

Dopplersonographische Detektion zirkulierender Mikroembolien bei Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus – Liebig – Universität Gießen

vorgelegt von Christina Anna Weber
aus Siegen

Gießen 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie
Abteilung für Neurologie
Direktor: Prof. Dr. med. M. Kaps
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. E. Stolz

Gutachter: Prof. Dr. med. D. Strödter

Tag der Disputation: 19. 06. 2008

Meinen Eltern

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	7
1.1	Klinische Aspekte der dopplersonographischen Mikroemboliedetek- tion.....	7
1.2	Technische Aspekte der dopplersonographischen Mikroemboliedetek- tion.....	9
1.2.1	Gepulste transkranielle Dopplersonographie und Dopplerspektralanalyse.....	9
1.2.2	Prinzip der dopplersonographischen Mikroemboliedetektion.....	12
1.3	Hämatologische Erkrankungen im Zusammenhang mit der Entstehung von Thrombosen	16
1.3.1	Polycythaemia rubra vera.....	16
1.3.2	Essentielle Thrombozythämie.....	17
1.3.3	Chronisch myeloische Leukämie	17
1.3.4	Unklassifizierte myeloproliferative Syndrome.....	18
1.4	Durchflusszytometrische Untersuchung.....	20
2.	Patienten, Material und Methoden.....	22
2.1	Patientenkollektiv.....	22
2.2	Dopplersonographische Mikroemboliedetektion.....	24
2.3	Laboruntersuchungen.....	25
2.3.1	Blutbildveränderungen.....	25
2.3.2	Durchflusszytometrie.....	26
2.4	Statistische Auswertung.....	30
3.	Ergebnisse.....	31
3.1	Übereinstimmung geblindeter Untersucher hinsichtlich des Vorhan- denseins von zirkulierenden Mikroembolien	31
3.2	Zirkulierende Mikroembolien und klinische Variablen	31

3.3	Zirkulierende Mikroembolien und Blutbildveränderungen	32
3.4	Zirkulierende Mikroembolien und thrombozytäre Durchflusszytometrie.....	33
3.5	Zirkulierende Mikroembolien und klinischer Verlauf	36
3.6	Dopplersonographische Verlaufsuntersuchungen	37
4.	Diskussion.....	39
4.1	Methodische Aspekte	40
4.1.1	Studiendesign.....	40
4.1.2	Dopplersonographische Mikroemboliedetektion.....	41
4.2	Zirkulierende Mikroembolien und klinische Parameter	42
4.2.1	Thromboembolische Komplikationen	42
4.2.2	Medikation	43
4.3	Zirkulierende Mikroembolien und Ergebnisse der Durchflusszytometrie	43
5.	Zusammenfassung/Summary.....	46
5.1	Zusammenfassung.....	46
5.2	Summary.....	47
6.	Veröffentlichungen	48
7.	Literaturverzeichnis	49
8.	Abkürzungsverzeichnis	59
9.	Danksagung	62

1. Einleitung

1.1 Klinische Aspekte der dopplersonographischen Mikroemboliedetektion

Die transkranielle dopplersonographische Mikroemboliedetektion wurde in der Vergangenheit bereits unter verschiedensten klinischen Bedingungen, die mit einem erhöhten Risiko einer Hirnembolie einhergehen, eingesetzt (Tabelle 1.1). Ausgangspunkte für den klinischen Einsatz der Methode waren einerseits die Beobachtung, dass im Tierversuch arteriell eingebrachte Mikrogerinnsel beim Passieren des Ultraschallstrahls zu einem kurzzeitigen Anstieg der rückgestreuten Signalintensität (high intensity transient signals; HITS) führen [19; 52; 85], andererseits dass HITS aber in Abwesenheit emboligenen Materials und bei gesunden Probanden nicht ableitbar sind. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über einige der Erkrankungen und Eingriffe bei denen im Rahmen von klinischen Studien mittels dopplersonographischer Mikroemboliedetektion HITS nachgewiesen werden konnten.

