

Zur Durchflusszytometrie von Thrombozyten

Neue Wege zur Untersuchung von Thrombozyten und gerinnungshemmenden Medikamenten

Foto: Ute Voigt/direkt



Seit 1993 gibt es in Gießen eine Arbeitsgruppe, die sich mit der Durchflusszytometrie von Thrombozyten beschäftigt. Dr. Axel Matzdorff vom Gerinnungslabor der Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie (Leiter: Prof. Dr. Hans Pralle) untersucht in enger Kooperation mit der Kardiologischen Abteilung (Leiter: Prof. Dr. Harald Tillmanns) am Zentrum für Innere Medizin Veränderungen von Thrombozyten bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Ein Schwerpunkt der Arbeit des letzten Jahres war die Prüfung von neuen gerinnungshemmenden Medikamenten, den GP IIb/IIIa-Rezeptoren-Blockern. Dabei wurde ein sog. „Gießen-Test“ entwickelt, um die Aktivität von GP IIb/IIIa-Rezeptoren-Blockern einfach und schnell bestimmen zu können.

Von Axel Matzdorff

Im Blut des Menschen findet man Rote Blutkörperchen, die sog. Erythrozyten – sie sind verantwortlich für den Sauerstofftransport –, die Weißen Blutkörperchen oder Leukozyten, die Träger der Infektabwehr, und die Blutplättchen, die Thrombozyten. Die Thrombozyten sind die kleinsten Partikel, zehnmal kleiner als ein Rotes Blutkörperchen, und spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von gefäßverschließenden Gerinnseln in den Herz-Kranzgefäßen (Herzinfarkt), den Gefäßen des Gehirns (Schlaganfall) und den Arterien der Beine (Arterielle Verschlusskrankheit, „Raucherbein“). Entsprechend viele Menschen müssen heute in der Bundesrepublik Medikamente einnehmen, die Thrombozyten in ih-

rer Funktion hemmen. Das bekannteste Medikament ist sicher die Acetylsalicylsäure (Aspirin).

Trotz dieser wichtigen Rolle gibt es für Thrombozyten erstaunlich wenige Untersuchungsmethoden, wobei die Thrombozytenzählung noch die häufigste ist. Den Arzt interessiert jedoch oft nicht nur die Zahl der Thrombozyten, sondern ob diese vermehrt aktiv sind oder inaktiv, ob sie leichter aggregieren und zum Gefäßverschluss beitragen oder nicht. Es stellte sich die Frage, ob es möglich wäre, aktivierte Thrombozyten z.B. bei Patienten mit Herzkrankheit zu erkennen und dann gezielt diese Zellen mit Medikamenten zu hemmen.

Die Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, die in den 80er Jahren zur

Untersuchung von Leukozyten und Lymphozyten weite Verbreitung gefunden hat. Dabei werden Zellen in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl gelenkt. Je nach Größe und innerer Struktur der Zellen kommt es zu einer charakteristischen Seitwärts- und Vorwärtslichtstreuung (Abb. 2). Fluoreszenzfarbstoffe liefern ein zusätzliches Farbsignal, wodurch weitere Zellpopulationen voneinander unterschieden werden können (Abb. 3). Die Durchflusszytometrie hat den Vorteil, daß eine große Zahl von Partikeln (bis zu 1000 Zellen pro Sekunde) in einem kurzen Zeitintervall untersucht werden kann. Zunächst wurden diese teuren Geräte bei der Untersuchung von Leukämien und Lymphdrüsenenerkrankungen eingesetzt. Weite Verbreitung fanden sie bei der Diagnostik der HIV-Erkrankung zur Erkennung der

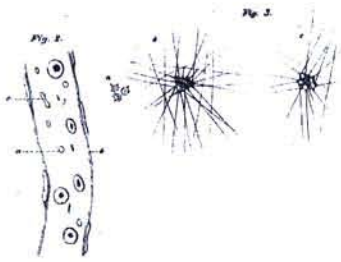


Abb. 1: Aus der Arbeit von Julius Bizzozero (Turin) „Über einen neuen Formbestandtheil des Blutes“, abgebildet in der Zeitschrift: Archiv der Pathologischen Anatomie und Physiologie von 1881. Fig. 2: Kleine Arterie mit Blutplättchen von der Fläche gesehen (a), im Profil (b), Rotes Blutkörperchen (c). Fig. 3: Veränderung der Blutplättchen in Hundeblood gleich nach dem Austritt aus dem Gefäß (a), nach acht Minuten (b) und nach einer halben Stunde (c).

