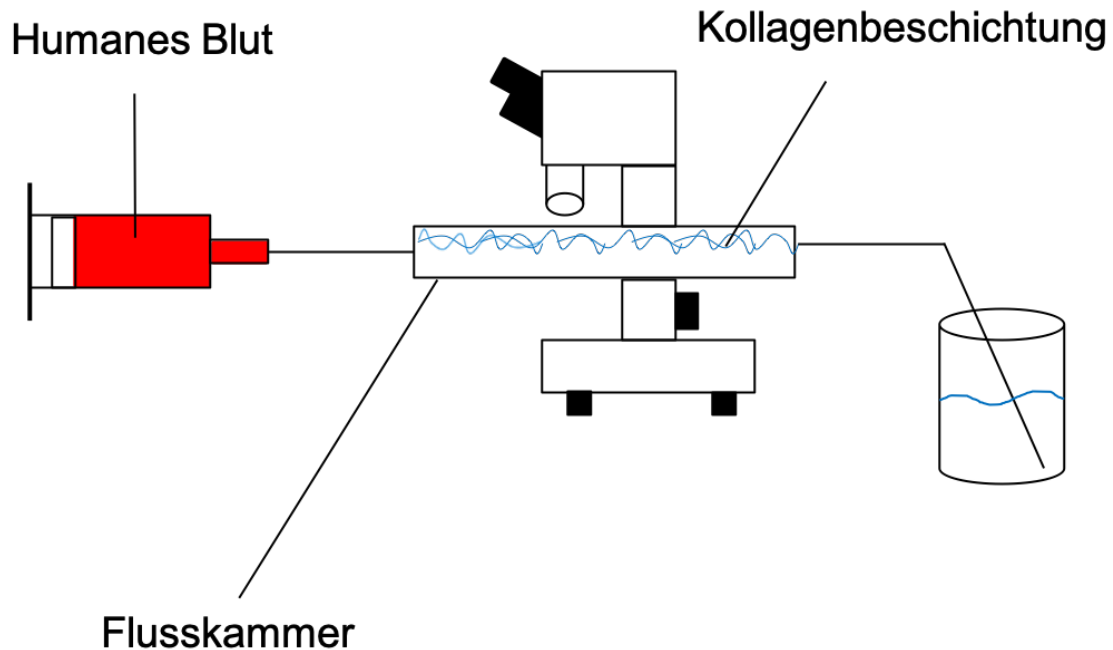


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Blutperfusion durch die Flusskammer.

Zu beachten sei die Kollagenbeschichtung innerhalb der Flusskammer, die durch die Cover-Slips einseitig angebracht wird.

Die gebildeten Thromben wurden in ihrer Kontur manuell erfasst. Daraus folgte die Messung des Flächeninhalts der Thromben in μm^2 .

Die Messwerte dienen einerseits der quantitativen Analyse der von Thromben bedeckten Fläche und andererseits zur quantitativen sowie qualitativen Analyse der einzelnen Thromben.

2.2.5.2 Nanopartikel Adhäsion unter dynamischen Bedingungen im Perfusionsmodell

In diesem Versuchsaufbau wurden die Nanopartikel in einer Konzentration von $400 \mu\text{g/ml}$ in $\text{PBS} + \text{Ca}^{2+}$ gelöst und unter einer Scherrate von 1700 s^{-1} durch die Flusskammer perfundiert (siehe Abbildung 9). Dieser Versuch wurde mit dem Lichtmikroskop Axiovert 200 in 20-facher Vergrößerung und unter Verwendung eines Fluoreszenz-Kanals mit dem Farbstofffilter Rhodamin ($546/586 \text{ nm}$) in Form einer Bilderreihe dokumentiert.

Material und Methoden

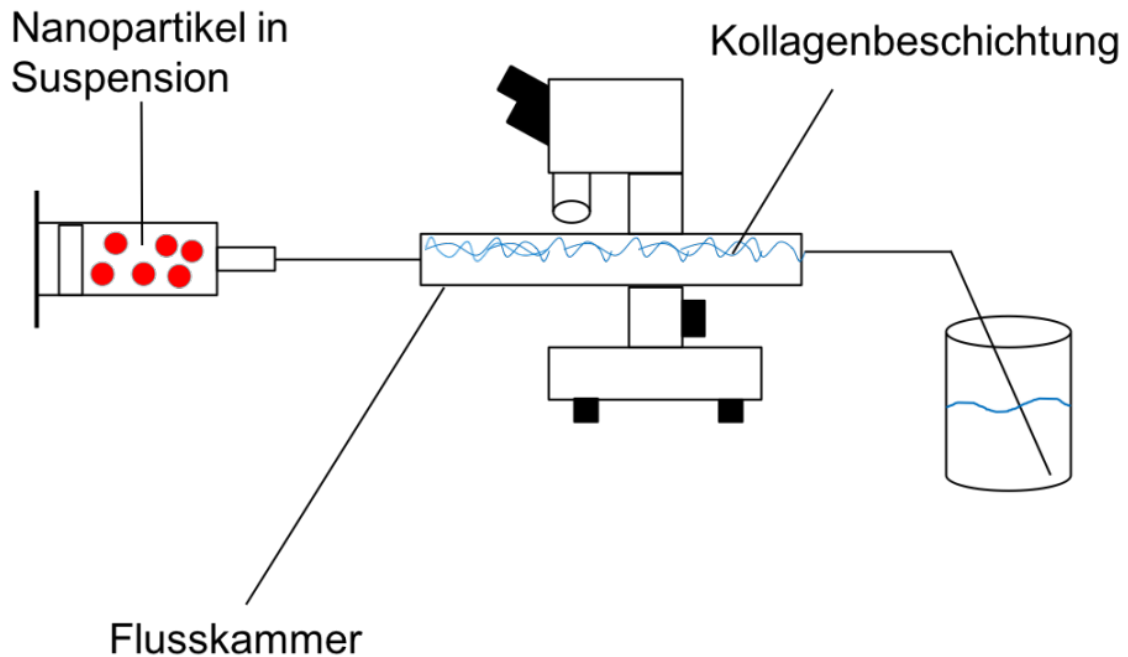


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Nanopartikelperfusion durch die Flusskammer.

2.3 Impedanzaggregometrie

2.3.1 Benötigte Materialien

Reagenzien

Isotonische Fresenius	Kochsalzlösung	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
Nanopartikel		Technion- Israel Institute of Technology, Haifa, Israel advanceCOR GmbH, Martinsried, Deutschland
GPVI-Fc		Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland
COLtest (Kollagenreagenz für den Multiplate® Analyzer)		

Material und Methoden

Verbrauchsmaterialien

S-Monovette® 3,5ml Hirudin	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® 1,6ml Hirudin	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Test Cells (Einweg-Messzelle für den Multiplate® Analyzer)	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland

Geräte

Multiplate® Analyzer	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland
----------------------	--

Probe

Hirudin-Vollblut	gesunde humane Spender
------------------	------------------------

2.3.2 Funktionsweise des Multiplate® Analysers

Der Multiplate® Analyser basiert auf der Impedanzaggregometrie^{72,73}. Dabei wird der elektrische Widerstand (Impedanz) zwischen zwei silberbeschichteten Elektroden, die in Kontakt zu humanem Heparin-Blut stehen, gemessen. Durch die Zugabe von löslichen Agonisten zum Blut wird die Aggregation der Thrombozyten forciert, wodurch der Widerstand zwischen den Elektroden aufgrund der entstehenden Thromben ansteigt. Dieser Anstieg kann graphisch in Form einer Kurve dargestellt werden, wobei besonders die Area under the curve (AUC) der quantitativen Analyse des Widerstandes zwischen den Elektroden und folglich auch der Thrombusbildung dient. Grundsätzlich können

Material und Methoden

für den Multiplate® Analyser mehrere Agonisten verwendet werden ⁷⁴. In den folgenden Versuchen wurde mit dem COLtest (Kollagen Typ I) gearbeitet.

2.3.3 Vorbereitung des Kollagenreagenz

Das für das Multiplate® Aggregometer verwendete Kollagenreagenz wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in vier verschiedenen Ansätzen inkubiert. Neben PBS + Ca²⁺ und in PBS + Ca²⁺ gelöstem GPVI-Fc in einer Konzentration von 40 µg/ml wurden die Nanopartikel, wie zuvor im Flusskammerversuch (siehe 2.2.3) beschrieben, verwendet. Die Nanopartikel wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS + Ca²⁺ gelöst.

2.3.4 Durchführung der Impedanzaggregometrie

Zu Beginn wurden 300 µl des humanen Hirudin-Vollblutes mit 300 µl 0,9% NaCl-Lösung bei 37 °C in den Einweg-Messzellen für drei Minuten inkubiert. Das Gemisch wurde durch ein Rührstab in den Einweg-Messzellen vermischt. Danach wurde das vorinkubierte Kollagenreagenz zu dem Blut-Gemisch gegeben und die Messung über sechs Minuten gestartet ⁷⁵.

2.4 Thrombelastographie (TEG)

2.4.1 Benötigte Materialien

Reagenzien

Nanopartikel	Technion- Israel Institute of Technology, Haifa, Israel
GPVI-Fc	advanceCOR GmbH, Martinsried, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

S-Monovette® 5.5ml LH	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
PlateletMapping® ADP- Testkassette	

Material und Methoden

	Haemonetics,	Braintree,
	Massachusetts, USA	
Geräte		
TEG 6s-Hämostase-Analysegerät	Haemonetics,	Braintree,
	Massachusetts, USA	
Probe		
Li-Heparin-Blut	gesunde humane Spender	

2.4.2 Funktionsweise des TEG 6s-Hämostase-Analysegerätes

Das TEG 6s ist ein vollautomatisches Diagnose System, das unter Verwendung einer Testkassetten die Viskoelastizität des Blutes mittels Thrombelastographie analysiert. Dabei wird der Thrombusauf- und der Thrombusabbau in Echtzeit unter niedrigen Scherraten ($0,1 \text{ s}^{-1}$), wie sie in den großen herznahen venösen Gefäßen herrschen, untersucht. Bei der Messung mittels TEG wird insbesondere das Zusammenspiel von Gerinnungsfaktoren, Erythrozyten, Thrombozyten und Antikoagulantien erfasst. Dabei werden "clotting time" (R), "clot kinetics" (K), "clot strengthening rate" (α), "maximum clot strength" (MA) sowie "clot breakdown" (LY 30) analysiert. "Clotting time" beschreibt die Zeit bis zur Entstehung eines 2 mm großen Thrombus. "Clot kinetics" stellt die Kinetik der Veränderung der Thrombusgröße von 2 bis 20 mm dar. "Clot strengthening rate" gibt den Winkel α der Steigung der Kurve von R an. "Maximum clot strength" beschreibt die Maximale Thrombozyten-Fibrin-Stärke in mm. "Clot breakdown" gibt die Reduktion der Thrombusgröße in % nach 30 Minuten an.

In einer Testkassette befinden sich vier separate Analysekanäle, die jeweils mit vier verschiedenen Reagenzien beschichtet sind, die mit dem durch die Kanäle geleitetem Blut reagieren. In diesem Versuch wurde die PlateletMapping® ADP-Testkassette mit einer Li-Heparin Blutprobe verwendet. In den vier Analysekanälen der Testkassette befinden sich folgende Reagenzien: (1) Kaolin + Heparinase, (2) Activator F (Faktor XIII) + Abxicimab, (3) ADP + Activator F (4) Arachidonsäure + Activator F ⁷⁶.

2.4.3 Durchführung der TEG unter Einfluss der GPVI-Nanopartikel

Für die Durchführung der TEG 6s Analyse sollte das Volumen des Li-Heparin-Vollblutes 600 µl betragen. Die GPVI-Nanopartikel wurden in einer Konzentration von 300 µg/ml zum Li-Heparin-Vollblut gegeben, sodass das Gesamtvolumen des Nanopartikel-Blut-Gemisches 600 µl betrug. In zwei weiteren Ansätzen wurde einerseits GPVI-Fc in PBS gelöst in einer Konzentration von 50 µg/ml zum Probenblut gegeben, wobei die Gesamtmenge an zusätzlichem Reagenz gleich der Menge der im anderen Versuch zugegebenen Nanopartikel-Lösung entsprach. Anschließend wurde die Blutprobe in den dafür vorgesehenen Probenbehälter der Testkassette pipettiert.

2.5 Durchflusszytometrie der Nanopartikel

2.5.1 Benötigte Materialien

Reagenzien

Nanopartikel	Technion- Israel Institute of Technology, Haifa, Israel
--------------	---

Geräte

Durchflusszytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
---------------------	---

2.5.2 Funktionsweise des Durchflusszytometers (FACS)

Bei der Durchflusszytometrie – auch fluorescence-activated cell sorting genannt – werden Zellen einzeln nach ihrer Größe und ihrer Granularität erfasst. Zudem können Zellbestandteile im Voraus mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und ebenfalls detektiert werden. Dabei werden die Zellen in einer Suspension in laminarer Strömung einzeln durch eine Messvorrichtung geleitet. An einem

Material und Methoden

bestimmten Punkt fällt ein gezielter Lichtstrahl, der durch einen Laser generiert wird auf die Zelle. Im Folgenden wird das emittierte Licht analysiert – in Form des Foreward Scatter (FSC) und des Side Scatter (SSC) ⁷⁷.

2.5.3 Durchführung der Nanopartikelanalyse

Die Nanopartikel wurden im FACS im SSC-FSC-Kanal analysiert und anschließend in verschiedenen Fluoreszenzkanälen auf ihre Fluoreszenzeigenschaften hin untersucht. Die Durchführung der FACS-Analyse erfolgte unter der Anleitung von Herrn Frederic Emschermann.

2.6 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen GraphPad Prism 7.0 und SPSS Statistics Version 26 unter der Verwendung der "Einfaktoriellen ANOVA".

Neben dem Mittelwert wird zudem der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben (Mittelwert \pm SEM).

$P < 0.05$ wurde als statistisch signifikant in einem 95% Konfidenzintervall angegeben und in den Abbildungen mit einem Stern (*) markiert. Zwei Sterne (**) entsprechen einem $p < 0,01$ und werden als hochsignifikant angegeben.