Stenosen der A. carotis interna symptomatische Karotisstenosen asymptomatische Karotisstenosen Therapiekontrolle nach Intervention (medikamentös oder operativ) vor, während und nach Karotisendarteriektomien und Ballondilatationen	Vermutete kardiale Emboliequellen Vorhofflimmern Mitralklappenprolaps während kardiochirurgischer Eingriffe nach Implantation einer Kunst- oder Bioklappe nach Kunstherzimplantation Endokarditis nach Ross-Operation dilatative Kardiomyopathie
Sonstiges Stenosen intrakranieller Arterien während zerebraler Angiographien Systemischer Lupus erythematoses Sneddon-Syndrom	

Tabelle 1.1 : Erkrankungen und Eingriffe mit nachweisbaren HITS bei der dopplersonographischen Mikroemboliedetektion [3; 17; 31; 45; 53; 61; 63; 71; 78; 80; 83; 84; 88].

Auf Grund dieser Untersuchungen lag es nahe anzunehmen, dass der Nachweis von HITS einen Surrogatparameter für klinisch relevante Hirnembolien darstellt. Im Lauf der letzten Jahre hat sich aber herausgestellt, dass diese Annahme simplifiziert ist. Nach derzeitiger Studienlage besteht sichere Evidenz, dass Zahl und Zeitpunkt des Auftretens der HITS bei symptomatischen Karotis- und intrakraniellen Gefäßstenosen mit dem Reinsultrisiko korrelieren, hier also tatsächlich einen Surrogatparameter darstellen [21; 28; 69; 71]. Ein ähnliches Bild zeichnet sich für asymptomatische Karotisstenosen ab, wo berechtigte Hoffnung besteht, dass die Methode als Screeninginstrument für Therapieentscheidungen (z.B. Operation oder Stent-implantation versus medikamentöse Therapie) in Zukunft eingesetzt werden kann [53; 78].

Andererseits können HITS in großer Zahl (z.T. so zahlreich, dass eine Auftrennung in einzelne Signale nicht mehr möglich ist) während Eingriffen an der Karotis oder am Herzen nachgewiesen werden, wo sie allenfalls während einzelner Phasen der Operation z.B. der Kanulierung der Aorta überhaupt mit dem Hirninfarktrisiko korrelieren. Ebenso können bei Patienten mit Kunstklappen des Herzens über Jahre hinweg HITS abgeleitet werden, ohne dass hier ein sicherer Zusammenhang mit zerebrovaskulären Ereignissen besteht [18; 31]. Bei diesen Patienten konnte auch gezeigt werden, dass die Zahl der HITS vom Atmosphärendruck und besonders vom Sauerstoffpartialdruck abhängt [31; 43]. Dies legt den Schluss nahe, dass in obigen Situationen die abgeleiteten HITS überwiegend von Gasbläschen oder zumindest einem Gemisch von festen und gasförmigen Bestandteilen herrühren und im Falle von Kunstklappen durch Kavitationen an den Klappensegeln entstehen. Eine Differenzierung in gasförmige und feste Mikroembolien wird derzeit basierend auf der unterschiedlichen Streuung von Ultraschall bei Verwendung unterschiedlicher Sendefrequenzen versucht, gelingt aber bisher noch nicht sicher [74].

Im Fall von Karotisstenosen und Erkrankungen mit Gefäßbeteiligung (z.B. Vaskulitiden), Gerinnungsaktivierung oder veränderter Blutzusammensetzung ist diese Einschränkung nicht gravierend, da hier von festen Mikroembolien auszugehen ist, wobei der reine Nachweis von HITS per se nicht auf das Hirninfarktrisiko schließen lässt, sondern u.U. auch von der Zusammensetzung des emboligenen Materials abhängt [17].

