Thrombozytenaktivität und Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate als Marker in der Sportmedizin

Platelet activity and platelet-leukocyte conjugate formation as markers in sports medicine

Thomas Hilberg*

Lehrstuhl für Sportmedizin, Friedrich-Schiller-Universität
Jena, Jena, Deutschland

Zusammenfassung

Thrombozyten haben eine zentrale Bedeutung bei der Arteriosklerose und auch bei akuten thrombotischen Ereignissen. Körperliche Aktivität besitzt ein hohes Potential zur Vermeidung von Gefäßerkrankungen, dagegen wird intensiven Belastungen ein mögliches Risikopotential bei der Auslösung kardiovaskulärer Ereignisse zugeschrieben. Bei den notwendigen Untersuchungen thrombozytärer Funktionszustände nach körperlicher Belastung und Training werden zunehmend flowzytometrische Methoden eingesetzt, weil diese Technik die Möglichkeit impliziert, Veränderungen direkt auf der Oberfläche von Thrombozyten zu verifizieren. Da diese Veränderungen nach körperlichen Belastungen recht moderat ausfallen, sind Verfahren mit hoher Sensitivität notwendig. Zur Untersuchung dieser Veränderungen wurden vier Assays aufgebaut: a) Spontanexpression von Aktivierungsantigenen, b) Stimulationsassay, c) Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate spontan und d) stimuliert.

In einigen Untersuchungen konnte eine erhöhte CD62P- und PAC-1-Expression auf der Oberfläche von Thrombozyten nach körperlicher Belastung bei Gesunden nachgewiesen werden. Während die Untersuchungen der CD62P-Expression auf unstimulierten Thrombozyten nach körperlicher Belastung bei geringen Veränderungen uneinheitliche Resultate zeigen können, führen körperliche Belastungen im Stimulationsversuch regelhaft zu einer erhöhten Thrombozytenreaktivität. Obwohl der Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Konjugaten zunehmende analytische Bedeutung zukommt, wurden belastungsinduzierte Veränderungen der Konjugate bisher kaum untersucht. In den wenigen vorliegenden Studien konnte aber gezeigt werden, dass es

nach körperlichen Belastungen zu einer Zunahme an Thrombozyten-Leukozyten-Konjugaten sowie auch ihrer Subpopulationen kommt, welche sich aber sehr schnell wieder auflösen.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein Stimulationsassay sowie die Bestimmung der Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate sensitivere Verfahren darstellen als die Bestimmung von spontanen Aktivitätsmarkern wie z.B. das CD62P.

Zusammenfassend sind die beschriebenen Methoden nicht nur für Untersuchungen von physiologischen Veränderungen bei Thrombozyten einsetzbar, sondern können auch ohne weiteres bei der Untersuchung von pathologischen Zuständen verwendet werden.

Schlüsselwörter: Aggregate; CD62P; Konjugate; PAC-1; Thrombozyten; TRAP (thrombin-receptor activating peptide).

Abstract

Platelets are involved in the development of arteriosclerosis as well as in acute thrombotic events. Physical exercise helps to avoid arteriosclerosis, but acute intensive exercise seems to trigger cardiovascular events. Today, flowcytometric methods are more often used for investigations of exercise-induced changes in platelet function because of the possibilities to investigate changes directly on the surface of the platelets. To verify exercise-induced changes in platelet function, it is necessary to use a sensitive method because of the temporarily small changes after exercise. For these investigations, four assays have been developed: a) spontaneous expression of activation markers, b) stimulation assay, c) platelet-leukocyte conjugates spontaneous, and d) stimulated. In some studies, increased levels of CD62P and PAC-1 expression on platelets could be investigated. Although the results of investigations in platelet activity are not in line, exercise leads to a rise in agonist-stimulated platelet reactivity after exercise. During the last years, the investigations of platelet-leukocyte conjugates have become more and more important. However, only few studies have been engaged in investigations of conjugates and exercise. In the majority of these studies it could be demonstrated that exercise is

*Korrespondenz: Thomas Hilberg, PD Dr. med. Dr. phil.,
Lehrstuhl für Sportmedizin der Friedrich-Schiller-Universität
Jena, Wölnitzerstr. 42, 07749 Jena, Deutschland
Tel.: +49 03641-945661
Fax: +49 03641-945652
E-mail: thomas.hilberg@uni-jena.de

able to increase the number of platelet-leukocyte conjugates as well as the subpopulations, but they are quickly disbanded. These results could demonstrate that a stimulation assay and the determination of platelet-leukocyte-conjugates are more sensitive markers than the investigation of spontaneous activation markers like CD62P alone.

In the present article, methods are described to investigate physiological changes in platelet function e.g., after physical exercise. Nevertheless, these methods can also be used for investigations of pathological situations.

Keywords: aggregates; CD62P; conjugates; PAC-1; platelets; TRAP (thrombin-receptor activating peptide).