2.7 Studienprofil

Es liegt ein Ethikvotum der Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität und am Universitätsklinikum Tübingen mit dem Aktenzeichen 238/2018BO2.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkung der Scherrate auf die Thrombusbildung im Flusskammermodell

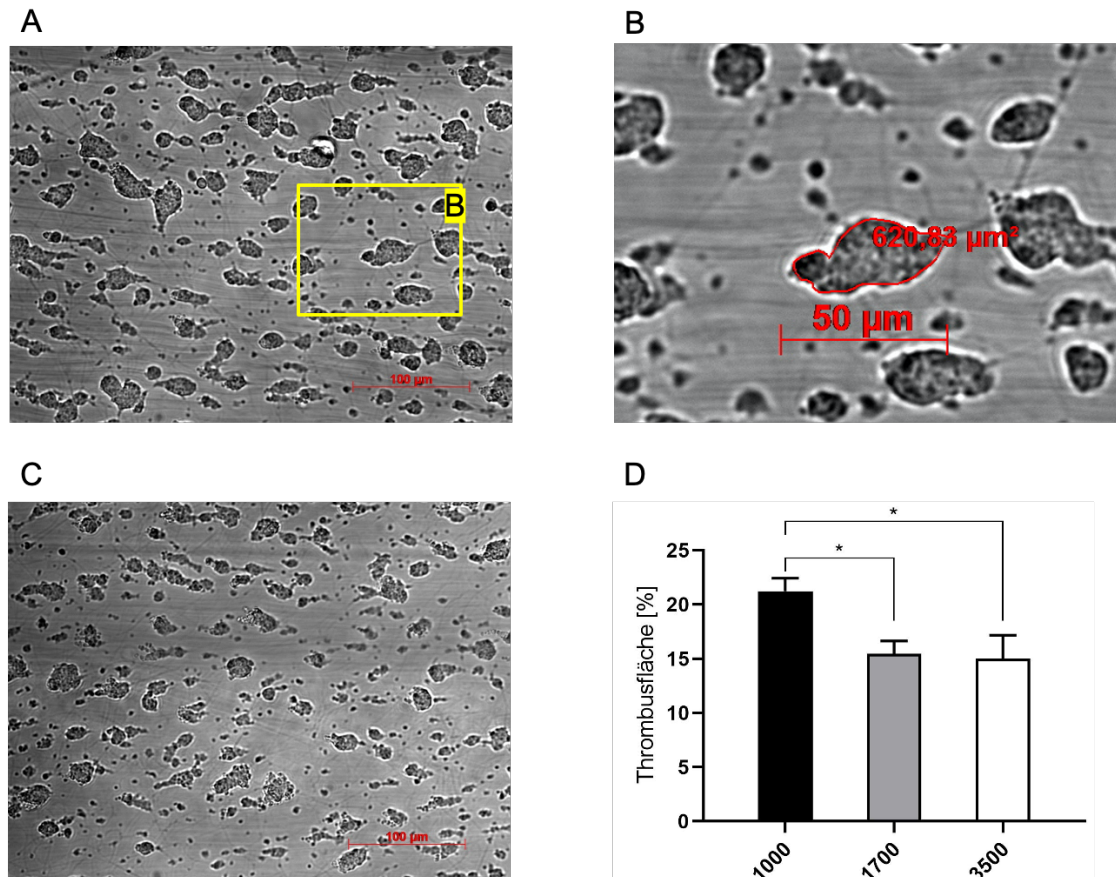


Abbildung 10: Bilder unterschiedlicher Flusskammerabschnitte unter verschiedenen Scherraten (die dunklen runden Herde stellen die einzelnen Thromben dar). Perfusion von 1ml Blut-Puffer-Gemisch mit anschließender Spülung mit 1ml Puffer A: Mikroskopisches Bild eines Flusskammerabschnittes in 20-facher Vergrößerung nach Blutperfusion unter einer Scherrate von $1000\ s^{-1}$. B: Vergrößerter Bildausschnitt aus A. Ein Thrombus wird beispielhaft manuell in seiner Größe vermessen, wobei die Fläche von der Axio Vision (AxioVS40 V 4.8.2.0)-Software automatisch berechnet wird. C: Mikroskopisches Bild eines Flusskammerabschnittes in 20-facher Vergrößerung nach Blutperfusion unter einer Scherrate von $1700\ s^{-1}$. D: Quantitative Auswertung der Thrombusbildung unter den Scherraten $1000\ s^{-1}$ ($n = 6$), $1700\ s^{-1}$ ($n = 6$) und $3500\ s^{-1}$ ($n = 4$) in % anteilig am Gesamtbild. Die graphische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 8.00 und der statistischen one-way ANOVA-Testauswertung ($p < 0,05$ *).

Ergebnisse

In diesem Abschnitt sollte die Thrombusbildung im Flusskammermodell (siehe Kapitel 2.2) unter der Einwirkung verschiedener Scherraten untersucht werden. Nach der Auswahl dreier Bilder aus einem Durchlauf des Flusskammer-Experiments wurde jeweils die von Thrombus bedeckte Fläche anteilig an der Gesamtfläche der Aufnahmen ausgewertet, indem die einzelnen Thromben in ihrer Ausbreitung manuell erfasst wurden (siehe Abbildung 10 A und B). D zeigt zudem die statistische Auswertung der Thrombusbildung unter den Scherraten 1000, 1700 sowie 3500 s⁻¹. Aufgrund der Tatsache, dass bei den Scherraten 1000 s⁻¹ und 1700 s⁻¹ jeweils das gleiche Volumen an Blut/Puffer-Gemisch (1 ml) verwendet wurde, kann man schließen, dass die Thrombusbildung mit steigender Scherrate abnimmt. Bei 3500 s⁻¹ wurde 2 ml an Blut/Puffer-Gemisch verwendet. Abbildung 10 A zeigt die Thrombusbildung bei 1000 s⁻¹, C zeigt die Thrombusbildung bei 1700 s⁻¹. Aus D wird ebenfalls ersichtlich, dass die Thrombusfläche im Vergleich der Scherraten 1700 s⁻¹ und 3500 s⁻¹ nicht zu einer unterschiedlich großen Thrombusgesamtfläche geführt hat.

3.2 Nanopartikel

3.2.1 Darstellung der Größe und Fluoreszenz mittels FACS

Die Nanopartikel konnten mittels FACS sowohl in der SSC-FSC-, wie auch in der Fluoreszenz-Analyse dargestellt werden (Abbildung 11). Laut Herstellerangaben besitzen die Nanopartikel eine Größe von 200 nm. Abbildung 11 C zeigt, dass die Nanopartikel in ihrer Größe eine gewisse Varianz aufweisen, da sie im gesamten Spektrum des FSC-Kanals erfasst wurden. Die Fluoreszenz der Nanopartikel resultiert laut Herstellerangaben aus dem Fluoreszenzfarbstoff „nile red“, mit Excitations- bzw. Emissions-Maxima bei 552/636 nm in Methanol⁷⁸. Die Fluoreszenzanalyse wurde vor allem im Fluoreszenzkanal 2 des Durchflusszytometers durchgeführt, da dieser laut Herstellerangaben einen Fluoreszenzbereich von 585/42 nm abbildet. Abbildung 11 A und B zeigen die Fluoreszenz- beziehungsweise SSC-FSC-Analyse der Kontrolle mit PBS im Vergleich zu Abbildung 11 C und D, in denen die Nanopartikel auf ihre

Ergebnisse

Fluoreszenz und ihre Aufteilung im FSC-Kanal untersucht wurden. Die Nanopartikel zeigen im Vergleich zur PBS Probe eine deutliche Fluoreszenzeigenschaft im untersuchten Spektrum.

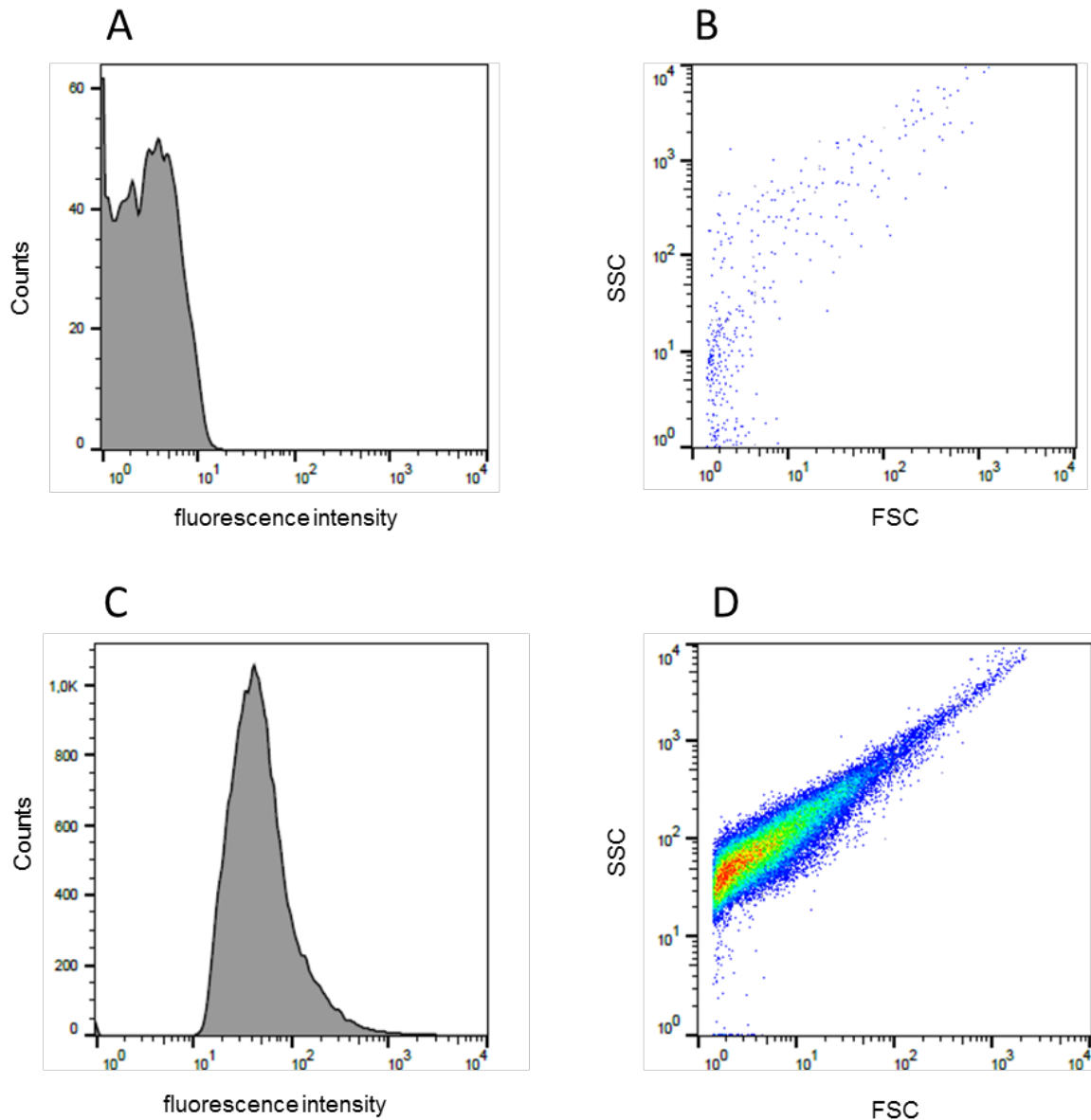


Abbildung 11: FACS-Analyse Nanopartikel. A: Fluoreszenzintensität der PBS-Kontrolle (Wellenspektrum 585/42 nm). B: FSC-SSC-Darstellung der PBS-Kontrolle. C: Fluoreszenzintensität der Nanopartikel mit Emissions-Maxima bei 552/636 nm (Fluoreszenzkanal 2: 585/42). D: SSC-FCS-Darstellung der Nanopartikel.

Ergebnisse

3.2.2 Mikroskopische Darstellung der Nanopartikel

Die Nanopartikel konnten unter dem Mikroskop (20er-Objektiv) mithilfe des Fluoreszenzkanals dargestellt werden, nachdem sie auf den mit Kollagen beschichteten Cover Slips für eine Stunde inkubiert wurden. Die Aufnahmen der Fluoreszenz durch die Axio Cam und die Axio Vision (AxioVS40 V 4.8.2.0)-Software erfolgte in Graustufen. Erst die nachträgliche Bearbeitung der Bilder mithilfe der Bildbearbeitungssoftware „Image J“ ermöglichte die farbliche Darstellung der Nanopartikel (siehe Abbildung 12 A), wobei die Bilder dann durch den Wechsel von Graustufen zu Farbe keine reale Abbildung der Nanopartikel möglich machte, wie sie mit dem Auge durch das Okular sichtbar waren. Um trotzdem einen möglichst realistischen Eindruck der Nanopartikel zu gewinnen, wurde eine Kameraaufnahme durch das Okular des Mikroskops durchgeführt, wie es in Abbildung 12 B sichtbar ist. Aufgrund dieser Aufnahmeart ist es jedoch nur bedingt möglich, ein Größenverhältnis anzugeben. Der in Abbildung 12 B gezeigte Maßstab wurde nachträglich mithilfe der gleichen Aufnahme eines Objektmikrometers durch das Okular erstellt. Aus Abbildung 12 insbesondere A wird ersichtlich, dass die Fluoreszenzsignale der Nanopartikel nicht zufällig verteilt auftreten, sondern eine gewisse fadenförmigen Anordnung aufweisen. Zudem wird aus Abbildung 12 A und B erkennbar, dass es stets Abschnitte in der Flusskammer gibt, in denen die Nanopartikel punktförmig auf einem "Fleck" auftreten.

Ergebnisse

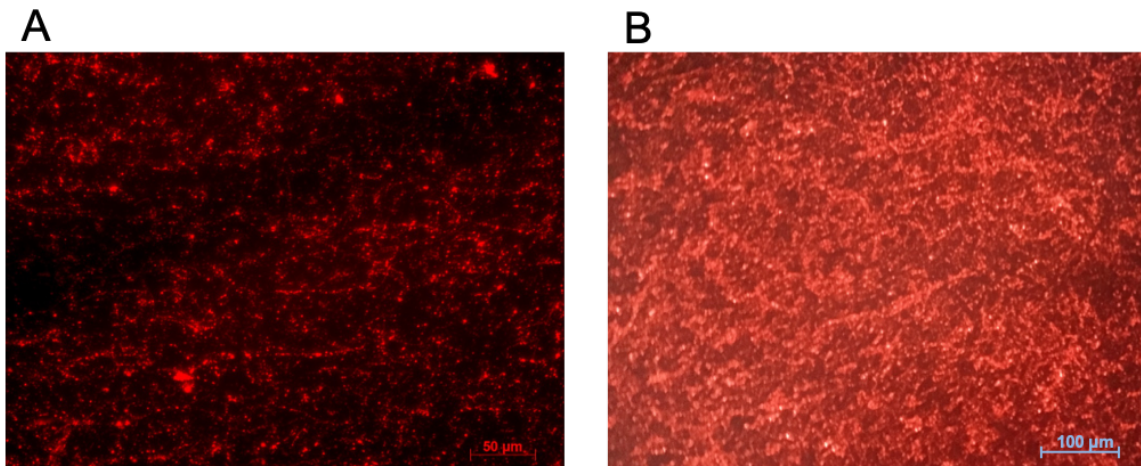


Abbildung 12: GPVI-Nanopartikel unter dem Mikroskop. A: Das Fluoreszenzsignal der Nanopartikel wurde digital von Graustufen zu roter Farbe umgewandelt. B: Fotografie durch das Okular des Mikroskops. (Die Cover-Slips wurden in A und B mit jeweils 200 µl einer Nanopartikellösung (1 mg/ml) für eine halbe Stunde inkubiert).