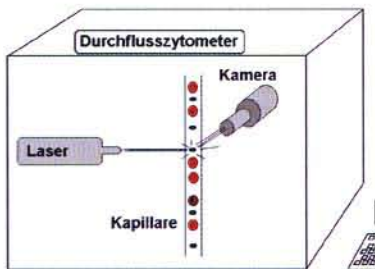


Abb. 2: Ein Durchflusszytometer ist ein Gerät, das eine Zellsuspension (d.h. die Zellen dürfen nicht fest in einem Block sitzen, sondern müssen in einer Flüssigkeit schwimmen, z.B. im Blut) durch eine haardünne Kapillare schiebt. An einem bestimmten Punkt dieser Kapillare kreuzt der Zellstrom einen Laserlichtstrahl; immer wenn eine Zelle in den Lichtstrahl tritt, kommt es zu einer Reflexion (wie wenn Sonnenlicht durchs Fenster tritt und einzelne Staubpartikel in der Luft aufleuchten). Das reflektierte Licht wird von einer Kamera aufgefangen. Jede Zelle ergibt so einen Lichtimpuls, der von einem Computer ausgewertet werden kann. So können leicht alle Zellen eines Blutropfens – das sind viele Tausend Zellen – in kurzer Zeit durch die Kapillare geschickt und analysiert werden. Die Abbildung zeigt Rote und Weiße Blutkörperchen und ein Blutplättchen, wie es gerade vom Laserstrahl getroffen wird.

sog. Helfer- und Suppressor-Lymphozyten.

In den letzten Jahren werden auch Thrombozyten zunehmend durchflusszytometrisch untersucht. Man kann mit Antikörpern gegen sog. „Aktivierungs-Eiweiße“ erkennen, ob ein Thrombozyt auf seiner Oberfläche diese Aktivierungsmarker trägt, d.h. ob er aktiviert ist oder nicht (Abb. 3). Das Durchflusszytometer kann außerdem viele Thrombozyten in kürzester Zeit analysieren, so dass man einen guten Eindruck von dem Aktivierungszustand der gesamten Thrombozytenmenge in einem Blutstropfen erhält. Das Durchflusszytometer erkennt aktivierte Thrombozyten (Abb. 4), Thrombozytenaggregate, kleinste Thrombozytenfragmente, Thrombozyten, die an Leukozyten haften, und vieles mehr.

Der „Gießen-Test“

Wenn Thrombozyten an einer Gefäßwandläsion z.B. in einem Herzkranzgefäß vorbeiströmen, dann müssen sie im Bruchteil einer Se-

kunde reagieren und sich anheften bzw. mit anderen Thrombozyten verbinden können. Die Haftung der Thrombozyten aneinander erfolgt über Eiweiße der Thrombozyten-Membran, den sog. GP IIb/IIIa-Rezeptoren (Abb. 5). Bis zu 80.000 dieser Eiweißmoleküle findet man auf der Oberfläche eines Thrombozyten. Andere Rezeptoren spielen zahlenmäßig eine geringere Rolle. Auf dieser Beobachtung basiert die logische Entwicklung von Medikamenten, die GP IIb/IIIa-Rezeptoren blockieren und verhindern, dass sich Thrombozyten zu einem das Gefäß verschließenden Gerinnsel verbinden. Die Durchflusszytometrie bietet sich als optimale Methode an, wenn Thrombozytenoberflächen-Rezeptoren und Medikamente, die diese Rezeptoren beeinflussen, untersucht werden sollen.