Einleitung

Thrombozyten haben sowohl eine zentrale Bedeutung bei der Arteriosklerose als auch bei akuten thrombotischen Ereignissen [1, 2]. Körperliche Aktivität besitzt auf der einen Seite ein hohes Potential zur Vermeidung von Gefäßerkrankungen, auf der anderen Seite wird intensiven akuten Belastungen ein mögliches Risikopotential bei der Auslösung akuter kardiovaskulärer Ereignisse zugeschrieben [3–6]. Deshalb haben Untersuchungen von Veränderungen der Thrombozytenfunktion in Abhängigkeit von unterschiedlichen körperlichen Belastungen bzw. körperlichem Training eine hohe Bedeutung. Flowzytometrische Methoden bieten die Möglichkeit, thrombozytäre Funktionsänderungen direkt auf der Oberfläche des Thrombozyten zu untersuchen und vermeiden es, auf indirekte Marker zum Nachweis, wie das β -Thromboglobulin bzw. aggregometrische Verfahren, zurückgreifen zu müssen [7, 8]. Während allerdings die Bestimmung von Zellpopulationen der weißen Blutzellreihe mit Hilfe flowzytometrischer Methoden und die Überprüfung ihrer Funktionszustände im Zusammenhang mit körperlicher Belastung schon seit vielen Jahren in der Sportmedizin standardisiert durchgeführt werden, liegt eine deutlich geringere Anzahl Arbeiten vor, die sich mit dem notwendigen flowzytometrischen Nachweis von belastungsinduzierten Veränderungen bei Thrombozyten auseinandergesetzt haben. Schon Anfang der 90er Jahre konnten in einer ersten Studie Änderungen thrombozytärer Funktionszustände mit Hilfe der Durchflusszytometrie direkt auf der Thrombozytenoberfläche nachgewiesen werden [9]. Bisher fehlt es aber an einer klaren Risikoeinschätzung bei Veränderungen der Thrombozytenfunktion nach akuten körperlichen Belastungen in unterschiedlichen Personengruppen.

Aufgabe dieser Übersichtsarbeit ist die Darstellung verwendeter flowzytometrischer Methoden zur Bestimmung der Thrombozytenfunktion in der Sportmedizin mit Anmerkungen zur Sensitivität, die Auflistung interessanter Detektions- bzw. Funktionsmarker sowie das Geben von Hinweisen, welche die Verarbeitung von Thrombozyten erleichtern sollen. Dabei wird aber nur auf bestimmte Verfahren und Oberflächenmarker eingegan-

gen, ohne den Anspruch, eine komplette Übersicht über alle Oberflächenmarker von Thrombozyten zu geben. Hier wird auf schon vorhandene Übersichtsarbeiten verwiesen [10, 11]. Die sportmedizinische Anforderung macht es notwendig, auch geringe belastungsinduzierte Veränderungen der Thrombozytenfunktion in Verbindung mit körperlicher Aktivität und Training nahe der in vivo-Situation untersuchen zu können. Dabei können diese Verfahren aufgrund der hohen Sensitivität auch bei der Beurteilung pathologischer Zustände, wie z. B. bei bestimmten Thrombozytenfunktionsstörungen, arteriosklerotischen Erkrankungen bzw. Diabetes mellitus, helfen.

Probenaufbereitung

Flowzytometrische Untersuchungen von Thrombozyten können im Vollblut, mit gewaschenen Thrombozyten und auch im plättchenreichen Plasma (PRP) erfolgen. Da aber sowohl die Herstellung von PRP als auch das Waschen von Thrombozyten die Entwicklung von Artefakten unterstützen, ist, sofern möglich, eine Vollblutmethode vorzuziehen. Hier bleiben die Thrombozyten in einem für sie physiologischeren Milieu und auch der zeitliche und personelle Arbeitsaufwand ist bei der Vollblutmethode geringer. Für die Bestimmung der Thrombozyten aus antikoaguliertem Vollblut sind nur sehr geringe Blutmengen erforderlich. Als Antikoagulanzen wird häufig eine Natriumcitratlösung (3,8%) in einem Verhältnis 1:10 mit Vollblut vermischt. Auch andere Antikoagulantien wie CTAD (Citrat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol) bzw. Heparin konnten erfolgreich angewendet werden. EDTA und Lithium-Heparin werden dagegen nicht empfohlen, da EDTA z.B. die Anbindung natürlicher Liganden, wie beispielsweise Fibrinogen, an den GPIIb-IIIa-Komplex vermeidet und diesen dissoziiert, während Lithium-Heparin an Thrombozyten anbindet und diese aktiviert. Bei der Blutabnahme sollte darauf geachtet werden, nicht oder nur sehr kurz zu stauen (<30 s), mit möglichst <40 mmHg, und dabei sollte jeweils frisch mit einer entsprechend großlumigen Kanüle (21 Gauge und größer) punktiert werden [11]. Die ersten 2 mL der Abnahme müssen dann verworfen und die Blutprobe muss innerhalb von 15 min nach der Blutabnahme verarbeitet werden. Bei der Verwendung von Vollblut für die Differenzierung der Thrombozyten ist allerdings der Einsatz eines fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpers als Detektionsmarker häufig in Kombination mit einem zusätzlichen Antikörper, der das Aktivierungssignal erfasst, notwendig.

Fixierung der Blutproben

Zur Stabilisierung der Thrombozyten werden häufig Fixiermedien eingesetzt, hier in erster Linie Paraformaldehyd (PFA). Es konnte aber auch in eigenen Arbeiten gezeigt werden, dass PFA die Thrombozytenfunktion

beeinflusst. So führt PFA zu einer geringen, aber systematischen Aktivierung von Thrombozyten mit Formwandel, erhöhter GPIIb-IIIa-Expression auf der Oberfläche mit Konformationsänderung des Rezeptors sowie zu einer Veränderung des GPIb-V-IX-Komplexes und möglicherweise auch anderer Epitope [12]. Während Formaldehyd die Expression von CD62P und CD63 verstärkt [13], wird diese allerdings durch PFA anscheinend weniger beeinflusst [12]. Nur Hue et al. beschreiben einen milden Einfluss von PFA auf die CD62P-Expression. Im Normalfall wird PFA in einer Endkonzentration von 0,5–1% eingesetzt [10, 14, 15]. Es muss jeweils in Voruntersuchungen geklärt werden, ob die gewählte Fixiermethode mit der Antikörperbindung interferiert.