3.2.3 Bindung der Nanopartikel an Kollagenstrukturen über den zeitlichen Verlauf

In diesem Experiment sollte die Anlagerung der GPVI-Nanopartikel im dynamischen Modell über den zeitlichen Verlauf an die Kollagenfäden (Kollagen Typ I) innerhalb der Flusskammer untersucht werden. Die Bilder sind original in Graustufen belassen. Ausgehend von den Bildern dieses Experimentes kann der Schluss gezogen werden, dass sich die mit GPVI beladenen Nanopartikel über den zeitlichen Verlauf in der Flusskammer ansammeln. Abbildung 15 zeigt eine Bilderauswahl aus der beiliegenden Videodatei, wobei die Chronologie als Nummerierung an den Bildern angegeben ist. Die teilweise unscharfen Bildausschnitte des beiliegenden Videos sind der Tatsache geschuldet, dass die Schärfe der Bilder manuell während der Perfusion eingestellt wurde. Abbildung 13 zeigt bei gleicher Versuchsanordnung und -durchführung den stets gleichen Abschnitt der Flusskammer mit entsprechenden Zeitpunkten im Experiment. Das Fluoreszenzsignal aus Abbildung 13 wurde mithilfe des Programms Image J in Abbildung 14 quantifiziert. Mit steigendem Zeitverlauf steigt auch der Anteil Fläche mit

Ergebnisse

gemessenem Fluoreszenzsignal. Ähnlich wie in Abbildung 12 ordnen sich die Nanopartikel nicht zufällig, sondern fadenförmig an.

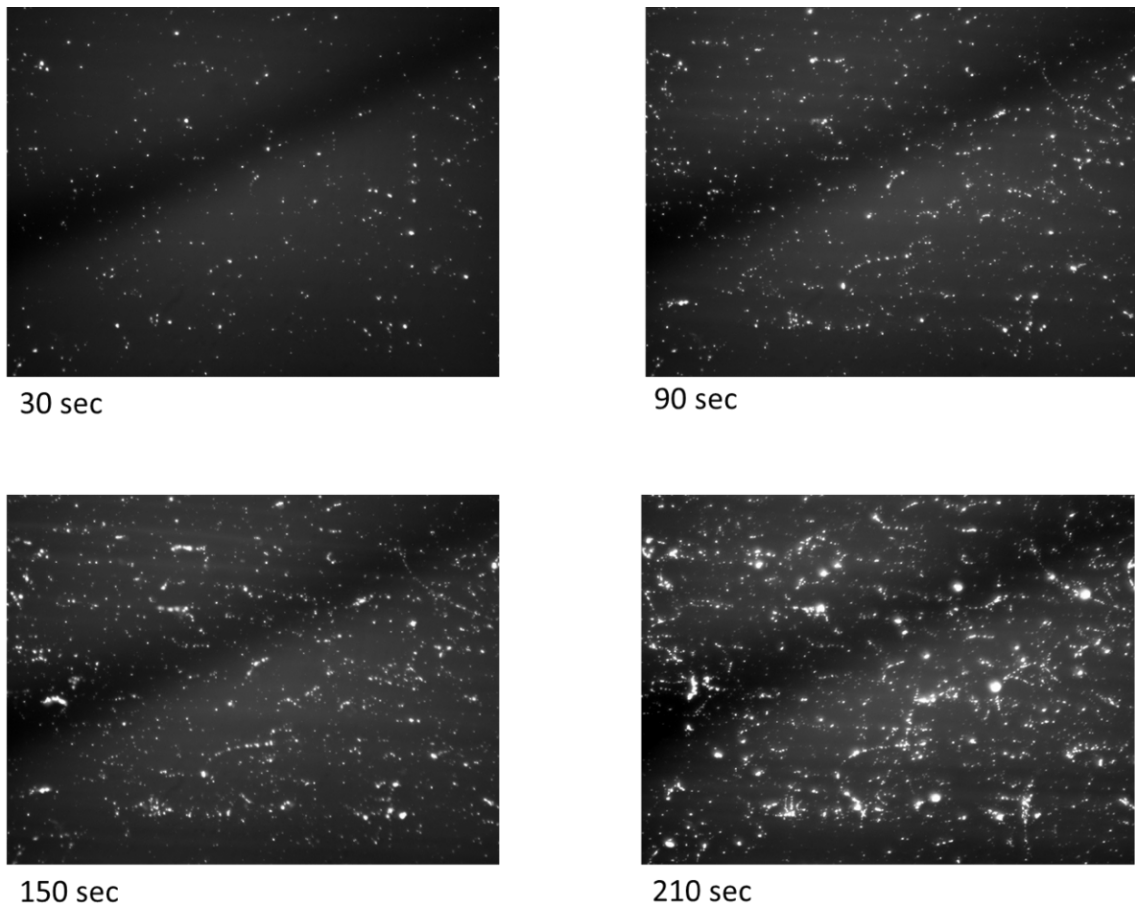


Abbildung 13: Fluoreszenzaufnahmen der GPVI-Nanopartikel im zeitlichen Verlauf.

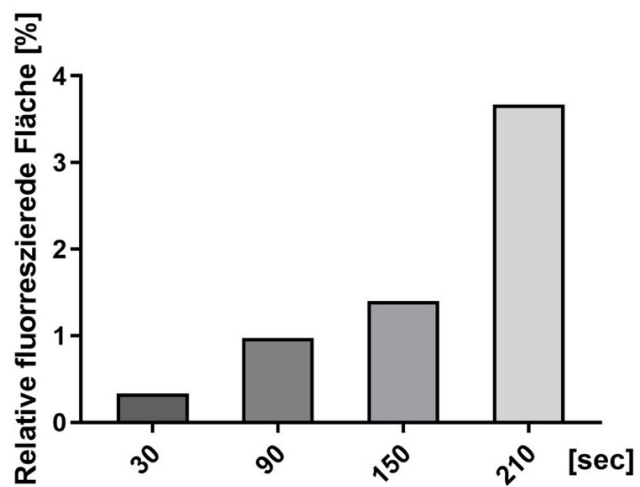


Abbildung 14: Anteil der Fläche mit Fluoreszenz-Signal an der Gesamtfläche aus Bildern der Abbildung 13.

Ergebnisse

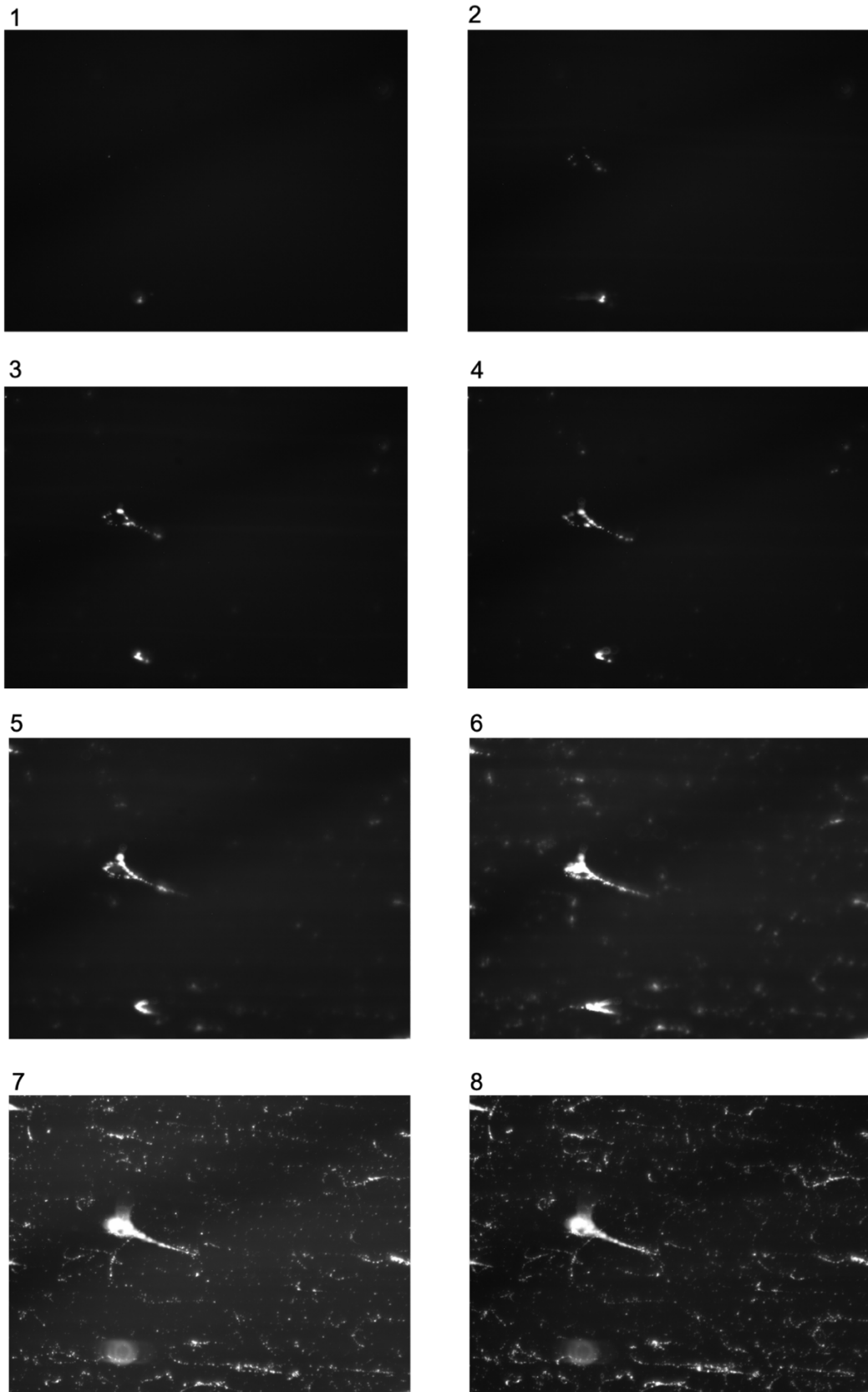


Abbildung 15: Bilderauswahl der Nanopartikelanlagerung aus beiliegender Videodatei. Nummerierung nach Chronologie.

Ergebnisse

3.2.4 Spezifität der Bindung der Nanopartikel über den GPVI-Rezeptor

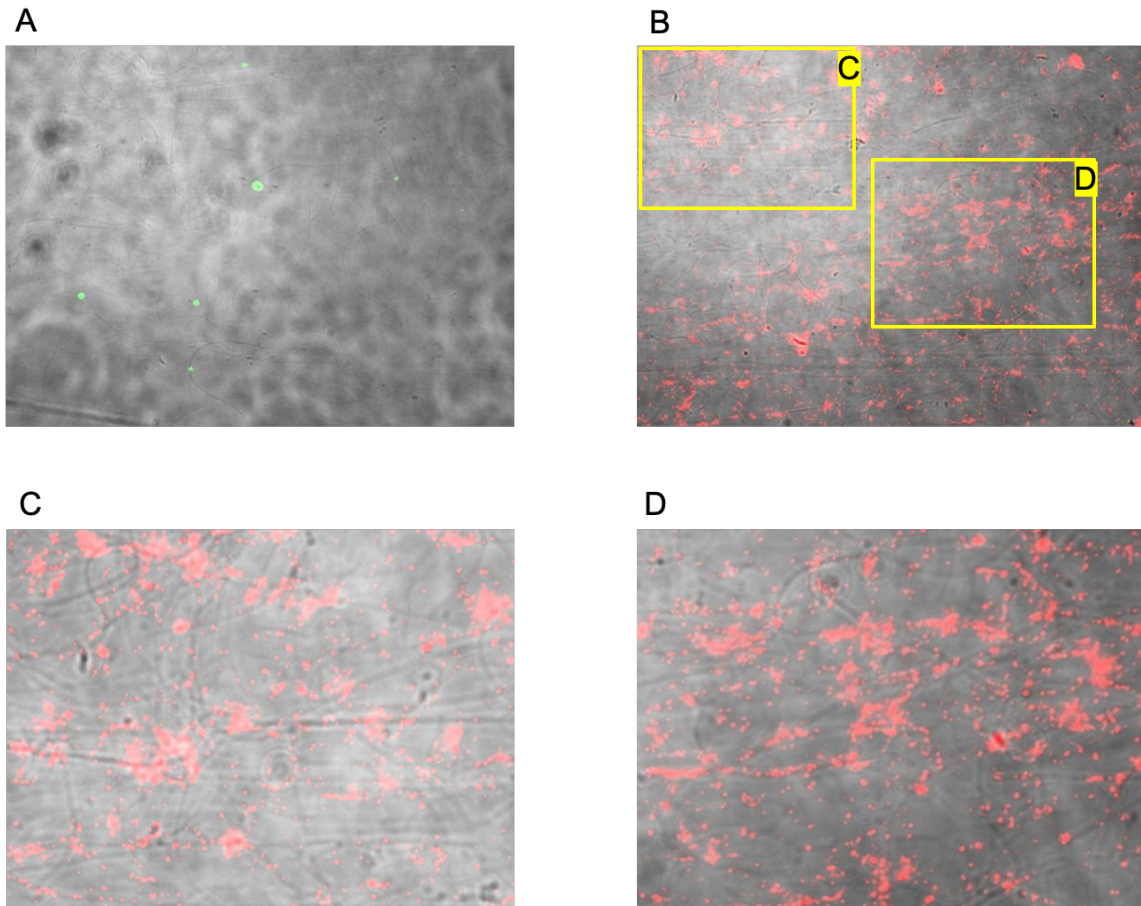


Abbildung 16: Nanopartikel auf Kollagenfibrillen. A: BSA-Nanopartikel-Fluoreszenzsignal in Grün auf den Kollagenfibrillen. B: GPVI-Nanopartikel-Fluoreszenzsignal in Rot auf den Kollagenfibrillen. A und B im gleichen Bildausschnitt. C und D Vergrößerungen von B.

Um zu untersuchen, ob die Nanopartikel mittels des GPVI-Rezeptors an die Kollagenstrukturen binden, wurden Nanopartikel mit GPVI beladen mit Nanopartikeln gleicher Größe und Form, jedoch mit BSA beladen, verglichen. Beide Arten Nanopartikel wurden wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben auf den Coverslips inkubiert und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet. Es wurden zur Dokumentation jeweils zwei Aufnahmen gemacht, wobei die Kollagenstrukturen im Normallicht- und die Nanopartikel im Fluoreszenzkanal erfasst wurden. Abbildung 16 A zeigt die mit BSA beladenen Nanopartikel in Grün (Fluoreszenzfarbstoff „coumarin 6“), Abbildung 16 B zeigt die mit 40 µg/mg

Ergebnisse

Partikel beladenen Nanopartikel (Fluoreszenzfarbstoff „nile red“) auf den Kollagenfäden. Anschließend wurden die einzelnen Aufnahmen mithilfe der Image J-Software zu einem Bild zusammengefasst. Auf Grundlage der Abbildung 16 C und D (Vergrößerung von Abbildung 16 B) wird ersichtlich, dass ein erhöhtes Fluoreszenzsignal und somit eine erhöhte Nanopartikelmenge nur dann vermehrt an Kollagenfäden visualisierbar ist, wenn die Nanopartikel mit GPVI beladen sind.