Bisher wurden GP IIb/IIIa-Inhibitoren fast ausschließlich im Rahmen akuter Gefäßverschlüsse eingesetzt. Die Effizienz dieser Medikamente führte jedoch zu der Überlegung, Patienten auch längerfristig zu behandeln, möglichst mit GP IIb/IIIa-

Historisches

Julius Bizzozero aus Turin erkannte als Erster, daß Blutplättchen bei der Gerinnung des Blutes und bei der Entstehung von Thrombosen eine wichtige Rolle spielen. In seiner Arbeit „Über einen neuen Formbestandtheil des Blutes“ aus dem Jahre 1881 beschreibt er, wie sich Blutplättchen zu weißen Thromben aneinanderlagern. Seine Abbildungen zeigen mit ganz erstaunlicher Genauigkeit, wie Thrombozyten zusammen mit Erythrozyten in den Gefäßen zirkulieren, wie sie sich mit Fortsätzen an einer Oberfläche anheften und zu einem Aggregat verbinden können (siehe Abb. 1). Bizzozero arbeitete mit einem einfachen Lichtmikroskop. Das Mikroskop blieb lange Zeit die einzige Möglichkeit, Thrombozyten genauer zu untersuchen. Man beschränkte sich darauf, die Zahl der Thrombozyten in einem Blutstropfen zu zählen: normalerweise 150.000 bis 450.000 in einem Mikroliter (= 1 Millionstel Liter). In den 70er Jahren begann die Automatisierung der Blutanalyse mit entsprechenden Großgeräten. Dies verringerte jedoch nur den Arbeitsaufwand: Der Automat arbeitete schneller als die technische Assistentin mit ihrem Mikroskop. Das Ergebnis blieb gleich: Es wurde nur die Zahl der Thrombozyten bestimmt (*quantitative Analyse*), allerdings schneller, genauer und preiswerter. Eine *qualitative* Analyse fand nicht statt. Seit den 80er Jahren werden Geräte eingesetzt, die Funktionszustände und besonders die Aktivierung von Zellen gut erkennen können: die Durchflusszytometer.



Axel Matzdorf, Jahrgang 1961, studierte von 1980 bis 1987 an der Justus-Liebig-Universität Gießen Medizin. Auslandspraktika absolvierte er in Peru, Chicago und Baltimore, USA. 1990 wurde er mit einer Arbeit über die „Wirkung des Proteinaseinhibitors Gabexat mesilate auf das Sanarelli-Schwartzman-Phänomen“ bei Prof. Dr. Gert Müller-Berghaus (Max-Planck-Forschungsgruppe für Blutgerinnung und Thrombose in Gießen) promoviert. Seine Facharztausbildung im Bereich der Inneren Medizin absolvierte er in den Städtischen Kliniken Darmstadt, an der Northwestern University in Chicago und am Zentrum für Innere Medizin der Universität Gießen. 1993: Certification American Board of Internal Medicine, 1996: Facharztanerkennung für Innere Medizin, 1998: Anerkennung für Hämatologie. Seit 1999 ist er als Oberarzt an der Abteilung Hämatologie und Internistische Onkologie (Leiter: Prof. Dr. Hans Pralle) am Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen tätig.

Inhibitoren, die als Tablette und ambulant eingenommen werden können. Eine Grundvoraussetzung dafür ist die Entwicklung eines Testsystems, das eine einfache und preiswerte Therapieeinstellung ermöglicht. Die Gießener Arbeitsgruppe hat ein System entwickelt, mit der sich die Konzentration von Thrombozyten, Aggregaten und Mikropartikeln im Blut exakt quantifizieren lässt. Daraus wurde ein Testsystem entwickelt, die Aktivität von GP IIb/IIIa-Rezeptoren ein-

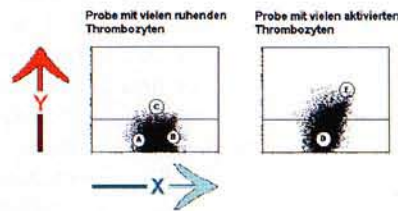
fach und schnell zu bestimmen. Dieser sog. "Gießen-Test" wird gerade von der Memoglypin-Arbeitsgruppe (Methods to Monitor Glycoprotein IIb/IIIa-inhibitors) der Deutschen Gesellschaft für Angiologie im Vergleich zu anderen Testverfahren geprüft.