Bei Erkrankungen die mit Veränderungen der Blutzusammensetzung und/oder – gerinnung einhergehen und bei denen ein erhöhtes Risiko für thromboembolische Ereignisse bekannt ist, so z.B. der Lupus erythematodes oder die myeloproliferativen Syndrome (MPS), sind im Rahmen von einzelnen Fallberichten HITS detektiert worden [5; 45], hier jedoch – anders als bei den Karotisstenosen – bislang ohne signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von HITS und dem Risiko des Auftretens eines klinischen Ereignisses.

Die genaue zelluläre Zusammensetzung der im Rahmen von zerebrovaskulären Erkrankungen auftretenden HITS ist noch ungeklärt.

Eine der Hypothesen dieser Studie war, dass die MPS hier als Modell dienen können, um Rückschlüsse auf die zellulären Komponenten der HITS-generierenden Mikroembolien ziehen zu können. Eventuell ist sogar ein spezifisches Verhältnis von Thrombozyten, Leukozyten oder auch Erythrozyten notwendig um HITS-auslösende Mikroembolien zu formen. In jedem Fall ist aber anzunehmen, dass auch bei MPS auftretende HITS von festen Partikeln generiert werden, da bei diesen Erkrankungen weder Luft in das Gefäßsystem eingebracht wird, noch durch Kavitationseffekte entstehen kann. Deshalb bevorzugen wir im Rahmen dieser Studie nicht von HITS, sondern Mikroemboliesignalen (microembolic signals, MES) zu sprechen.

1.2 Technische Aspekte der dopplersonographischen Mikroemboliedetektion

1.2.1 Gepulste transkranielle Dopplersonographie und Dopplerspektralanalyse

Mit der transkraniellen Dopplersonographie (TCD) können die Flussgeschwindigkeiten der großen Hirnbasisarterien in Form von Dopplerspektren dargestellt werden. Dazu nutzt man das temporale Schallfenster.

Die Ultraschallsonde wird auf die Temporalschuppe kurz vor dem Ohr aufgesetzt und die einzelnen Arterien werden dann an Hand der Untersuchungstiefe, der Sondenposition, der Strömungsrichtung und der erfahrungsgemäß zu erwartenden Strömungsgeschwindigkeit identifiziert und systematisch untersucht. Die TCD erlaubt die Ableitung der A. cerebri media (ACM) (M1 und M2 Segmente), der A. cerebri anterior (A1 Segment), der A. carotis interna (in der Regel C1 Segment, bei günstigen Schallbedingungen auch C2 und C3 Segment) sowie der A. cerebri posterior (P1 und

P2 Segment). Zur Untersuchung der intrakraniellen Abschnitte der A. vertebralis und der A. basilaris steht ein weiteres nuchales Schallfenster zur Verfügung.

Bei der gepulsten Dopplersonographie, die bei der TCD Verwendung findet, fungieren die Sondenkristalle gleichzeitig als Sender und Empfänger. Zunächst wird ein kurzes Paket aus wenigen Zyklen der Trägerfrequenz – üblicherweise bei der TCD von 2 MHz – in das zu untersuchende Gewebe ausgesandt, dann erfolgt eine kurze Wartezeit, um das aus dem Gewebe rückgestreute Ultraschallsignal mit den gleichen Sonderelementen wieder zu empfangen. Da bei Annahme einer relativ konstanten Schallgeschwindigkeit in weichen Geweben die zurückgelegte Distanz von der Laufzeit des Signals abhängt, führt eine Festlegung dieser Wartezeit zur Definition, aus welcher Gewebetiefe rückgestreute Signale empfangen werden können. Wird weiter festgelegt wie lange Ultraschallsignale nach Umschalten in den Empfangsmodus verarbeitet werden, ergibt sich daraus eine relativ genaue Definition aus welchem Gewebeareal rückgestreute Signale herrühren; man spricht in diesem Fall von der Definition des Messvolumens. Dies ist für die TCD besonders wichtig, da die Empfangstiefe wesentlicher Bestandteil der korrekten Zuordnung der Signale zu bestimmten Hirnarterien darstellt.