3.3 Einfluss der Nanopartikel auf die Thrombusbildung im Flusskammer-Modell

3.3.1 Analyse der Thrombusfläche unter Einfluss der Nanopartikel

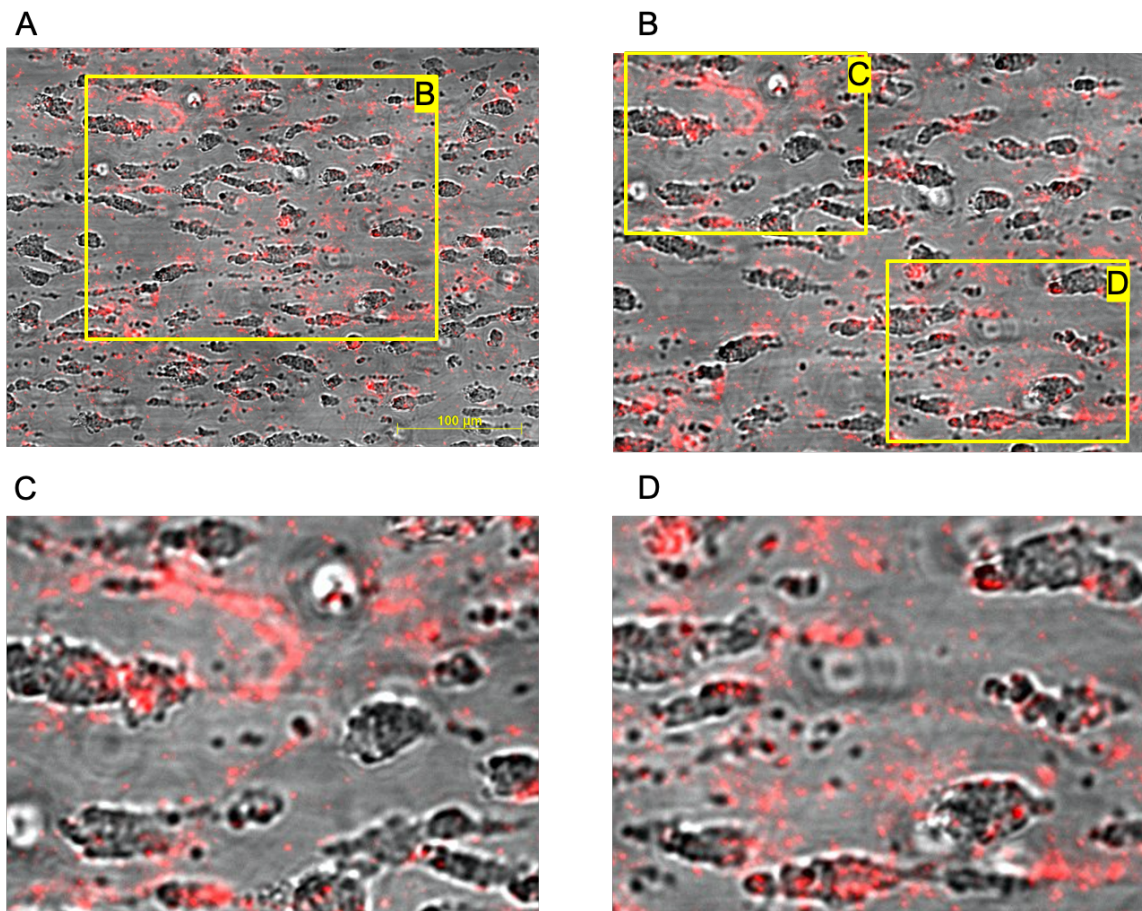


Abbildung 17: Thrombusbildung und Fluoreszenzsignal der GPVI-Nanopartikel. Die zwei einzelnen Bilder aus Thrombusbildung und Fluoreszenzsignal wurden mithilfe der Software Image J zusammengefügt. (Scherrate 3500 s^{-1}) A: Bild in 20-facher Vergrößerung. B: Bildausschnitt aus A. C und D: Bildausschnitt aus B.

In diesem Experiment sollte die Auswirkung der Nanopartikel auf die Thrombusbildung im Flusskammer-Modell untersucht werden. Dazu wurden die Cover Slips (mit Kollagen beschichtet) in vier verschiedenen Ansätzen inkubiert (siehe 2.2.3). Im Folgenden wurden drei Bilder aus dem jeweils vorderen,

Ergebnisse

mittleren und hinteren Abschnitt der Flusskammer ausgewählt und die Aufnahmen manuell ausgewertet wie in 3.1 beschrieben. Neben der Aufnahme der Thromben durch den klassischen Lichtgang des Mikroskops, wurden auch Aufnahmen der Fluoreszenz gemacht. Um die Interaktion von Nanopartikeln und Thrombozyten in der Thrombusbildung zu untersuchen, wurden Fluoreszenz- und klassische Aufnahmen mithilfe der Image J-Software zusammengeführt. Abbildung 17 zeigt diese Zusammenführung, wobei das Bild der Flusskammer in Graustufen belassen wurde und die Fluoreszenz der Nanopartikel mithilfe von Image J von Graustufen auf rote Farbe geändert wurde. In Abbildung 17 A ist ein Bild unter der Scherrate 3500 s^{-1} dargestellt. Abbildung 17 B zeigt den vergrößerten Bildausschnitt aus A. Abbildung 17 C und D zeigen den jeweils vergrößerten Bildausschnitt aus B. Abbildung 18 zeigt die quantitative Analyse der anteilig mit Thrombus bedeckten Fläche anteilig an der Gesamtfläche unter den vier Versuchsansätzen PBS, BSA- sowie GPVI- Nanopartikel und löslichem GPVI unter den Scherraten 1000 s^{-1} (A), 1700 s^{-1} (B) und 3500 s^{-1} (C). Aus Abbildung 18 C wird ersichtlich, dass die Inkubation mit GPVI beladenen Nanopartikeln im Vergleich zur Inkubation mit BSA-Nanopartikeln bei der Scherrate 3500 s^{-1} zu einer verringerten Thrombusbildung führt ($p < 0,05$ *). Bei allen Scherraten stellt sich zudem heraus, dass gelöstes GPVI in einer Konzentration von $40 \mu\text{g/ml}$ im Vergleich zur PBS-Kontrolle nicht zu einer signifikant verringerten Thrombusbildung führt.

Ergebnisse

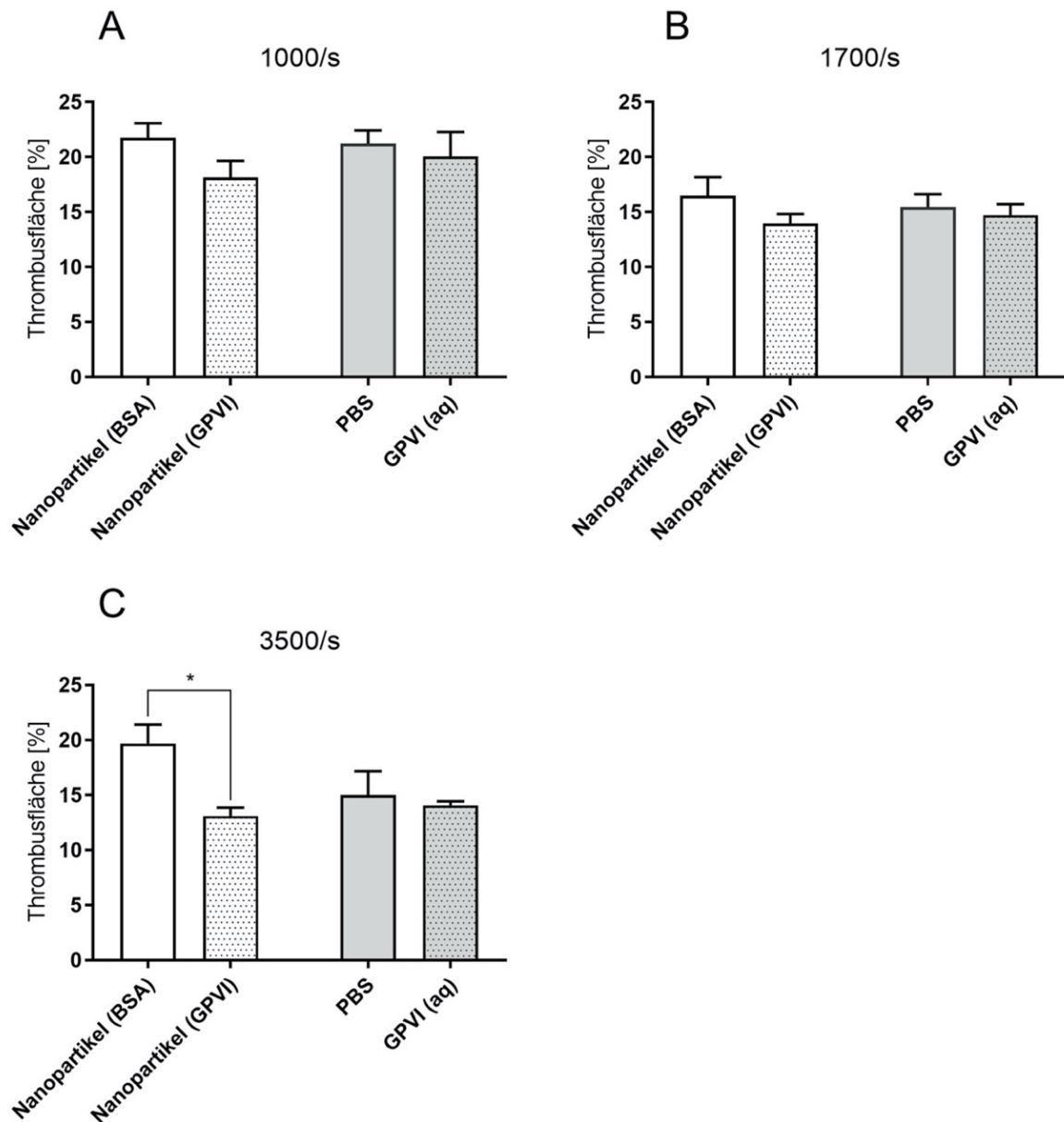


Abbildung 18: Thrombusfläche in Prozent verschiedener Scherraten unter Einfluss von BSA-Nanopartikeln, GPVI-Nanopartikeln, PBS und gelöstem PBS. A: Scherrate 1000 s^{-1} . B Scherrate 1700 s^{-1} . C Scherrate 3500 s^{-1} . Die Konzentration von löslichem GPVI-Fc betrug $40 \mu\text{g/ml}$, die der Nanopartikel jeweils 1 mg/ml , wobei die GPVI-Nanopartikel mit $40 \mu\text{g}$ GPVI-Fc pro mg Nanopartikel beladen waren. Die graphische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 8.00 und der statistischen one-way ANOVA-Testauswertung ($p < 0,05$ *).

Ergebnisse

3.3.2 Analyse der Größenverteilung der einzelnen Thromben unter Einfluss der Nanopartikel

Zur genaueren Analyse der einzelnen Thrombengröße wurden alle Thromben für die verschiedenen Scherraten 1000 s^{-1} , 1700 s^{-1} und 3500 s^{-1} der Größe nach sortiert und in Tertile aufgeteilt. Abbildung 19 zeigt diese Aufteilung. BSA- und GPVI-Nanopartikel werden für die verschiedenen Scherraten miteinander verglichen. In A ist die Gesamtheit aller Thromben dargestellt, in B die jeweils oberen Tertile, in C die mittleren Tertile und in D die unteren Tertile. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden Ausreißer entfernt. Für alle Gruppierungen wurde jeweils der Median und die 25% Perzentile im Box-Plot mit angegeben.

Ergebnisse

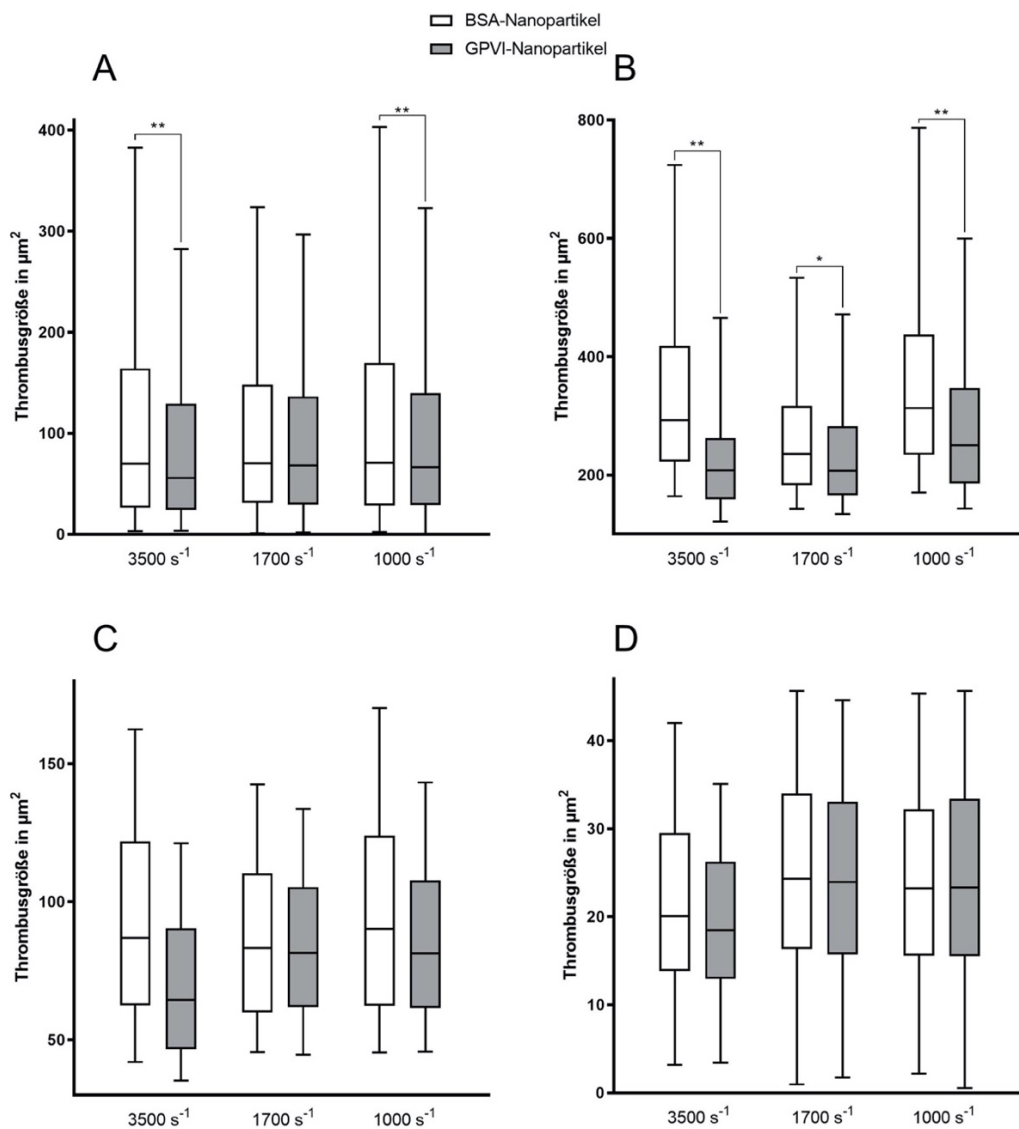


Abbildung 19: Analyse der Thromben nach ihrer Größe. Unterteilung der Menge der Thromben nach ihrer Größe in Tertilen. A: Darstellung der Größenverteilung der gesamten Thromben aller Scherraten in einem Box-Plot (Ausreißer wurden zur Übersichtlichkeit entfernt). Die Größe der entstandenen Thromben bei den Scherraten 3500 s^{-1} und 1000 s^{-1} sind hochsignifikant unterschiedlich zwischen den Inkubationen mit BSA- und GPVI-Nanopartikeln. B: Darstellung der oberen Tertile aller Scherraten in einem Box-Plot. Bei allen Scherraten lässt sich eine Signifikanz, bei 3500 s^{-1} und 1000 s^{-1} eine Hochsignifikanz, zwischen der Größenverteilung der Thromben nachweisen. C: Darstellung der mittleren Tertile aller Scherraten in einem Box-Plot. Hier zeigt sich kein Unterschied zwischen den GPVI- und den BSA-Nanopartikeln. D: Darstellung der unteren Tertile aller Scherraten in einem Box-Plot. Hier zeigt sich kein Unterschied zwischen den GPVI- und den BSA-Nanopartikeln. Die graphische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 8.00 und der statistischen one-way ANOVA-Testauswertung ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **).