Geringe Veränderungen, wie sie auch bei bestimmten körperlichen Belastungen auftreten, können mitunter bei einer fixierten Nachweismethode durch deren Artefakte übersehen werden. Ob diese geringen Veränderungen eine klinische Relevanz besitzen, muss an anderer Stelle diskutiert werden. Andere Substanzen zur Stabilisierung, wie z.B. ThromboFix™, scheinen bei der Funktionsbestimmung von Thrombozyten bei nicht vermeidbarem Zeitintervall Vorteile zu besitzen. Dies wird derzeit untersucht (eigene unveröffentlichte Daten). Auch weitere Substanzen, wie z.B. das CyFix II, wurden in der Vergangenheit zur Stabilisierung der Thrombozyten verwendet [16]. Insgesamt ist eine direkte unfixierte Verarbeitung der Thrombozytenproben die beste Alternative; nur bei einem zwingend einzuhaltenden Zeitfenster sollten die Thrombozyten fixiert werden.

Einsatz von Stimulatoren

Als geeignete Stimulatoren zur Überprüfung der Thrombozytenreaktivität in vitro haben sich ADP und TRAP-6 (thrombin-receptor activating peptide 6) bewährt [17, 18], aber auch andere Stimulatoren wie Kollagen, Epinephrin, Thrombin und Thromboxan A₂-Analoga sind möglich [11]. Dabei kann ADP als mild stimulierendes Agens angesehen werden, da für eine umfassende Reaktion des Thrombozyten eine weitere autokrine Stimulation notwendig ist. Dagegen führt TRAP-6 bei vergleichbarer Dosis zu deutlich stärkeren Reaktionen des Thrombozyten [19].

Thrombozyten

Detektionsmarker

CD41-Antigen (GPIIb; IIb integrin) ist ein transmembranes Glykoprotein mit zwei Ketten (GPIIb α ; 120 kDa und GPIIb β ; 23 kDa), die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. CD41 ist nicht-kovalent mit CD61 (GPIIIa; β 3 integrin) assoziiert und bildet dabei den GPIIb-IIIa (CD41/61)-

Komplex (Fibrinogenrezeptor). Es befinden sich ca. 65.000 ± 10.000 ($\pm$ SEM) GPIIb/IIIa-Moleküle auf der Oberfläche eines ruhenden erwachsenen Thrombozyten. CD41 wird von Thrombozyten, Megakaryozyten und einer Subpopulation von CD34⁺-Zellen exprimiert und ist damit wahrscheinlich ein früherer Marker der Megakaryozyten. In inaktiver Form bindet der Rezeptor an immobilisiertes Fibrinogen, nach Aktivierung kann der Rezeptor lösliches Fibrinogen, Fibronectin, vWF, Vitronectin und Thrombospondin binden und ist damit insgesamt in die Thrombozytenaggregation involviert [20–22]. CD41 wird häufig als Detektionsmarker für den Nachweis von Thrombozyten eingesetzt, da er thrombozytenspezifisch ist.

CD42b-Antigen (GPIIb α) ist ein transmembranes Glykoprotein von 170 kDa, das über eine Disulfidbrücke mit CD42c (GPIIb β) verbunden ist. GPIb formt einen nicht-kovalent gebundenen Komplex mit GPIX (CD42a) und GPV (CD42d). Dieses Antigen wird auf Thrombozyten und Megakaryozyten gefunden. Der CD42a-d-Komplex wird auch als vWF-Rezeptor bezeichnet [23].

Das CD41-, CD42b- sowie CD42a-Antigen stellen ideale Rezeptoren zur Detektion von Thrombozyten dar. In den Abbildungen 1 und 2, A und B werden Gating-strategien für die Detektion von Thrombozyten unstimuliert und im Stimulationsversuch dargestellt.

Funktionsmarker

CD62P-Antigen (P-Selectin, GMP-140, PADGEM) ist der klassische Marker zum Nachweis einer Thrombozytenaktivierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie. CD62P-Antigen (140 kDa) ist ein Mitglied der Selektinfamilie und in Megakaryozyten, in Weibel-Palade-Körperchen in Endothelzellen und in α -Granulas von Thrombozyten nachweisbar. CD62P wird nach Aktivierung in vivo und in vitro transloziert auf der Membranoberfläche von Thrombozyten nachweisbar. CD62P ist involviert in die Verbindung von Thrombozyten mit Leukozyten über den P-Selektin-Glykoprotein-Ligand (PSGL-1). Da eine Degranulation von α -Granulas notwendig ist, damit CD62P auf der Oberfläche des Thrombozyten nachweisbar wird, ist das CD62P ein robuster und spezifischer, aber insbesondere bei frühen Aktivierungsprozessen kein hochsensitiver Marker für Veränderungen der Thrombozytenfunktion [24, 25]. Zwar ist die Oberflächenexpression von CD62P in vitro nicht reversibel, es konnte aber nachgewiesen werden, dass zirkulierende degranulierte Thrombozyten CD62P auf der Oberfläche verlieren, dabei aber mit normaler Funktionsfähigkeit weiter zirkulieren [26, 27].