Wird das ausgesandte Ultraschallsignal an sich nicht bewegenden Gewebestrukturen zurückgestreut, weist das empfangene Signal zwar im Vergleich zum Trägersignal eine verminderte Amplitude bzw. Energie auf, jedoch die gleiche Frequenz. Erfolgt die Streuung an sich bewegenden Blutbestandteilen, d.h. zahlenmäßig am häufigsten an Erythrozyten, stellt man bei Bewegung auf die Sonde zu eine etwas höhere, bei Bewegung von der Sonde weg eine etwas geringere Frequenz der rückgestreuten Echos fest. Nach der von Christian Doppler (1803 – 1853) entwickelten Formel kann dann diese Frequenzverschiebung oder kurz Dopplerfrequenz nicht nur dazu genutzt werden, die relative Strömungsrichtung, sondern auch die Strömungsgeschwindigkeit (v) zu bestimmen, wenn der Beschallungswinkel (α) bekannt ist:

$$v = (\Delta f \cdot c) / (2 \cdot f_0 \cdot \cos \alpha)$$

Δf : Dopplerfrequenzverschiebung

f_0 : Trägerfrequenz

c : Schallgeschwindigkeit

α : Beschallungswinkel

Im Dopplergerät wird dann die Dopplerfrequenzverschiebung vom Trägersignal isoliert und weiter verarbeitet. Die einfachste Analyse ist eine akustische, da die Dopplerfrequenz im kHz-Bereich liegt und hörbar ist.

Die Strömungsgeschwindigkeit der Blutpartikel im Gefäß ist allerdings nicht homogen, sondern im Idealfall parabol verteilt, so dass sich faktisch ein Dopplersignal aus einer Fülle von Dopplerfrequenzen zusammensetzt, die allen gleichzeitig im beschallten Gefäßabschnitt vorhandenen Strömungsgeschwindigkeiten entsprechen. Um ein Dopplersignal nicht nur akustisch sondern auch weitergehend – z.B. optisch - beurteilen zu können, ist eine Spektrumanalyse nötig. Die dabei verwendeten Analytoren arbeiten nach verschiedenen Prinzipien (u.a. Intervallhistogramm, Filterbankverfahren, Time Compression Analysis); das heute gängigste Verfahren ist die Fourier -Transformation (FT).

Die Fourier-Transformation ist ein mathematisches Verfahren, mit dem jede periodische Wellenform in eine Serie von Sinus- oder Cosinuswellen zerlegt werden kann. Der mathematische Ausdruck dieser Theorie ist die Fourier-Serie, die in der ursprünglichen Form eine stetige Funktion, d.h. übertragen auf die TCD unendlich viele Abtastungen voraussetzt. Da der TCD ein gepulstes Dopplerverfahren zugrunde liegt, kann hier nur eine vereinfachte Form der Fourier -Analyse angewandt werden, die als diskrete Fourier-Transformation bezeichnet wird, auch diese ist sehr rechenintensiv.

Revolutionär wirkte die Entwicklung eines schnellen Algorithmus zur diskreten Fourier -Transformation durch Cooley und Tukey (1965), der die Berechnung der diskreten Fourier-Koeffizienten bei einer Zeitreihe mit 1000 Abtastpunkten von 1 Million auf 10.000 Multiplikationen verkürzte. Deshalb wird die Technik auch als schnelle Fourier -Transformation (Fast Fourier Transform, FFT) bezeichnet. Für die Erstellung eines Frequenzspektrums mit der FFT muss berücksichtigt werden, dass hierfür eine Zeit notwendig ist, die mindestens der doppelten Periodendauer der niedrigsten Frequenz entspricht, welche gemessen werden soll, ansonsten tritt ein s.g. Alias-Phänomen auf, d.h. sowohl die Dopplerfrequenz als auch die Strömungsrichtung können nicht mehr korrekt bestimmt werden. Die FFT-Analyse ist mittlerweile standardmäßig in jedem Dopplergerät vorhanden.