Ergebnisse

3.3.3 Einflüsse der Nanopartikel auf die Thrombusbildung und Thrombusstabilität mittels Thrombelastografie

Das humane Li-Heparin-Blut wurde in drei Ansätzen mit PBS, GPVI-Nanopartikeln in einer Konzentration von 300 µg/ml und löslichem GPVI in einer Konzentration von 50 µg/ml versetzt und anschließend im TEG 6s System analysiert. Abbildung 20 zeigt für die drei Ansätze die Kurven der Messwerte. Es lässt sich erkennen, dass alle gemessenen Werte für alle Versuchsansätze im Normalbereich liegen.

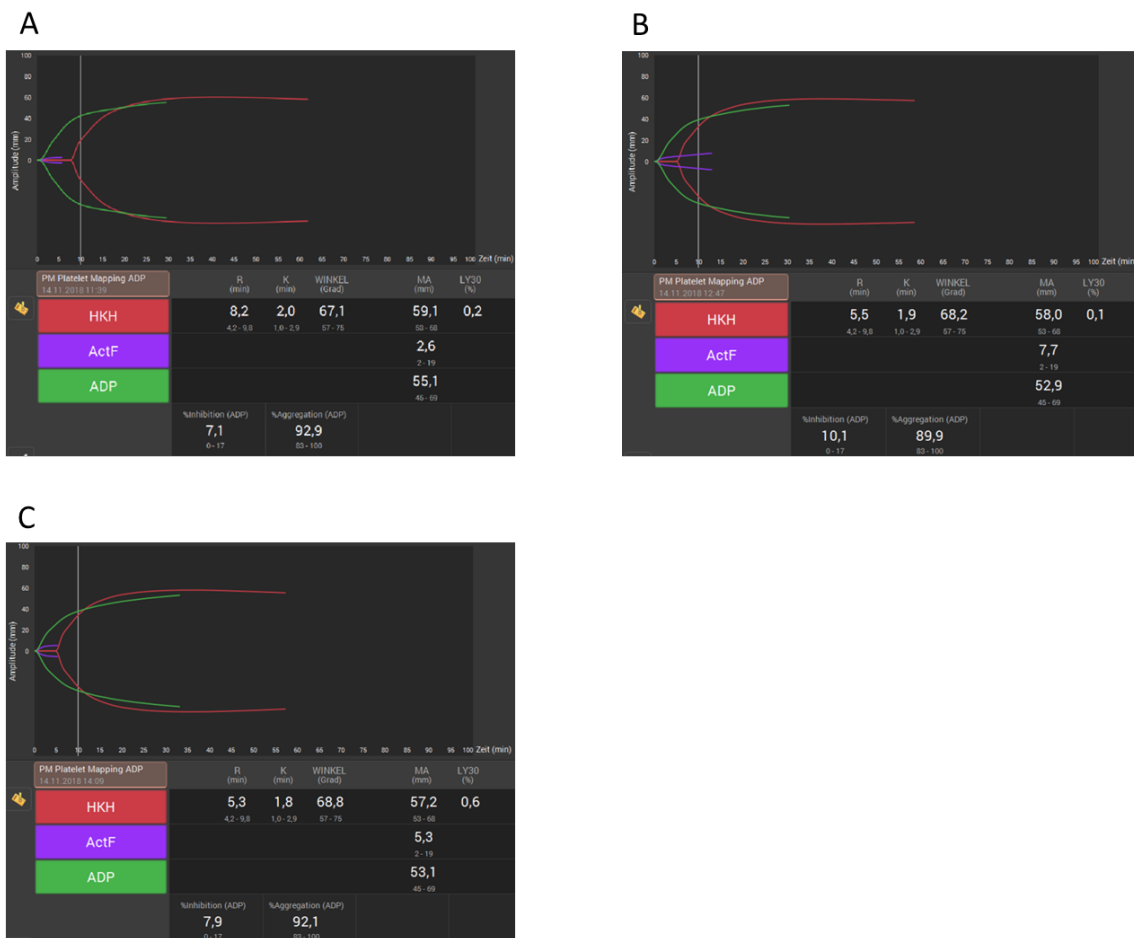


Abbildung 20: Thrombelastographie unter Einfluss der Nanopartikel mit der ADP-Testkassette. A: PBS B: GPVI-Nanopartikel (300 µg/ml) C: GPVI (aq) (50 µg/ml).

Ergebnisse

3.3.4 Einfluss der Nanopartikel auf die Thrombusbildung in der Impedanzaggregometrie

Bei der impedanzaggregometrischen Analyse der Thrombusbildung unter vorheriger Inkubation mit PBS, den BSA- sowie den GPVI-Nanopartikeln und löslichem GPVI wurde die "Area under the curve" dargestellt. Dies ist ein Indiz für die Thrombusbildung wie in 2.3.2 beschrieben wurde. Abbildung 21 A illustriert den Vergleich zwischen vier Gruppen.

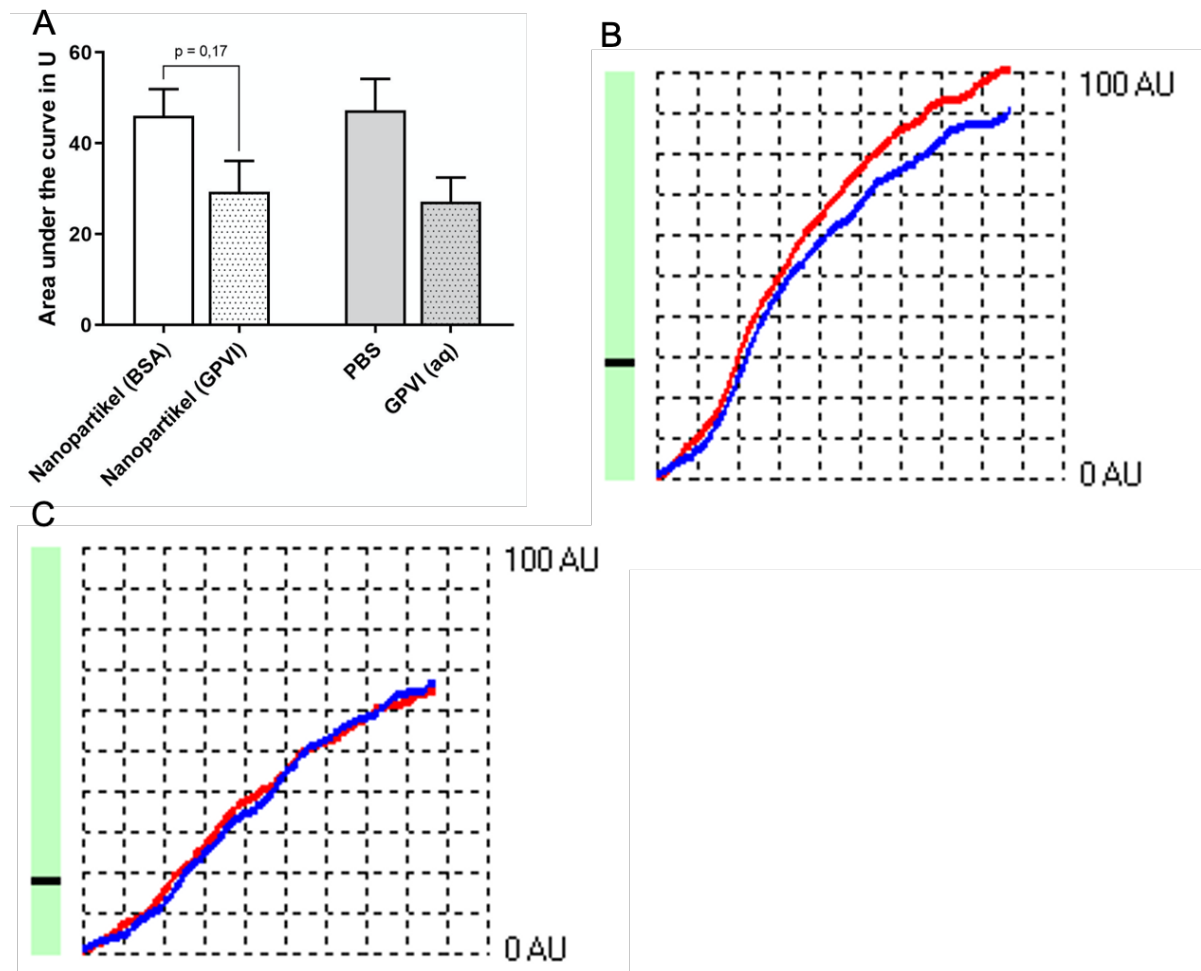


Abbildung 21: Impedanzaggregometrie. A: Quantitative Analyse der vier Versuchsansätze. B: Beispielskurve der BSA-Nanopartikel. C: Beispielskurve der GPVI-

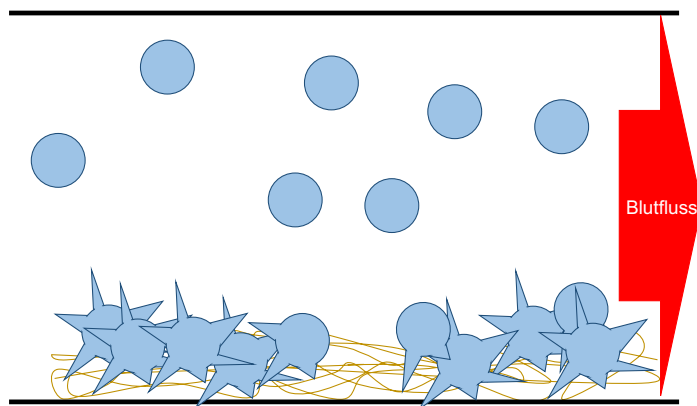
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es zeigt sich, dass im Flusskammer-Modell verschiedene Scherraten Einfluss auf die Thrombusbildung haben. Der Anteil an mit-Thrombus-bedeckter Fläche sinkt mit steigender Scherrate, sodass ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang erkennbar ist. Die Nanopartikel waren mittels FACS sowohl im FSC-SSC-Kanal als auch im Fluoreszenzkanal darstellbar, wobei sie keine einheitliche Größe aufwiesen (siehe 3.2.1). Zum gleichen Ergebnis kam die Darstellung der Nanopartikel unter dem Mikroskop (siehe Abbildung 12). Unter dem Mikroskop zeigte sich eine fadenförmige Anordnung der Nanopartikel, die auf Kollagen-beschichteten Cover Slips eine Stunde lang inkubiert worden waren. Die Bindung der Nanopartikel an Kollagen konnte auch im dynamischen Modell nachgewiesen werden (siehe 3.2.3 und beigelegte Videodatei). Die Bindung der Nanopartikel an Kollagen sollte spezifisch auf die Oberflächenbeschichtung der Nanopartikel – den GPVI-Rezeptor – zurückgeführt werden. Daher wurden die Versuche mit einer Kontrolle verglichen, in der Nanopartikel mit BSA beladen waren. Es zeigte sich, dass die Kontrollnanopartikel im Gegensatz zu den GPVI-Nanopartikeln nahezu kein Fluoreszenzsignal aussandten. Dies beweist, dass die Nanopartikel GPVI-spezifisch an Kollagen banden. Der Einfluss der Nanopartikel auf die Thrombusbildung unter verschiedenen Scherraten wurde untersucht. Bei einer Scherrate von 3500 s^{-1} bewirkten die Nanopartikel eine signifikante Abnahme der anteiligen Thrombusfläche. Weiterhin wurden die Thromben strukturell untersucht. Dafür wurden die Thromben ihrer Größe nach sortiert und für alle Scherraten in Tertile unterteilt. Beim Vergleich der jeweiligen Tertile zwischen den GPVI- und BSA-Nanopartikeln wurde gefunden, dass für alle Scherraten die Thromben innerhalb der oberen Tertile der Durchläufe mit GPVI-Nanopartikeln signifikant kleiner waren. Abbildung 22 zeigt schematisch die Interaktion von Nanopartikeln und Thrombozyten an den Kollagenfibrillen. Die einzelnen Thromben wurden kleiner, wohingegen die gesamte Thrombusfläche nur bei einer Scherrate von 3500 s^{-1} abnahm. Bei der Thrombelastografie zeigte sich kein Unterschied in der Dynamik des ADP-induzierten Thrombus-Auf- und

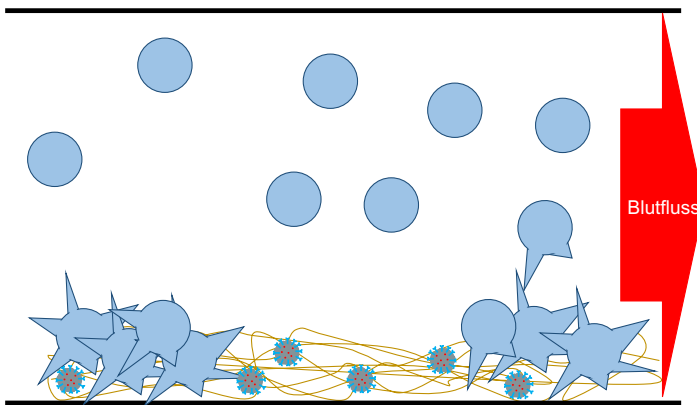
Ergebnisse

Abbaus zwischen den GPVI-Nanopartikeln der PBS-Kontrolle und dem löslichen GPVI. Bei der Impedanzaggregometrie waren die Ergebnisse unter der Wirkung der GPVI-Nanopartikel zur Kontrolle nicht signifikant unterschiedlich. Abbildung 21 zeigt beispielhaft eine impedanzaggregometrische Analyse für die GPVI- und BSA-Nanopartikel. In dieser Abbildung erkennt man die Tendenz, wonach die Kurve des elektrischen Widerstandes, der durch die Thrombusbildung gemessen werden kann, bei GPVI-Nanopartikeln im Vergleich zu BSA-Nanopartikeln weniger steil ansteigt.