PAC-1: Nach Aktivierung der Thrombozyten erfolgt eine Konformationsänderung des GPIIb-IIIa-Rezeptors mit neuen Bindungsstellen für Fibrinogen. Dieser Vorgang ist unabhängig von Sekretionsprozessen. Der monoklonale Antikörper PAC-1 (IgM-Pentamer) ist direkt gegen die neu dargebotene Bindungsstelle gerichtet und weist deshalb eine Thrombozytenaktivierung auf der

Abbildung 1 Gatingstrategie bei unstimulierten Thrombozyten im Vollblut. (A) Gating der zentralen Thrombozytenpopulation, (B) Auftrennung in zentrale Thrombozytenpopulation, links vermehrt Mikropartikel, rechts vermehrt Aggregate, (C) Darstellung der CD41-PE-Expression (zentrale Thrombozytenpopulation), (D) Darstellung der CD62P-FITC-Expression (zentrale Thrombozytenpopulation, Cut-off gesetzt mit Hilfe einer Isotyp-Kontrolle); SS, Seitwärtsstreulicht; FS, Vorwärtsstreulicht (Beckman Coulter EPICS® XL und System II).

Oberfläche nach [28]. Abhängig vom eingesetzten Agonisten und der Nachweismethode konnten 10.000–25.000 PAC-1-Moleküle/Thrombozyt bis hin zu 40.000–50.000 Kopien des GPIIb-IIIa-Komplexes mit Fibrinogen auf der Oberfläche des Thrombozyten nachgewiesen werden [29, 30].

CD63-Antigen ist ein Mitglied der Tetraspanin (TM4SF)-Familie integraler Proteine. CD63 formt wie andere Tetraspanine (CD9, CD81, CD82) Komplexe mit VLA-3, der Phosphatidylinositol-4-Kinase, mit VLA-6, CD11/18 sowie der Tyrosinkinase. Das Molekulargewicht liegt in etwa zwischen 40–55 kDa. CD63 wurde zum ersten Mal in Granulas von ruhenden Thrombozyten nachgewiesen und nach Aktivierung auf der Oberfläche von Thrombozyten. CD63 wurde später identifiziert als Granulophysin, ein Glykoprotein aus den "dense granulas" der Thrombozyten, welches bei Patienten mit Hermansky-Pudlak-Syndrom fehlt. Es kommt aber zusätzlich auch in den normalen thrombozytären Lysosomen vor [31–33]. Zusätzlich wird CD63 auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen und schwach auf neutrophilen Granulozyten und T- und B-Lymphozyten exprimiert und darüber hinaus verstärkt von stimulierten neutrophilen Granulozyten [25, 34, 35].

Detektion und Darstellung der Thrombozyten

Zur Untersuchung von Thrombozyten im Vollblut eignet sich zunächst einmal die Darstellung der Vorwärtsstreulichteigenschaften (FSC) gegen einen Detektionsmarker, z.B. CD41-PE (siehe Detektionsmarker – Phycoerythrin), um die Thrombozyten differenzieren zu können (Abbildungen 1A, B). Die Verwendung des Detektionsmarkers sollte nach internationalem Konsens in PE-Konjugation erfolgen, da eine Überlappung von PE in den kürzerwelligen FITC-Emissionsbereich (Fluoresceinisothiocyanat) um 520 ± 10 nm in etwa bei 0,1–0,5% liegt, wohingegen FITC in den längerwelligen Emissionsbereich von PE bei 570 ± 10 nm mit etwa 15–20% einstrahlt. Die in jedem Fall notwendige Kompensation der Überlappungsbereiche würde bei Verwendung eines FITC-Detektionsmarkers und eines Aktivitätsmarkers in PE-Konjugation das Aktivitätssignal deutlich mehr beeinflussen. Die logarithmische Darstellung FSC gegen Detektionsmarker ergibt eine zentrale Thrombozytenwolke, die eindeutig abgrenzbar sein muss. Zur genaueren Detektierung und Validisierung kann nach dem Gaten dieser Wolke FSC gegen SSC (Seitwärtsstreulichteigenschaften) dargestellt werden. Hier sollte eine zentrale Kernpopulation von Throm-

Abbildung 2 Gatingstrategie bei TRAP-6-stimulierten Thrombozyten im Vollblut. (A) Gating der zentralen Thrombozytenpopulation, (B) Auftrennung in zentrale Thrombozytenpopulation, links vermehrt Mikropartikel, rechts vermehrt Aggregate, (C) Darstellung der CD41-PE-Expression (zentrale Thrombozytenpopulation), (D) Darstellung der CD62P-FITC-Expression (zentrale Thrombozytenpopulation, Cut-off gesetzt mit Hilfe einer Isotyp-Kontrolle); SS, Seitwärtsstreulicht; FS, Vorwärtsstreulicht.

bozyten nachweisbar sein, flankiert von einer kleineren Population mit geringerem FSC (hauptsächlich Mikropartikel) bzw. größerem FSC (eher Aggregate) (Abbildungen 1A-C, 2A-C).