Funktionsstörungen von Thrombozyten

Die Thrombozytendurchflusszytometrie leistet jedoch auch wertvolle Beiträge bei der Abklärung angebo-

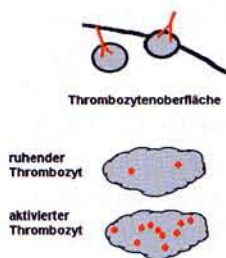
rener und erworbener Thrombozytenfunktionsstörungen. Es gibt seltene familiäre Syndrome, bei denen der eine oder andere Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche fehlt oder nicht funktionstüchtig ist. Diese Störungen können durchflusszytometrisch erkannt werden. Die Thrombozytendurchflusszytometrie wird deshalb nicht nur im Rahmen der Forschung, sondern auch für die Betreuung von Patienten im Rahmen der Gerinnungsambulanz der Klinik angeboten. Durch dieses integri-

Auf der Y-Achse wird die Stärke der Reflexion der Farbe Rot angezeigt. Ein aktiver Thrombozyt bindet mehr rote Antikörper und sitzt somit höher als ein nicht-aktiver Thrombozyt, der nur wenige oder keine roten Antikörper bindet.



Auf der X-Achse wird die Stärke der gesamten Lichtstreuung angezeigt. Ein kleiner Thrombozyt streut weniger Licht und sitzt tiefer als ein großer Thrombozyt, der viel Licht streut.

Abb. 4: Am Beispiel einer Untersuchung, ob in einer Probe aktivierte Thrombozyten vorkommen, soll ein typischer durchflusszytometrischer Befund dargestellt werden. Bei der Untersuchung produziert der Computer Bilder, die man „Scatter- oder Dot-Plots“ (Streu-Punkt-Grafiken) nennt. In diesem Beispiel sieht man zwei Proben. In der nicht-aktivierten Probe (links) gibt es kleine, nicht-aktivierte Thrombozyten (A) und etwas größere nicht-aktivierte Thrombozyten (B). Immer gibt es einige wenige aktivierte Thrombozyten (C) allein durch die Reizung bei der Blutentnahme. In der aktivierten Probe (rechts) findet man immer noch eine größere Menge nicht-aktivierter Thrombozyten (D), aber auch viele aktivierte (E). Der Computer zählt, wie viele aktiviert sind, hier etwa 40%. So kann man aus der Blutprobe eines Patienten die Zahl der aktivierten Thrombozyten bestimmen.



Rote Antikörper (es gibt auch andere Farben) erkennen Eiweiße, z. B. Eiweiße, die nur bei Aktivierung erscheinen, auf der Thrombozytenoberfläche.

Ruhende Thrombozyten binden nur wenige der Antikörper und haben so einen geringen Rot-Reflexions-Impuls. Aktivierte Thrombozyten binden viele Antikörper, und die Rot-Reflexion ist stark.

Abb. 3: Man kann Zellen mit farbigen Antikörpern markieren (die Farben sind hier zur Vereinfachung als Rot und Grün bezeichnet). Antikörper binden nur an ganz bestimmte Eiweiße. Wenn man einen roten Antikörper gegen ein Aktivierungs-Eiweiß nimmt, d.h. ein Eiweiß, daß nur auf aktivierten Thrombozyten erscheint, dann bindet der Antikörper nur an aktivierte Thrombozyten und nur diese aktivierten Thrombozyten leuchten im Laser-Strahl rot auf. So kann das Durchflusszytometer aus der Farbe der Reflexion auf den Aktivierungsgrad des Thrombozyten schließen.

ve Angebot wird die Qualität der Patientenversorgung deutlich erweitert.