A



B



- Thrombozyt
- ★ Aktivierter Thrombozyt
- ~ Kollagenfibrillen
- ⊙ GPVI-Nanopartikel

Abbildung 22: Schematische Darstellung der Thrombozytenaggregation bei einer Scherrate von 3500 s^{-1} . A: Die Thrombozyten kommen während der Blutperfusion durch die Flusskammer in Kontakt mit den Kollagenfibrillen, werden aktiviert und bilden Thromben B: Die Kollagenfibrillen werden mit GPVI-Nanopartikeln beschichtet. Dies beeinflusst die Bindung der Thrombozyten an Kollagen. Die Thrombusfläche wie auch die Größe der einzelnen Thromben nimmt ab.

4 Diskussion

Glykoprotein VI ist ein auf Thrombozyten vorkommender Rezeptor, der eine wichtige Rolle bei der Kollagen-induzierten Thrombozytenaktivierung spielt^{20,32,34}. Vor allem die Tatsache, dass eine Hemmung des GPVI-Signalwegs nicht zu erheblichen Störungen der Blutgerinnung führt, macht ihn zu einem erfolgsversprechenden Ziel der Thrombozytenaggregationshemmung^{44,59,60,63}. Eine Methode der GPVI-Interaktion besteht in der kompetitiven Hemmung der GPVI-Bindungsstellen auf Kollagenfasern. Dies wurde in zwei Arbeiten, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führten, bereits *in vivo* und *in vitro* gezeigt^{61,62}.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit eine Nanopartikel-basierte Applikation von GPVI Einfluss auf die Thrombusbildung nimmt.

Dafür wurden die mit GPVI beladenen Nanopartikel in ihrer Beschaffenheit, das Bindungsverhalten der Nanopartikel an Kollagen und der Einfluss der nanopartikel-basierten Applikation von GPVI auf die Thrombusbildung in verschiedenen Modellen untersucht.

4.1 Nanopartikel fluoreszieren und können mittels FACS oder unter dem Mikroskop dargestellt werden

Die Nanopartikel wurden mittels FACS (Abschnitt 2.5) und unter dem Mikroskop (Abschnitt 2.1) analysiert und somit in ihrer Beschaffenheit und ihren Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Laut Herstellerangaben weisen die Nanopartikel eine Größe von circa 200 nm auf. Wie in 3.2.2 deutlich wird, stellen sich die Nanopartikel unter dem Mikroskop jedoch nicht einheitlich groß dar, sondern weisen eine Varianz in ihrer Größe auf. Dies wurde zuvor schon in einer Arbeit der Hersteller beschrieben, in der ähnliche PLGA-Nanopartikel eine Varianz von 70 nm bei einer Größe von 180 nm aufwiesen⁶⁵. Dies wurde auch in unserer FACS-Analyse gefunden (3.2.1). Die Fluoreszenzeigenschaft des in den Nanopartikeln enthaltenen Farbstoffs Nile Red wurden im FACS ebenfalls dargestellt, indem das Fluoreszenzsignal in einem dem Farbstoff spezifischen Spektrum von 585/42 nm erfasst und nachgewiesen werden konnte. Die

Diskussion

Nanopartikel fallen mit circa 200 nm in ein Größenspektrum, das einem Zehntel der Größe von Thrombozyten entspricht und weisen aufgrund ihrer Beschaffenheit (PLGA) andere statische Eigenschaften als Zellen auf. Es stellt sich also die Frage, ob mittels FACS eine hinreichende Analyse der Nanopartikel möglich ist. In der Literatur kommt die FACS Analyse von Nanopartikeln vor allem dann zur Anwendung, wenn die zelluläre Aufnahme bestimmter Nanopartikel untersucht wird^{79,80}. Die Darstellung der solitären Nanopartikel scheint noch nicht etabliert zu sein. Das könnte an dem noch verhältnismäßig neuen Gebiet der Nanopartikeltechnologie in der Medizin liegen. Daher ist es umso wichtiger, die Eigenschaften der Nanopartikel per se mittels unterschiedlicher Analyse-Methoden zu untersuchen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die Analyse der Nanopartikeln mittels FACS möglich ist, da es im Vergleich zur PBS-Kontrolle zu einem Anstieg der Signale im FSC-SSC-Kanal, sowie im Fluoreszenzbereich kam. Die FACS-Analyse könnte ebenfalls dazu dienen, mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die GPVI-Konzentration auf den Nanopartikeln zu bestimmen. Dies könnte zum einen in zukünftigen Untersuchungen der Validierung der Konzentration von GPVI auf der Nanopartikeloberfläche dienen. Zum anderen könnte untersucht werden, ob die Nanopartikel nach dem Kontakt zu Kollagen oder nach der Perfusion durch einen Versuchsaufbau *in vitro* oder nach der Perfusion durch Gefäße *in vivo*, die gleiche Konzentration an GPVI auf der Oberfläche aufweisen. Möglicherweise beeinflusst die Perfusion und der Kontakt zu Kollagen die GPVI-Konzentration auf der Oberfläche der Nanopartikel. Unter Berücksichtigung der Arbeiten zur Analyse phagozytierter Nanopartikel könnte mittels FACS-Analyse untersucht werden, ob die Nanopartikel im Allgemeinen von phagozytierenden Zellen erkannt und aufgenommen werden. Das ist vor allem bei der Verwendung der Nanopartikel *in vivo* von großer Bedeutung, da dann auch der Einfluss des GPVI-Rezeptors auf die Phagozytose von Nanopartikeln untersucht werden kann. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich die Nanopartikel per se mittels FACS nachweisen lassen. Im nächsten Schritt wäre zu prüfen, inwieweit die FACS Methode eine Unterscheidung von Nanopartikeln und Zellen zulässt, um daraus Erkenntnisse für die Interaktion von Nanopartikeln und Zellen zu gewinnen.

4.2 Nanopartikel binden über den GPVI-Rezeptor an Kollagenstrukturen

Die mit 40 µg/mg GPVI beladenen Nanopartikel wurden für eine Stunde auf mit Kollagen Typ I beschichteten Cover Slips inkubiert, um das Bindungsverhalten der Partikel zu analysieren. Zum Vergleich wurden auch mit BSA beladene Nanopartikel inkubiert. Der auf Thrombozyten vorkommende GPVI-Rezeptor bindet als Dimer hochspezifisch an eine Glycin-Prolin-Hydroxyprolin (GPO)-Sequenz von Kollagen^{32-35,81}. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde Kollagen Typ I verwendet. Kollagen Typ I enthält die GPO-Sequenz zu etwa 10 %⁸¹. In Abschnitt 3.2.4. wurde gezeigt, dass die GPVI-Nanopartikel nach einstündiger Inkubation auf den Cover-Slips an die Kollagen I-Fasern banden. Dies wurde sowohl durch Aufnahmen der Lichtmikroskopie unter Fluoreszenz als auch durch qualitative Messung des Fluoreszenzsignals nachgewiesen. Zudem wurde gezeigt, dass die Kontroll-Nanopartikel nicht an die Kollagenstrukturen banden. Durch Kombination der lichtmikroskopischen Aufnahme der Kollagenfibrillen und der Fluoreszenzsignale der Nanopartikel wird sichtbar, dass die mit GPVI beladenen Nanopartikel spezifisch binden. An den Stellen, an denen sich lichtmikroskopisch die Kollagenfasern befinden, ist ein erhöhtes Fluoreszenzsignal messbar. Dies belegt, dass die in der Literatur beschriebene Bindungsaffinität des GPVI-Rezeptors an Kollagen auch dann sehr ausgeprägt ist, wenn der GPVI-Rezeptor nicht auf der Thrombozytenoberfläche, sondern auf der Oberfläche von PLGA-Nanopartikeln vorhanden ist. Unsere Untersuchungen zeigen, dass der GPVI-Rezeptor ein Anheften der Nanopartikel an Kollagenstrukturen ermöglicht. Dieses Ergebnis erlaubt uns, an weitere Untersuchungen zu denken, die mittels fluoreszierender Nanopartikel Kollagenstrukturen im Fokus haben.

4.3 Nanopartikel binden im dynamischen Modell mittels GPVI an Kollagenstrukturen

Das Bindungsverhalten der GPVI-Nanopartikel wurde im weiteren Verlauf in einem dynamischen Perfusionsmodell (siehe Abschnitt 2.2.5.2) untersucht. Dazu wurden Nanopartikel in einer Konzentration von 400 µg/ml unter einer definierten Scherrate von 1700 s⁻¹ durch die Flusskammer geleitet, während das Fluoreszenzsignal im Verlauf aufgezeichnet wurde. Die Ergebnisse aus 3.2.3. legen ausgehend von der Scherrate 1700 s⁻¹ nahe, dass die GPVI-abhängige Bindung der Nanopartikel an Kollagen auch unter der Wirkung bestimmter Scherkräfte zu beobachten ist. So wird eine Zunahme des Fluoreszenzsignals im Zeitverlauf festgestellt. Während der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wird der Fokus der Fluoreszenzsignale manuell erfasst, was zu einer gewissen Unschärfe während der Aufnahme führt. Es kann gezeigt werden, dass die Nanopartikel auch unter Perfusion an die Kollagenfibrillen binden. Die Eigenschaft der Nanopartikelbindung mittels GPVI, vor allem unter hohen Scherraten, könnte für die Diagnostik von atheromatösen Plaques von Bedeutung sein, da in stenosierten Gefäßabschnitten vergleichsweise hohe Scherraten vorherrschen⁶⁵. So könnten Nanopartikel, die mit einem Röntgen-Kontrastmittel angereichert sind, während einer Coronarangiographie zur Darstellung von Kollagenstrukturen dienen und diese an vulnerablen Plaques identifizieren. Um die Wirkung der Nanopartikel *in vivo* zu untersuchen, würde sich die Intravitalmikroskopie eignen, wie es in^{60,62} beschrieben wird. Dabei könnte die Anheftung der Nanopartikel an die Kollagenstrukturen vitaler Gefäße untersucht werden. Die Verwendung von Nanopartikeln *in vivo* würde zum einen die Untersuchung der Wirksamkeit der Nanopartikel in vitalen Gefäßen und zum anderen die Analyse der Kinetik der Nanopartikel elimination in einem lebenden Organismus ermöglichen. Korin *et al.* beschreiben im Mausmodell für ähnliche Nanopartikel eine 80%-Elimination vornehmlich über die Leber nach 5 min⁶⁵.

4.4 Einfluss der GPVI-Nanopartikel auf die Thrombusbildung und -struktur im Flusskammer-Modell

GPVI ist ein spezifischer Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche, der mit Kollagen interagiert. Im Folgenden wird der Einfluss der kompetitiven Bindung von GPVI- Nanopartikeln auf die Thrombusbildung betrachtet. Im Abschnitt 1.3.6 wurde beschrieben, dass sich bereits zwei Arbeitsgruppen mit der Frage beschäftigt hatten, ob eine kompetitive Hemmung der Kollagen-Bindung mittels löslichem GPVI-Fc zu einer verminderten Thrombusbildung führte.

Massberg *et al.* beschreiben, dass es im Perfusionsmodell bei den Scherraten 500 s^{-1} und 2000 s^{-1} zu einer signifikant niedrigeren Thrombusbildung unter der Wirkung von löslichem GPVI-Fc im Vergleich zur Kontrolle (Fc-Teil ohne die GPVI-Domäne) kommt. Dabei wird GPVI-Fc in einer Konzentration von $800 \text{ }\mu\text{g/ml}$ simultan mit humanem Blut durch die Flusskammer geleitet. Dies führt bei der Scherrate 500 s^{-1} zu einer 37 prozentigen, bei der Scherrate 2000 s^{-1} zu einer 44 prozentigen Reduktion der Thrombusfläche. Die von Thrombus bedeckte Fläche wird von den Autoren mit $40.000 \text{ }\mu\text{m}^2$ angegeben ⁶². Grüner *et al.* beschreiben für die Scherrate 1000 s^{-1} und einer Konzentration von $200 \text{ }\mu\text{g/ml}$ löslichen GPVI-Fc eine signifikante Reduktion der Thrombusfläche um 36,3 %, beurteilen den antithrombotischen Effekt des kompetitiv wirkenden löslichen GPVI-Fc jedoch als eher gering, da für niedrigere Konzentration GPVI-Fc kein signifikanter Unterschied feststellbar ist. Die Autoren geben die gesamte von Thromben bedeckte Fläche anteilig mit 25% der Gesamtfläche an ⁶¹. Die Versuchsdurchführung der vorliegenden Arbeit unterscheidet sich von den oben genannten Arbeiten dahingehend, dass die Reagenzien (GPVI-Nanopartikel, BSA-Nanopartikel, lösliches GPVI und BSA) vor der Perfusion mit humanem Blut für eine Stunde auf den Kollagen-beschichteten Cover-Slips inkubiert wurden. Die Konzentration an GPVI beträgt in allen Versuchen jeweils $40 \text{ }\mu\text{g/ml}$. Zwar liegen die Nanopartikel in einer Konzentration von 1 mg/ml vor, diese sind jedoch mit $40 \text{ }\mu\text{g}$ GPVI pro mg Nanopartikel beladen, was kumulativ zu einer Konzentration an GPVI von $40 \text{ }\mu\text{g/ml}$ führt. Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.1 zeigen, dass die Größe der Gesamtthrombusfläche bei keiner Scherrate durch

Diskussion

lösliches GPVI beeinflusst wird. Dies bestätigt die Befunde von Grüner *et al.* und belegt, dass es sogar unter vorheriger Inkubation der Cover-Slips mit 40 µg/ml löslichen GPVIs zu keiner Reduktion der Thrombusfläche kommt. Damit ist kein kompetitiv hemmender Effekt durch lösliches GPVI vorhanden. Der relative Anteil der Thrombusfläche unter einer Scherrate von 1000 s⁻¹ in Höhe von etwa 25 % der Gesamtfläche aus Abschnitt 3.3.1 stimmt mit den Ergebnissen von Grüner *et al.* überein. Bei einer Scherrate von 3500 s⁻¹ kommt es zu einer signifikant kleineren Gesamtthrombusfläche unter der Wirkung der GPVI-Nanopartikel. In Abschnitt 3.3.2 werden die Thromben ihrer Größe nach sortiert und in Tertile unterteilt. Die Ergebnisse legen nahe, dass es unter der Wirkung von GPVI-Nanopartikeln im Vergleich zur Kontrolle bei den Scherraten 3500 s⁻¹ und 1000 s⁻¹ zur Ausbildung signifikant kleinerer Thromben kommt. Bei allen Scherraten sind die Thromben des oberen Tertils (das Drittel der 33% größten Thromben) unter der Wirkung der GPVI-Nanopartikel signifikant kleiner als die Thromben der Kontrollgruppe.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse über die gesamte Thrombusfläche und die Analyse der Tertile der Thrombengröße lässt sich ableiten, dass die GPVI-Nanopartikel durch ihre Bindung an Kollagen zu signifikant kleineren Thromben führen. Dies könnte daran liegen, dass die Nanopartikel aufgrund ihrer Beschaffenheit die Aktivierung der Thrombozyten untereinander beeinflussen und somit die Bildung großer Einzelthromben verhindern. Der Befund, dass die gesamte Thrombusfläche unter der Wirkung der GPVI-Nanopartikel bei den Scherraten 1700 s⁻¹ und 1000 s⁻¹ gleich bleibt, kann dadurch erklärt werden, dass Thrombozyten nicht ausschließlich mittels GPVI an Kollagen binden. Auch GPIIb-V-IX und Integrine spielen bei der Bindung an Kollagen eine wichtige Rolle^{11,19,20}. Unter hohen Scherraten könnte der GPVI-Rezeptor für die Kollagen-Thrombozyten-Interaktion von größerer Bedeutung sein, da er direkt an Kollagen bindet. Daher ist vor allem bei hohen Scherraten eine verminderte Thrombusfläche durch die Hemmung des GPVI-abhängigen Aggregationsweges zu erkennen. Wir können zeigen, dass der Einfluss der Nanopartikel-basierten Applikation von GPVI scherratenabhängig ist. Die GPVI-Interaktion mit Kollagen ist auf jeden Fall ein entscheidender Schritt bei der Thrombozytenaktivierung und

Diskussion

folglich auch der parakrinen Freisetzung von Mediatorstoffen. Dies führt zu einer kaskadenartigen Aktivierung von Thrombozyten und möglicherweise zur Bildung großer Thromben. Es stellt sich die Frage, ob die Hemmung der GPVI-Bindungsstellen durch Nanopartikel tatsächlich einen direkten Einfluss auf die verminderte Bindungsfähigkeit der Thrombozyten hat, oder ob es durch einer verminderte Aktivierung der Thrombozyten untereinander zu einer verminderten Thrombusbildung kommt. Das kann in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Außerdem gilt es zu klären, ob dieser Effekt der verminderten parakrinen Thrombozytenaktivierung durch andere prothrombotische Effektormoleküle wie Thrombin kompensiert wird ⁵⁴.