Innerhalb des neu gesetzten Gates mit der abgegrenzten Thrombozytenkernpopulation wird dann die Expression eines verwendeten Aktivitätsmarkers, z.B. CD62P-FITC (siehe Aktivitätsmarker) überprüft (Abbildungen 1D, 2D). Die Auswertung kann dabei in zwei verschiedenen Formen erfolgen. Einerseits kann die Zahl CD62P-positiver und damit aktiver Thrombozyten überprüft werden oder es erfolgt die Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) für CD62P. Insbesondere bei der Auswertung nach Prozenten positiver Zellen ist aber ein paralleler Ansatz mit einer Isotyp-Kontrolle notwendig, da die Zahl der positiven Zellen in der Kontrolle vom Hauptergebnis abgezogen werden muss. Anhand der Isotyp-Kontrolle wird auch ein Cut-off-Wert definiert, der in der Regel 1% positive Zellen abgrenzt. Die Sensitivität der Methode liegt beim Nachweis Prozent positiver Zellen etwas höher als beim Nachweis der MFI, wobei bei der ersteren Methode auch wenige Zellen mit gering exprimierten Markern nachgewiesen werden können. Die zweite Methode hat ihre Vorteile, wenn eine Zunahme der Dichte schon vorhandener Aktivitätsmarker nachgewie-

sen werden soll. Im Stimulationsversuch mit z.B. TRAP-6 kann die gleiche Vorgehensweise empfohlen werden (Abbildungen 2A-D).

Veränderungen der Thrombozytenaktivität unter körperlicher Belastung

Stufenförmige erschöpfende körperliche Belastungen bei Gesunden führen zu einem geringen Anstieg von CD62P und von PAC-1 auf der Oberfläche des Thrombozyten [36]. Mockel et al. [16, 37] fanden vergleichsweise sowohl nach erschöpfender Fahrradergometrie als auch nach einem Triathlon erhöhte CD62P-Expressionen auf den Thrombozyten. Kestin et al. dagegen konnten zwar eine Erhöhung von GPIb-IX, GPIV und teilweise von PAC-1 nach Maximalbelastung bei Untrainierten nachweisen, allerdings fanden sie bei diesen keine Anstiege beim CD62P bzw. bei keinem Epitop bei trainierten Personen [9]. Dies ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass der Trainingsstatus bei diesen Veränderungen eine Rolle spielt. Zusätzlich scheint nach moderater Dauerbelastung eine Aktivierung geringer zu sein. So konnte nach einer 60 bis 120-minütigen Belastung mit 90% der Dauerleistungsgrenze keine eindeutige Erhöhung der CD62P-Expression nachgewiesen werden [38]. Auch

konnten in einer weiteren Studie nach extrem kurzen, aber hoch intensiven Belastungen auf dem Fahrradergometer (15, 45 und 90 s) keine erhöhten CD62P-Expressionen bei trainierten Probanden verifiziert werden [39]. Damit ist die Zunahme der direkt messbaren CD62P-Expression nach körperlicher Belastung als Maß für eine Erhöhung der Thrombozytenaktivität bei Gesunden eher als gering einzuschätzen.

Deutlicher als die moderaten Veränderungen bei der Thrombozytenaktivität zeigen sich Veränderungen bei der Thrombozytenreaktivität im Stimulationsversuch mit ADP oder TRAP-6. Es konnte weitgehend bei allen Belastungsformen ein Anstieg der Thrombozytenreaktivität nach körperlicher Belastung nachgewiesen werden. Dieser belastungsinduzierte Anstieg der Thrombozytenreaktivität war in einer zusätzlichen Untersuchung zwischen gesunden jungen Probanden und gut eingestellten Typ I-Diabetikern vergleichbar [40].

Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate

Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate

In in vitro-Studien konnte gezeigt werden, dass aktivierte Thrombozyten an Leukozyten anbinden. Die Anbindung von Thrombozyten an Leukozyten führt zu morphologischen Änderungen [41], Zytokinproduktion [42], der Produktion von Sauerstoffradikalen [43], Hochregulation zellulärer Adhäsionsproteine [44] bzw. möglicherweise einer Gewebefaktorexpression in Monozyten [45]. Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate in der Zirkulation konnten bei Patienten mit Sepsis [46], koronarer Herzkrankung [47], nach koronarer Angioplastie [48] und Hämodialyse [49] sowie vorübergehend vermehrt nach körperlicher Belastung nachgewiesen werden [38–40].

Die Verbindung zwischen Thrombozyten und Granulozyten sowie Monozyten erfolgt hauptsächlich über CD62P und den P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) und CD15, bzw. über den GPIIb-IIIa-Rezeptor und CD11b/CD18 [50, 51]. Zum Nachweis von Thrombozyten-Leukozyten-Konjugaten im Vollblut werden zunächst monoklonale Antikörper gegen z.B. CD45-Antigen eingesetzt, um die Leukozyten zu detektieren. CD45-Antigen ist ein integrales Protein mit einer Kette und fünf Isoformen sowie einem Molekulargewicht von 180–220 kDa. CD45-Antigen befindet sich auf der Oberfläche aller menschlichen Leukozyten, dabei auf Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten, Monozyten, basophilen Granulozyten und neutrophilen Granulozyten in entsprechend absteigender Konzentration. CD45-Antigen ist eine Hauptkomponente der Lymphozytenmembran, kommt auf Erythrozyten und Thrombozyten allerdings nicht vor. Ein weiterer monoklonaler Antikörper, z.B. CD41, wird dann zur Detektion von Thrombozyten bzw. Mikropartikeln auf den gegateten Leukozyten verwendet. Dieser Assay kann sowohl als unstimulierter Test

als auch als Stimulationsassay, z.B. mit TRAP-6, durchgeführt werden.