Es gibt Hinweise, dass Thrombozyten mit weißen Blutzellen bei der Entstehung von Gefäßverschlüssen zusammenwirken. Das Durchflusszytometer ist in der Lage, Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate zu erkennen, und mit der Gießener Quantifizierungs-Technik ist auch eine exakte Bestimmung der Konzentration dieser Aggregate im Blut des Patienten möglich. Zur Zeit beginnt eine Untersuchung in Zusammenarbeit mit der Neurologischen Klinik, die sich mit dieser Fragestellung bei Schlaganfall-Patienten beschäftigt.

Wenn Blutplättchen aktiviert werden und ihre Oberfläche verändern, dann verbinden sie sich mit anderen Zellen oder heften sich an Gefäßwände an. So verschwinden sie aus dem zirkulierenden Blut. Der Nachweis von Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche von zirkulierenden Thrombozyten hat deshalb bei vielen nationalen und internationalen Arbeitsgruppen keine deutlich

positiven Ergebnisse zeigen können. Der Ansatz, Veränderungen *im* Thrombozyten nachzuweisen, noch bevor sich die Oberfläche verändert und bevor der Thrombozyt sich anheftet, ist deshalb sehr vielversprechend. Die Gießener Arbeitsgruppe entwickelt derzeit ein entsprechendes Testsystem in Zusammenarbeit mit Forschern der Universität Würzburg.

Im Juni 1999 fand in Gießen ein Symposium zur Thrombozyten-Durchflusszytometrie statt. Über 140

Zuhörer aus allen Teilen Deutschlands nahmen daran teil. Sicher war dies ein wichtiges Ereignis im wissenschaftlichen Curriculum der beteiligten Einrichtungen des Gießener Klinikums: der Abteilung Hämatologie am Zentrum für Innere Medizin und des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie (Leiter: Prof. Dr. Dr. Norbert Katz). Gleichzeitig zeigt das breite Echo, dass in diesem Bereich zahlreiche neue Entwicklungen für die nahe Zukunft erwartet werden. •

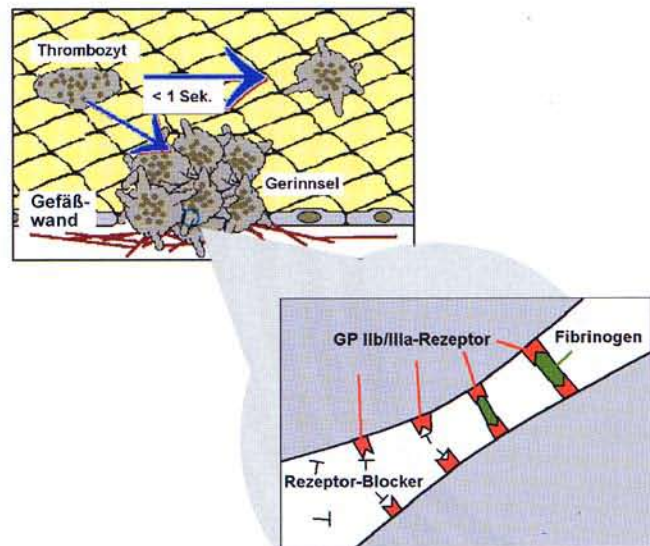


Abb. 5: Wenn sich Thrombozyten an einen Gefäßwanddefekt anheften, dann dauert diese Reaktion nur den Bruchteil einer Sekunde. Die Verbindung der Thrombozyten untereinander wird durch GP IIb/IIIa-Rezeptoren und Fibrinogen vermittelt. GP IIb/IIIa-Rezeptoren-Blocker verhindern diese Verbindung, die Thrombozyten können sich nicht mehr aneinanderheften, und es entsteht kein gefäßverschließender Thrombus.

JUSTUS-LIEBIG-



UNIVERSITÄT
GIESSEN

Dr. Axel Matzdorff

Zentrum für Innere Medizin
Abt. Hämatologie und Internistische Onkologie
Klinikstr. 36,
35392 Giessen
Tel.: 0641/99-42112 und 99-42655
Fax: 0641/99-42729
e-mail: axel.matzdorff@innere.med.uni-giessen.de