Um den Einfluss der GPVI-Nanopartikel auf die Thrombozytenaktivierung zu untersuchen, würde eine erweiterte Analyse der Thrombusbildung Aufschluss geben. Die Thromben wurden in ihrer Größe manuell erfasst, was mögliche Ungenauigkeiten bei der Auswertung zur Folge haben könnte. In diesem Zusammenhang können weiter entwickelte Auswertungstechniken eine präzise Aussage über den Einfluss der GPVI-Nanopartikel auf die Thrombusbildung liefern.

4.5 Einfluss der GPVI-Nanopartikel auf die Thrombusbildung sowie -stabilität im Thrombelastografie-Modell

Mittels Thrombelastographie wurde untersucht, ob die GPVI-Nanopartikel einen Einfluss auf die Thrombusbildung und -stabilität hatten. Hierbei wurden für das Thrombelastographie (TEG) 6s System spezielle Testkassetten verwendet, in denen die Thrombusbildung durch ADP initiiert wird. In den Ergebnissen 3.3.3 der Experimente können keine Unterschiede zwischen den Proben mit und ohne die GPVI-Nanopartikel beobachtet werden. Die GPVI-Nanopartikel haben folglich keinen Einfluss auf die durch ADP initiierte Thrombusbildung. Eine Arbeitsgruppe, die die kompetitive Hemmung der Kollagenbindungsstellen durch GPVI-Fc in einer klinischen Studie untersucht, kommt zu demselben Ergebnis ⁶³.

Diskussion

Das weist darauf hin, dass GPVI ein Kollagen-spezifischer Rezeptor ist und in den Thrombozyten die Kollagen-induzierte Aktivierung initiiert. Diese Erkenntnis unterstützt klinische Ergebnisse, die zeigen, dass es bei der Hemmung des GPVI-abhängigen Signalwegs nicht zu einer erhöhten Blutungsneigung kommt⁶³. Folglich beeinflusst GPVI auch auf Nanopartikeln nicht die ADP-abhängige Thrombozytenaktivierung.

4.6 Auswirkungen der GPVI-Nanopartikel auf die Thrombusbildung, impedanzaggregometrischer Nachweis

Bei der impedanzaggregometrischen Analyse wird die Thrombusbildung durch ein Kollagenreagenz, welches direkt zum Vollblut gegeben wird, untersucht. In unserer Untersuchung ergeben sich keine signifikanten Unterschiede der GPVI-Nanopartikel im Vergleich zur Kontrolle (siehe 3.3.4.). Es lässt sich eine Tendenz zu einer flacher verlaufenden "Area under the curve" erahnen. Dies liegt daran, dass die Nanopartikel ihre Wirkung eher an nicht löslichem Kollagen entfalten, wie es für die Hemmung durch lösliches GPVI ohne Nanopartikel beschrieben wird⁶⁷.

4.7 Ausblick der Nutzung von GPVI-Nanopartikeln

Die GPVI-Nanopartikel binden wie auch das lösliche GPVI-Fc nachweislich an Kollagenstrukturen. Um das Bindungsverhalten von GPVI-Nanopartikeln weiter zu untersuchen, sind weiterführende Experimente notwendig. Interessant wäre die Auswirkung einer Variation der GPVI-Konzentration auf das Bindungsverhalten der Nanopartikel sowie das Bindungsverhalten der GPVI-Nanopartikel unter der Wirkung unterschiedlicher Scherraten, um einen therapeutischen Nutzen der Nanopartikel genauer abschätzen zu können. Die Nanopartikel könnten zudem in unterschiedlicher Größe auf ihr Bindungsverhalten untersucht werden. Zudem könnte auch die Interaktion von

Diskussion

Nanopartikeln und Thrombozyten weiter untersucht werden. Dabei stellt sich vor allem die Frage, ob die Nanopartikel eher als "Gerüst" für die Bildung eines Thrombus dienen oder ob die Nanopartikel die Thrombozyten kompetitiv verdrängen und einen Thrombus somit verhindern. Das Wissen über die Interaktion der Nanopartikel mit den Thrombozyten könnte auch therapeutisch genutzt werden, um einen Thrombozytenaggregationshemmstoff lokal wirken zu lassen. Diese Kombination wurde bereits in Form eines Fusionsproteins aus GPVI-Fc und CD39 (Ekonukleotidase, die in den ADP-abhängigen Aktivierungsweg der Thrombozyten hemmt) beschrieben, die zu einer lokalen antithrombotischen Wirkung führt⁸². Durch die hohe Bindungsaffinität des GPVI Rezeptors könnten die Nanopartikel gezielt an Kollagenstrukturen anhaften und so als "Anker" fungieren. Diese Eigenschaft wäre vor allem dann gut einsetzbar, wenn die Nanopartikel neben GPVI einen wie oben beschriebenen Thrombozytenaggregationshemmstoff oder ein antithrombotisch wirksames Molekül, wie einen Thrombininhibitor, enthielten. Dadurch könnten kritische Stellen im Gefäßsystem gezielt erreicht werden und Hämostase dort gehemmt werden, wo die Gefahr einer Thrombusbildung bestünde. Zusätzlich kann untersucht werden, ob die mit GPVI beschichteten Nanopartikel lediglich an Kollagenstrukturen binden oder ob andere Bestandteile der Sub- und Interzellularmatrix ebenfalls als Bindungsstelle für Nanopartikel fungieren können. Des Weiteren wäre die Frage zu klären, ob der GPVI-Rezeptor auf der Nanopartikeloberfläche einen Einfluss auf die Interaktion der Nanopartikel mit anderen Zellen hat. So könnten circa 2 µm große Nanopartikeln als Modell für Thrombozyten dienen. Damit könnte der Einfluss erhöhter GPVI-Konzentrationen, wie sie durch die Nanopartikel hervorgerufen würden, untersucht werden. Wie in Abschnitt 1.3.4 beschrieben, spielt der GPVI-Rezeptor bei anderen pathophysiologischen Veränderungen eine wichtige Rolle. Daher wäre eine umfassende Analyse der Wirkung einer Nanopartikel-basierten Applikation von GPVI sinnvoll.

5 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Ereignisse sind häufig die Folge rupturierter atherosklerotischer Plaques. Dabei kommt es unter anderem zu einer Kollagen-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Glykoprotein VI (GPVI) ist ein Kollagenrezeptor der Thrombozyten. Die vorliegende Arbeit stellt die Frage, ob sich eine Nanopartikel-basierte Applikation von GPVI auf die Thrombusbildung auswirkt.

GPVI-beladene Nanopartikel wurden mit BSA-beladenen Nanopartikeln verglichen. Die Nanopartikel wurden mittels FACS und unter dem Mikroskop auf ihre Beschaffenheit und ihr Bindungsverhalten untersucht. Das Flusskammer-Modell stellte bei verschiedenen Scherraten den Einfluss auf die Thrombusbildung dar. Die ADP-initiierte Thrombusbildung wurde mit der Thrombelastografie geprüft. Mit dem impedanzaggregometrischen Verfahren wurde die durch lösliches Kollagen initiierte Thrombusbildung analysiert.

Es zeigte sich, dass die Nanopartikel im FACS eine gewisse Größenvarianz aufwiesen. Die Bindung der mit GPVI beladenen Nanopartikeln wurde nach Inkubation auf Cover-Slips und unter Perfusion mikroskopisch dargestellt. In der Flusskammer zeigte sich nach Nanopartikelinkubation bei einer Scherrate von 3500 s^{-1} eine kleinere Gesamtthrombusfläche. Bei niedrigeren Scherraten blieb dieser Effekt aus. Lösliches GPVI hatte keinen Einfluss auf die Gesamtthrombusfläche. In Tertile unterteilt, zeigte sich in der Gruppe der größten Thromben, dass sich unter der Wirkung der Nanopartikel bei allen Scherraten kleinere Thromben bildeten. Im Thrombelastografiemodell und bei der impedanzaggregometrischen Untersuchung hatten die Nanopartikel keinen Einfluss auf die Thrombusbildung.

Unsere *in vitro* Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss der Nanopartikel auf die Thrombusbildung scherratenabhängig ist. Wir können außerdem zeigen, dass die mit GPVI beladenen Nanopartikel an Kollagenstrukturen binden, wodurch sie gezielt und fokussiert wirken können. Durch Kombination der Nanopartikel mit Hemmstoffen der Thrombozytenaggregation oder der Gerinnungskaskade könnte eine lokal begrenzte Hemmung der Hämostase erfolgen. Demzufolge wäre es wichtig, *in vivo* die Bindung von Nanopartikeln an Gefäßstrukturen sowie die Kinetik der Nanopartikelelimination zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

1. Gawaz MP. *Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung ; 31 Tabellen.* Stuttgart [u.a.]: Thieme; 1999. 1-24.
2. Klinker R, Pape H-C, Silbernagl S. *Physiologie.* 5., komplett überarbeitete Ausgabe ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2005. 245.
3. Schmidt RF. *Physiologie des Menschen : mit Pathophysiologie; mit 85 Tabellen; mit herausnehmbarem Repetitorium.* 31., überarb. und aktualisierte Aufl. ed. Heidelberg: Springer; 2010. 493.
4. Heijnen HFG, Korporaal SJA. Platelet Morphology and Ultrastructure. In: Gresele P, Kleiman NS, Lopez JA, Page CP, eds. *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update.* Cham: Springer International Publishing; 2017:21-37.
5. Sorrentino S, Studt J-D, Horev MB, Medalia O, Sapra KT. Toward correlating structure and mechanics of platelets. *Cell adhesion & migration.* 2016;10(5):568-575.
6. Michelson AD. *Platelets.* Vol 3rd ed. Amsterdam: Academic Press; 2013. 25-46.
7. Reddoch KM, Montgomery RK, Rodriguez AC, et al. Endothelium-Derived Inhibitors Efficiently Attenuate the Aggregation and Adhesion Responses of Refrigerated Platelets. *Shock.* 2016;45(2):220-227.
8. Linden MD. Platelet Physiology. In: Monagle P, ed. *Haemostasis: Methods and Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press; 2013:13-30.
9. Kasirer-Friede A, Shattil SJ. Regulation of Platelet Adhesion Receptors. In: Gresele P, Kleiman NS, Lopez JA, Page CP, eds. *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update.* Cham: Springer International Publishing; 2017:69-84.
10. Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica.* 2009;94(5):700-711.

Literaturverzeichnis

11. Estevez B, Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology (Bethesda, Md)*. 2017;32(2):162-177.
12. Jackson SP. Arterial thrombosis—insidious, unpredictable and deadly. *Nature Medicine*. 2011;17:1423.
13. Michelson AD. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(2):154-169.
14. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2095-2128.
15. Eikelboom JW, Hirsh J. Combined antiplatelet and anticoagulant therapy: clinical benefits and risks. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007;5(s1):255-263.
16. Dütting S, Bender M, Nieswandt B. Platelet GPVI: a target for antithrombotic therapy?! *Trends in Pharmacological Sciences*. 2012;33(11):583-590.
17. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and High-Risk Plaque: Part I: Evolving Concepts. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(6):937-954.
18. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *Journal of Internal Medicine*. 2014;276(6):618-632.
19. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. 2003;102(2):449-461.
20. Penz S, Reininger AJ, Brandl R, et al. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *The FASEB Journal*. 2005;19(8):898-909.
21. Boulaftali Y, Ho Tin Noé B, Jandrot-Perrus M, Mangin PH. GPVI. In: Gresele P, Kleiman NS, Lopez JA, Page CP, eds. *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*. Cham: Springer International Publishing; 2017:113-127.
22. Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation

Literaturverzeichnis

- and adhesion. *The Journal of Clinical Investigation*. 1989;84(5):1440-1445.
23. Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S, Kanaji K, Uchino H. A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood*. 1987;69(6):1712-1720.
 24. Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E, Wells TNC, Clemetson KJ. The Platelet Collagen Receptor Glycoprotein VI Is a Member of the Immunoglobulin Superfamily Closely Related to Fc α R and the Natural Killer Receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(41):29019-29024.
 25. Smethurst PA, Joutsu-Korhonen L, O'Connor MN, et al. Identification of the primary collagen-binding surface on human glycoprotein VI by site-directed mutagenesis and by a blocking phage antibody. *Blood*. 2004;103(3):903-911.
 26. Brondijk TH, de Ruyter T, Ballering J, et al. Crystal structure and collagen-binding site of immune inhibitory receptor LAIR-1: unexpected implications for collagen binding by platelet receptor GPVI. *Blood*. 2010;115(7):1364-1373.
 27. Zheng YM, Liu C, Chen H, Locke D, Ryan JC, Kahn ML. Expression of the platelet receptor GPVI confers signaling via the Fc receptor gamma-chain in response to the snake venom convulxin but not to collagen. *J Biol Chem*. 2001;276(16):12999-13006.
 28. Berlanga O, Tulasne D, Bori T, et al. The Fc receptor gamma-chain is necessary and sufficient to initiate signalling through glycoprotein VI in transfected cells by the snake C-type lectin, convulxin. *Eur J Biochem*. 2002;269(12):2951-2960.
 29. Suzuki-Inoue K, Tulasne D, Shen Y, et al. Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling. *J Biol Chem*. 2002;277(24):21561-21566.
 30. Watson SP, Herbert JM, Pollitt AY. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost*. 2010;8(7):1456-1467.
 31. Berlanga O, Bori-Sanz T, James JR, et al. Glycoprotein VI oligomerization in cell lines and platelets. *J Thromb Haemost*. 2007;5(5):1026-1033.