Subpopulationen der Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate

Zur Differenzierung der Subpopulationen muss ein zusätzlicher Detektionsmarker eingesetzt werden, der hilft, die Leukozyten zu unterscheiden. Hier hat sich ein monoklonaler Antikörper gegen das CD14-Antigen bewährt. Das CD14-Antigen ist ein membranständiges einkettiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 53–55 kDa. CD14-Antigen wird stark auf Monozyten exprimiert und sehr schwach auf neutrophilen Granulozyten und B-Lymphozyten und es fehlt auf T-Lymphozyten, NK-Zellen, Erythrozyten und Thrombozyten. [52–54]. Furmann et al. untersuchten die Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Konjugaten als Marker für das Auftreten eines akuten Myokardinfarkts und konnten zeigen, dass bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt im Vergleich zu Patienten ohne Myokardinfarkt die Anzahl der Thrombozyten-Monozyten-Konjugate deutlich erhöht war [55]. Aufgrund dieser Studie wiesen die Autoren den Thrombozyten-Monozyten-Konjugaten eine entsprechende Bedeutung als früher Marker beim Myokardinfarkt zu. Auch nach akuter intensiver körperlicher Belastung kommt es zum passageren Anstieg von Thrombozyten-Monozyten-Konjugaten, welche sich allerdings frühzeitig wieder ablösen und nach einer Stunde wieder auf das Ausgangsniveau absinken.

Detektion und Darstellung der Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate ohne bzw. mit Subpopulationen

Zunächst erfolgt eine Darstellung der Zellen in Form SSC versus CD45 (Abbildungen 3A, B). Hierdurch können zunächst die Leukozyten detektiert und entsprechend gated werden. Bei der Bestimmung der Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate ohne ihre Subpopulationen reicht es aus, in diesem Gate nach z.B. CD41-positiven Ereignissen zu untersuchen. Damit wird natürlich nicht ausgeschlossen, dass auch Mikropartikel auf Leukozyten detektiert werden. Bei der weiteren Differenzierung in Subpopulationen wird zusätzlich zu CD45 auch CD14 als Marker verwendet, um z.B. die Monozyten eindeutig zu differenzieren. Nach der Darstellung SSC versus CD45 erfolgt die Darstellung CD14 versus CD45. In dieser Darstellungsart können die leukozytären Subpopulationen eindeutig gated und im Weiteren auf ein Vorhandensein von CD41-Antigen auf der Oberfläche untersucht werden. Ist eine weitere Differenzierung gewünscht, kann z.B. CD16 im Stimulationsversuch zur Differenzierung der Monozyten in reguläre Monozyten ($CD14^{+}16^{-}$) bzw. Prämakrophagen ($CD14^{+}16^{+}$) eingesetzt werden [39, 40, 56]. Bei der Erstellung des Protokolls ist hier aber die Kompensation etwas aufwändiger.

Abbildung 3 Gatingstrategie bei Thrombozyten-Leukozyten-Konjugaten im Vollblut (unstimuliert). (A) Gating der Leukozytenpopulation, (B) Auftrennung in Leukozytensubpopulationen, links Granulozyten, rechts Lymphozyten und NK-Zellen, oben Monozyten, (C) Darstellung der CD41-PE-Expression auf Granulozyten, (D) Darstellung der CD41-PE-Expression auf Monozyten, (E) Darstellung der CD41-PE-Expression auf Lymphozyten; SS, Seitwärtsstreulicht.

Veränderungen der Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate nach körperlicher Belastung

Belastungsinduzierte Veränderungen der Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate wurden bisher nur in wenigen Arbeiten untersucht. Dabei verwendete die Arbeitsgruppe um Perneby et al. eine flowzytometrische Methode, in den Arbeiten von Wang et al. dagegen wurden hauptsächlich andere Methoden zum Nachweis eingesetzt [57–59]. Insgesamt weisen Studien daraufhin, dass es auch bei unterschiedlichen Belastungsformen (Maximalbelastung bis moderate Ausdauerbelastung) zu einer Zunahme der Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate kommt [38–40]. Dabei kommen sowohl in Ruhe als auch nach Belastung Thrombozyten-Monozyten-Konjugate in Relation am meisten vor, absolut gesehen dagegen die Thrombozyten-Granulozyten-Konjugate. Eine Zunahme der Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate ist schon sehr rasch, z.B. nach einer 45-sekündigen Maximalbelastung, nachweisbar. Eine Stunde nach Belastung ist die Zahl der Thrombozyten-Leukozyten-Konjugate auf den Ausgangswert zurückgegangen, was wahrscheinlich auf eine Ablösung der Thrombozyten zurückzuführen ist, da ein Zellverlust nicht nachgewiesen werden konnte [39, 56]. Ein Kurzzeitbelastungsmodell mit einer Maximalbelastung von 90 Sekunden Dauer wurde verwendet, um die

Konjugatbildung näher zu untersuchen. In einem Stimulationsversuch mit fünf monoklonalen Antikörpern (CD45, CD14, CD16, CD41 und CD62P) konnte Folgendes nachgewiesen werden: Im Ruhezustand liegen im Blut vermehrt Konjugate mit regulären Monozyten ($CD14^{+}16^{-}$) assoziiert vor, im Gegensatz zu Konjugaten mit Prämakrophagen ($CD14^{+}16^{+}$). Reguläre Monozyten scheinen also bei der Konjugatbildung verstärkt berücksichtigt zu werden. Nach Belastung kommt es zu einem vergleichbaren Anstieg beider Konjugat-Subpopulationen. Interessanterweise konnten auch die höchsten CD62P-Expressionen auf den Konjugaten mit regulären Monozyten nachgewiesen werden [56].

Schlussfolgerung

Flowzytometrischen Verfahren kommt auch bei der Untersuchung belastungsinduzierter Veränderungen von Thrombozyten eine wachsende Bedeutung zu. Mit dieser Methode können Veränderungen direkt auf der Oberfläche von Thrombozyten gemessen und damit erstens grundlegende physiologische Fragestellungen sensitiv beantwortet, zweitens aber auch pathologische Veränderungen diagnostisch erfasst werden. Andererseits können in der Sportmedizin entwickelte Belastungsmodelle

in Zukunft helfen, z.B. die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Konjugaten mit Hilfe der Flowzytometrie näher zu untersuchen.