Literaturverzeichnis

32. Miura Y, Takahashi T, Jung SM, Moroi M. Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen. *J Biol Chem.* 2002;277(48):46197-46204.
33. Loyau S, Dumont B, Ollivier V, et al. Platelet glycoprotein VI dimerization, an active process inducing receptor competence, is an indicator of platelet reactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(3):778-785.
34. Horii K, Kahn ML, Herr AB. Structural basis for platelet collagen responses by the immune-type receptor glycoprotein VI. *Blood.* 2006;108(3):936-942.
35. Arthur JF, Shen Y, Kahn ML, Berndt MC, Andrews RK, Gardiner EE. Ligand binding rapidly induces disulfide-dependent dimerization of glycoprotein VI on the platelet plasma membrane. *J Biol Chem.* 2007;282(42):30434-30441.
36. Arthur JF, Dunkley S, Andrews RK. Platelet glycoprotein VI-related clinical defects. *Br J Haematol.* 2007;139(3):363-372.
37. Dumont B, Lasne D, Rothschild C, et al. Absence of collagen-induced platelet activation caused by compound heterozygous GPVI mutations. *Blood.* 2009;114(9):1900-1903.
38. Hermans C, Wittevrongel C, Thys C, Smethurst PA, Van Geet C, Freson K. A compound heterozygous mutation in glycoprotein VI in a patient with a bleeding disorder. *J Thromb Haemost.* 2009;7(8):1356-1363.
39. Kato K, Kanaji T, Russell S, et al. The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood.* 2003;102(5):1701-1707.
40. Lockyer S, Okuyama K, Begum S, et al. GPVI-deficient mice lack collagen responses and are protected against experimentally induced pulmonary thromboembolism. *Thrombosis Research.* 2006;118(3):371-380.
41. Nieswandt B, Bergmeier W, Schulte V, Rackebrandt K, Gessner JE, Zirngibl H. Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRgamma chain. *J Biol Chem.* 2000;275(31):23998-24002.
42. Wu Y, Suzuki-Inoue K, Satoh K, et al. Role of Fc receptor gamma-chain in platelet glycoprotein Ib-mediated signaling. *Blood.* 2001;97(12):3836-3845.

Literaturverzeichnis

43. Poole A, Gibbins JM, Turner M, et al. The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *EMBO J.* 1997;16(9):2333-2341.
44. Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W, et al. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice. *The Journal of experimental medicine.* 2001;193(4):459-469.
45. Bigalke B, Stellos K, Geisler T, et al. Expression of platelet glycoprotein VI is associated with transient ischemic attack and stroke. *Eur J Neurol.* 2010;17(1):111-117.
46. Al-Tamimi M, Gardiner EE, Thom JY, et al. Soluble glycoprotein VI is raised in the plasma of patients with acute ischemic stroke. *Stroke.* 2011;42(2):498-500.
47. Kleinschnitz C, Pozgajova M, Pham M, Bendszus M, Nieswandt B, Stoll G. Targeting Platelets in Acute Experimental Stroke. *Circulation.* 2007;115(17):2323-2330.
48. Schulz C, Leuschen NV, Fröhlich T, et al. Identification of novel downstream targets of platelet glycoprotein VI activation by differential proteome analysis: implications for thrombus formation. *Blood.* 2010;115(20):4102-4110.
49. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science.* 2010;327(5965):580-583.
50. Devi S, Kuligowski MP, Kwan RY, et al. Platelet recruitment to the inflamed glomerulus occurs via an alphaIIb beta3/GPVI-dependent pathway. *Am J Pathol.* 2010;177(3):1131-1142.
51. Jain S, Harris J, Ware J. Platelets: linking hemostasis and cancer. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2010;30(12):2362-2367.
52. Jain S, Russell S, Ware J. Platelet glycoprotein VI facilitates experimental lung metastasis in syngenic mouse models. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2009;7(10):1713-1717.
53. Gross P, Weitz J. New Antithrombotic Drugs. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 2009;86(2):139-146.

Literaturverzeichnis

54. Mangin P, Yap CL, Nonne C, et al. Thrombin overcomes the thrombosis defect associated with platelet GPVI/FcR γ deficiency. *Blood*. 2006;107(11):4346-4353.
55. Bender M, Hagedorn I, Nieswandt B. Genetic and antibody-induced glycoprotein VI deficiency equally protects mice from mechanically and FeCl $_3$ -induced thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011;9(7):1423-1426.
56. Cosemans JM, Kuijpers MJ, Lecut C, et al. Contribution of platelet glycoprotein VI to the thrombogenic effect of collagens in fibrous atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*. 2005;181(1):19-27.
57. Reininger AJ, Bernlochner I, Penz SM, et al. A 2-step mechanism of arterial thrombus formation induced by human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(11):1147-1158.
58. Cimmino G, Golino P. Platelet Biology and Receptor Pathways. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2013;6(3):299-309.
59. Li H, Lockyer S, Concepcion A, et al. The Fab Fragment of a Novel Anti-GPVI Monoclonal Antibody, OM4, Reduces In Vivo Thrombosis Without Bleeding Risk in Rats. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007;27(5):1199-1205.
60. Massberg S, Gawaz M, Grüner S, et al. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2003;197(1):41-49.
61. Grüner S, Prostedna M, Koch M, et al. Relative antithrombotic effect of soluble GPVI dimer compared with anti-GPVI antibodies in mice. *Blood*. 2005;105(4):1492-1499.
62. Massberg S, Konrad I, Bültmann A, et al. Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *The FASEB Journal*. 2004;18(2):1-18.
63. Ungerer M, Rosport K, Bültmann A, et al. Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans. *Circulation*. 2011;123(17):1891-1899.
64. Prasad M, Lambe UP, Brar B, et al. Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-dimensional applications in medical sector of the modern world. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;97:1521-1537.

Literaturverzeichnis

65. Korin N, Kanapathipillai M, Matthews BD, et al. Shear-Activated Nanotherapeutics for Drug Targeting to Obstructed Blood Vessels. *Science*. 2012;337(6095):738-742.
66. Jandrot-Perrus M, Busfield S, Lagrue A-Hn, et al. Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood*. 2000;96(5):1798-1807.
67. Schulz C, Penz S, Hoffmann C, et al. Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession in vivo. *Basic Research in Cardiology*. 2008;103(4):356-367.
68. Arai M, Yamamoto N, Moroi M, Akamatsu N, Fukutake K, Tanoue K. Platelets with 10% of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency. *Br J Haematol*. 1995;89(1):124-130.
69. Van Aelst B, Feys HB, Devloo R, Vandekerckhove P, Compernelle V. Microfluidic Flow Chambers Using Reconstituted Blood to Model Hemostasis and Platelet Transfusion In Vitro. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2016(109):53823.
70. Cosemans JMEM, Heemskerk JWM. Measurement of whole blood thrombus formation using parallel-plate flow chambers – a practical guide AU - Van Kruchten, Roger. *Platelets*. 2012;23(3):229-242.
71. Cosemans JMEM, Mattheij NJA, Heemskerk JWM, Angelillo-Scherrer A. The effects of arterial flow on platelet activation, thrombus growth, and stabilization. *Cardiovascular Research*. 2013;99(2):342-352.
72. Flechtenmacher N, Kämmerer F, Dittmer R, et al. Clopidogrel Resistance in Neurovascular Stenting: Correlations between Light Transmission Aggregometry, VerifyNow, and the Multiplate. *American Journal of Neuroradiology*. 2015;36(10):1953-1958.
73. Rouillet S, Labrousse S, Carrie C, Auque H, Berard X, Freyburger G. Multiplate® evaluation of acetylsalicylic acid efficacy in carotid surgery: routine and genetic influencing factors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2018;16(3):583-591.
74. Bagge A, Schött U, Kander T. Effects of naturopathic medicines on Multiplate and ROTEM: a prospective experimental pilot study in healthy

Literaturverzeichnis

- volunteers. *BMC complementary and alternative medicine*. 2016;16:64-64.
75. Sun P, McMillan-Ward E, Mian R, Israels SJ. Comparison of light transmission aggregometry and multiple electrode aggregometry for the evaluation of patients with mucocutaneous bleeding. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2019;41(1):133-140.
76. Gurbel PA, Bliden KP, Tantry US, et al. First report of the point-of-care TEG: A technical validation study of the TEG-6S system. *Platelets*. 2016;27(7):642-649.
77. Brown M, Wittwer C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry*. 2000;46(8):1221-1229.
78. Inc. TFS. Thermo Fischer Scientific Inc. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/N1142#/N1142>. Published 2020. Accessed 20.04.2020, 2020.
79. Hu F, Liu W, Yan L, Kong F, Wei K. Optimization and characterization of poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles loaded with astaxanthin and evaluation of anti-photodamage effect *in vitro*. *Royal Society Open Science*. 2019;6(10):191184.
80. Xu P, Gullotti E, Tong L, et al. Intracellular drug delivery by poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, revisited. *Mol Pharm*. 2009;6(1):190-201.
81. Smethurst PA, Onley DJ, Jarvis GE, et al. Structural basis for the platelet-collagen interaction: the smallest motif within collagen that recognizes and activates platelet Glycoprotein VI contains two glycine-proline-hydroxyproline triplets. *J Biol Chem*. 2007;282(2):1296-1304.
82. Degen H, Borst O, Ziegler M, et al. ADPase CD39 Fused to Glycoprotein VI-Fc Boosts Local Antithrombotic Effects at Vascular Lesions. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(8):e005991.

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertation

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertation

Diese Arbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, Innere Medizin III Kardiologie und Angiologie unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz durchgeführt.

Die Versuche des Flusskammer-Experiments, der Impedanzaggregometrie und der Thrombelastografie erfolgten eigenständig nach Anleitung durch Herrn Alexander Witte.

Die Versuche des FACS erfolgten unter Anleitung durch Herrn Frederic Emschermann.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Herrn Alexander Witte, Frau Dr. rer. nat. Anne-Kathrin Rohlfing und Herrn PD. Dr. med. Dominik Rath.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 17.12.20

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema GPVI-Rezeptor <i>modifiziert nach</i> ²¹	4
Abbildung 2: GPVI-Rezeptor-Kollagen-Interaktion.....	5
Abbildung 3: Schema eines 200 nm-Nanopartikels.	12
Abbildung 4: Fotoaufnahme der Flusskammer.	15
Abbildung 5: Schematischer Blutfluss durch die Flusskammer modifiziert nach 70.	15
Abbildung 6: Flusskammer mit eingespanntem Cover-Slip.....	18
Abbildung 7: Flusskammer unter dem Mikroskop während der Blutperfusion.	18
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Blutperfusion durch die Flusskammer.	20
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Nanopartikelperfusion durch die Flusskammer.	21
Abbildung 10: Bilder unterschiedlicher Flusskammerabschnitte unter verschiedenen Scherraten (die dunklen runden Herde stellen die einzelnen Thromben dar).	27
Abbildung 11: FACS-Analyse Nanopartikel.	29
Abbildung 12: GPVI-Nanopartikel unter dem Mikroskop.....	31
Abbildung 13: Fluoreszenzaufnahmen der GPVI-Nanopartikel im zeitlichen Verlauf.	32
Abbildung 14: Anteil der Fläche mit Fluoreszenz-Signal an der Gesamtfläche aus Bildern der Abbildung 13.....	32
Abbildung 15: Bilderauswahl der Nanopartikelanlagerung aus beiliegender Videodatei.	33
Abbildung 16: Nanopartikel auf Kollagenfibrillen.	34
Abbildung 17: Thrombusbildung und Fluoreszenzsignal der GPVI- Nanopartikel.....	36
Abbildung 18: Thrombusfläche in Prozent verschiedener Scherraten unter Einfluss von BSA-Nanopartikeln, GPVI-Nanopartikeln, PBS und gelöstem PBS.....	38

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 19: Analyse der Thromben nach ihrer Größe. Unterteilung der Menge der Thromben nach ihrer Größe in Tertilen.....	40
Abbildung 20: Thrombelastographie unter Einfluss der Nanopartikel mit der ADP-Testkassette.	41
Abbildung 21: Impedanzaggregometrie.	42
Abbildung 22: Schematische Darstellung der Thrombozytenaggregation bei einer Scherrate von 3500 s^{-1}.	44

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AUC	"Area under the Curve"
aq	in Wasser gelöst
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium-2+-Ionen
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
FACS	"Fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie
Fc	"fragment crystallizable", Fc-Teil eines Antikörpers
FcR γ	Fc-Rezeptor γ -Kette
FSC	"Foreward side scatter"
GPIIb-V-IX	Glykoprotein IIb-V-IX
GPVI	Glykoprotein VI
GPVI-Fc	rekombinantes dimeres Glykoprotein VI-Fc Fusionsprotein
GPO	Glycin-Prolin-Hydroxyprolin
ITAM	Immunoreceptor-tyrosine-based activation motif
PBS	"Phosphate buffered saline", Phosphat-gepufferte Salzlösung
PI3K	Phosphatinosit-3-Kinase
PLC γ 2	Phospholipase γ 2
PLGA	"Poly(lactic-co-glycolic acid)"
SSC	"Side Scatter"
SEM	"Standard error of Mean", Standardfehler des Mittelwertes
TEG	Thrombelastographie
tPA	"tissue plasminogen activator"

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Gawaz für die intensive Betreuung und die Bereitstellung des Themas meiner Dissertation. Im Besonderen danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit am Universitätslabor der Inneren Medizin III durchführen zu können. Ich weiß die Bereitstellung der Laborausstattung, die Benutzung der hochsensiblen Geräte und die Zurverfügungstellung der Verbrauchsmaterialien sehr zu schätzen.

Ich bedanke mich bei meinem Betreuer, Herrn Alexander Witte, der mir die experimentellen Grundlagen für die Ausarbeitung meiner Arbeit vermittelte und der zu jeder Zeit für Fragen zur Verfügung stand.

Ich danke Herrn Dr. Netanel Korin für die Anfertigung der verwendeten Nanopartikel.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. rer. nat. Anne-Kathrin Rohlfing, Frau Dr. Tastiana Castor, Herrn Frederic Emschermann, Herrn PD. Dr. med. Dominik Rath sowie allen Mitarbeitern der Arbeitsgemeinschaft von Herrn Prof. Gawaz für die fachliche Betreuung.

Ich danke allen freiwilligen Blutspendern, die zu einem großen Teil zur Durchführung der Arbeit beitrugen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir stets den nötigen Rückhalt gab und mir mit guten Ratschlägen zur Seite stand. Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für die Unterstützung und die Ermöglichung des Medizinstudiums.