Literatur

1. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002; 8:1227–34.
2. Kullo IJ, Gau GT, Tajik AJ. Novel risk factors for atherosclerosis. *Mayo Clin Proc* 2000;75:369–80.
3. Albert CM, Mittleman MA, Chae CU, Lee IM, Hennekens CH, Manson JE. Triggering of sudden death from cardiac causes by vigorous exertion. *N Engl J Med* 2000;343: 1355–61.
4. Mittleman MA, Maclure M, Tofler GH, Sherwood JB, Goldberg RJ, Muller JE. Triggering of acute myocardial infarction by heavy physical exertion. Protection against triggering by regular exertion. Determinants of Myocardial Infarction Onset Study Investigators. *N Engl J Med* 1993; 329:1677–83.
5. Willich SN, Lewis M, Lowel H, Arntz HR, Schubert F, Schroder R. Physical exertion as a trigger of acute myocardial infarction. Triggers and Mechanisms of Myocardial Infarction Study Group. *N Engl J Med* 1993;329:1684–90.
6. Sesso HD, Paffenbarger RS, Jr, Lee IM. Physical activity and coronary heart disease in men: The Harvard Alumni Health Study. *Circulation* 2000;102:975–80.
7. Weiss C, Welsch B, Albert M, Friedmann B, Strobel G, Jost J, Nawroth P, et al. Coagulation and thrombomodulin in response to exercise of different type and duration. *Med Sci Sports Exerc* 1998;30:1205–10.
8. Davis RB, Boyd DG, McKinney ME, Jones CC. Effects of exercise and exercise conditioning on blood platelet function. *Med Sci Sports Exerc* 1990;22:49–53.
9. Kestin AS, Ellis PA, Barnard MR, Errichetti A, Rosner BA, Michelson AD. Effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity. *Circulation* 1993;88: 1502–11.
10. Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson KJ, et al. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost* 1998;79:885–96.
11. Linden MD, Frelinger AL, 3rd, Barnard MR, Przyklen K, Furman MI, Michelson AD. Application of flow cytometry to platelet disorders. *Semin Thromb Hemost* 2004;30: 501–11.
12. Schmidt V, Hilberg T, Franke G, Glaser D, Gabriel HH. Paraformaldehyde fixation induces a systematic activation of platelets. *Platelets* 2003;14:287–94.
13. Cahill MR, Macey MG, Newland AC. Fixation with formaldehyde induces expression of activation dependent platelet membrane glycoproteins, P selectin (CD62) and GP53 (CD63). *Br J Haematol* 1993;84:527–9.
14. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996;87:4925–36.
15. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL, 3rd, Furman MI. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods* 2000;21:259–70.
16. Mockel M, Ulrich NV, Heller G, Jr., Rocker L, Hansen R, Riess H, et al. Platelet activation through triathlon competition in ultra-endurance trained athletes: impact of thrombin and plasmin generation and catecholamine release. *Int J Sports Med* 2001;22:337–43.
17. Giesberts AN, van Willigen G, Lapetina EG, Akkerman JW. Regulation of platelet glycoprotein IIb/IIIa (integrin alpha IIb beta 3) function via the thrombin receptor. *Biochem J* 1995;309:613–20.
18. Michelson AD, Ellis PA, Barnard MR, Matic GB, Viles AF, Kestin AS. Downregulation of the platelet surface glycoprotein Ib-IX complex in whole blood stimulated by thrombin, adenosine diphosphate, or an in vivo wound. *Blood* 1991;77:770–9.
19. Holmsen H. Significance of testing platelet functions in vitro. *Eur J Clin Invest* 1994;24(Suppl 1):3–8.
20. Hou M, Stockelberg D, Kutti J, Wadenvik H. Glycoprotein IIb/IIIa autoantigenic repertoire in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1995;91:971–5.
21. Kokschi M, Rothe G, Kiefel V, Schmitz G. Fluorescence resonance energy transfer as a new method for the epitope-specific characterization of anti-platelet antibodies. *J Immunol Methods* 1995;187:53–67.
22. Chong BH, Du XP, Berndt MC, Horn S, Chesterman CN. Characterization of the binding domains on platelet glycoproteins Ib-IX and IIb/IIIa complexes for the quinine/quinidine-dependent antibodies. *Blood* 1991;77:2190–9.
23. Ruan CG, Du XP, Xi XD, Castaldi PA, Berndt MC. A murine antiglycoprotein Ib complex monoclonal antibody, SZ 2, inhibits platelet aggregation induced by both ristocetin and collagen. *Blood* 1987;69:570–7.
24. de Bruijne-Admiraal LG, Modderman PW, Von dem Borne AE, Sonnenberg A. P-selectin mediates Ca(2+)-dependent adhesion of activated platelets to many different types of leukocytes: detection by flow cytometry. *Blood* 1992; 80:134–42.
25. Sedlmayr P, Grosshaupt B, Muntean W. Flow cytometric detection of intracellular platelet antigens. *Cytometry* 1996;23:284–9.
26. Ruf A, Patscheke H. Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression. *Semin Thromb Hemost* 1995;21:146–51.
27. Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, et al. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11877–82.
28. Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem* 1985;260:11107–14.
29. Bennett JS, Vilaire G. Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *J Clin Invest* 1979;64: 1393–401.
30. Bennett JS, Hoxie JA, Leitman SF, Vilaire G, Cines DB. Inhibition of fibrinogen binding to stimulated human platelets by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2417–21.
31. Metzelaar MJ, Wijngaard PL, Peters PJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK, Clevers HC. CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J Biol Chem* 1991;266:3239–45.
32. Gerrard JM, Lint D, Sims PJ, Wiedmer T, Fugate RD, McMillan E, et al. Identification of a platelet dense granule membrane protein that is deficient in a patient with the Hermansky-Pudlak syndrome. *Blood* 1991;77:101–12.
33. Shalev A, Michaud G, Israels SJ, McNicol A, Singhroy S, McMillan EM, et al. Quantification of a novel dense granule protein (granulophysin) in platelets of patients with dense granule storage pool deficiency. *Blood* 1992;80:1231–7.

34. de Haas M, Kerst JM, van der Schoot CE, Calafat J, Hack CE, Nuijens JH, et al. Granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: analysis of the immediate activating effects on circulating neutrophils. *Blood* 1994;84:3885–94.
35. Israels SJ, McMillan-Ward EM. CD63 modulates spreading and tyrosine phosphorylation of platelets on immobilized fibrinogen. *Thromb Haemost* 2005;93:311–8.
36. Hilberg T, Schmidt V, Losche W, Gabriel HH. Platelet activity and sensitivity to agonists after exhaustive treadmill exercise. *J Sports Sci & Med* 2003;2:15–22.
37. Mockel M, Ulrich NV, Rocker L, Ruf A, Klefisch F, Patzscheke H, et al. Exhaustive cycle exercise induces P-selectin expression, coagulation, and fibrinolysis activation in ultraendurance athletes. *Thromb Res* 1999;94:263–9.
38. Hilberg T, Schmidt V, Glaser D, Schammne D, Losche W, Gabriel HH. Platelet activity, sensitivity to agonist, and platelet-leukocyte conjugate formation after long-term exercise. *Platelets* 2002;13:273–7.
39. Hilberg T, Glaser D, Schmidt V, Losche W, Franke G, Schneider K, et al. Short-term exercise and platelet activity, sensitivity to agonist, and platelet-leukocyte conjugate formation. *Platelets* 2003;14:67–74.
40. Hilberg T, Eichler E, Glaser D, Schmidt V, Gabriel HH. Platelet activity, reactivity and platelet-leukocyte conjugate formation before and after exhaustive or moderate exercise in patients with IDDM. *Platelets* 2004;15:101–8.
41. Evangelista V, Manarini S, Rotondo S, Martelli N, Polischuk R, McGregor JL, et al. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the beta 2 integrin CD11b/CD18. *Blood* 1996;88:4183–94.
42. Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, et al. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation* 1997;95:2387–94.
43. Bonomini M, Stuard S, Carreno MP, Settefrati N, Santarelli P, Haefner-Cavaillon N, et al. Neutrophil reactive oxygen species production during hemodialysis: role of activated platelet adhesion to neutrophils through P-selectin. *Nephron* 1997;75:402–11.
44. Yeo EL, Sheppard JA, Feuerstein IA. Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel wall model). *Blood* 1994;83:2498–507.
45. Osterud B. Cellular interactions in tissue factor expression by blood monocytes. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995;6:S20–5.
46. Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan K. Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur J Clin Invest* 1995;25:843–51.
47. Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, et al. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:352–8.
48. Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, Hughes BJ, Smith CW. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol* 1996;28:345–53.
49. Gawaz M, Bogner C. Changes in platelet membrane glycoproteins and platelet-leukocyte interaction during hemodialysis. *Clin Invest* 1994;72:424–9.
50. Hagberg IA, Lyberg T. Evaluation of circulating platelet-leukocyte conjugates: a sensitive flow cytometric assay well suited for clinical studies. *Platelets* 2000;11:151–60.
51. Li N, Hu H, Lindqvist M, Wikstrom-Jonsson E, Goodall AH, Hjemdahl P. Platelet-leukocyte cross talk in whole blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2702–8.
52. Todd RF, 3rd, Nadler LM, Schlossman SF. Antigens on human monocytes identified by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1981;126:1435–42.
53. Todd RF, 3rd, Van Agthoven A, Schlossman SF, Terhorst C. Structural analysis of differentiation antigens Mo1 and Mo2 on human monocytes. *Hybridoma* 1982;1:329–37.
54. Haziot A, Tsuberi BZ, Goyert SM. Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor-alpha in response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 1993;150:5556–65.
55. Furman MI, Barnard MR, Krueger LA, Fox ML, Shilale EA, Lessard DM, et al. Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:1002–6.
56. Hilberg T, Glaser D, Koksche M, Schmidt V, Sossdorf M, Gabriel HH. Differentiation of platelet-leukocyte conjugate formation by short term exercise. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004;31:217–26.
57. Perneby C, Wallen NH, Hu H, Li N, Hjemdahl P. Prothrombotic responses to exercise are little influenced by clopidogrel treatment. *Thromb Res* 2004;114:235–43.
58. Wang JS, Liao CH. Moderate-intensity exercise suppresses platelet activation and polymorphonuclear leukocyte interaction with surface-adherent platelets under shear flow in men. *Thromb Haemost* 2004;91:587–94.
59. Wang JS. Strenuous, acute exercise suppresses polymorphonuclear leukocyte respiratory burst under adherence to surface-adherent platelets in men. *Thromb Haemost* 2004;92:1076–85.