Das Frequenzzeitspektrum ist die gängigste Darstellung der FFT-Analyse (Abbildung 1.1), verkürzt auch als „*Spektrum*“ bezeichnet. Es zeigt die zeitliche Verteilung der Frequenzen bzw. Strömungsgeschwindigkeiten ähnlich einer Pulscurve. Die

Information über die Amplitude (Häufigkeit, Dichte) erfolgt qualitativ in Form der Punktdichte, der Helligkeit oder mittels eines Farbkodes. Diese Darstellung in Echtzeit ist in der klinischen Routine unentbehrlich, denn sie erlaubt eine fortlaufende visuelle Kontrolle des akustischen Signals während der Untersuchung.

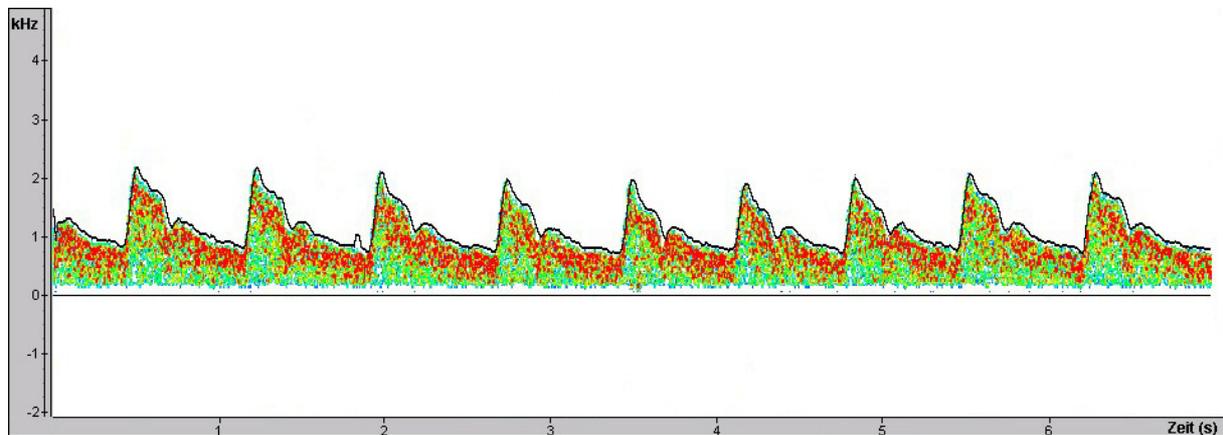


Abbildung 1.1: Normales Dopplerfrequenzzeitspektrum aus der linken A. cerebri media.

1.2.2 Prinzip der dopplersonographischen Mikroemboliedetektion

In Röhren- und Tiermodellen [19; 52] konnte gezeigt werden, dass zirkulierende solide Mikropartikel, aber auch kleine Luftbläschen beim Passieren des Dopplermessvolumens zu einem kurzzeitigen Anstieg der rückgestreuten Ultraschallenergie führen. Sie erzeugen dabei ein sicht- und hörbares kurzes Signal (Zirpen, Klicken, "Blupp") innerhalb des regulären Doppler-Frequenzspektrums, was ihre Erkennung ermöglicht (Abbildung 1.2). Die physikalische Begründung für das Auftreten solcher Signale liegt im Impedanzsprung und der damit erhöhten Streuung/Reflexion des Ultraschalls an der Grenzfläche des zirkulierenden Mikroembolus zum umgebenden Blut. Das häufig verwendete Akronym HITS (High Intensity Transient Signal) verweist auf diesen physikalischen Hintergrund, ist aber nicht korrekt, da auch Artefakte z.B. durch Sondenschütterung, Husten, Sprechen etc. zu einem kurzfristigen Intensitätsanstieg im Dopplerspektrum führen. Deshalb wird in dieser Arbeit durchgängig der korrektere Begriff des Mikroemboliesignals (MES) verwendet.

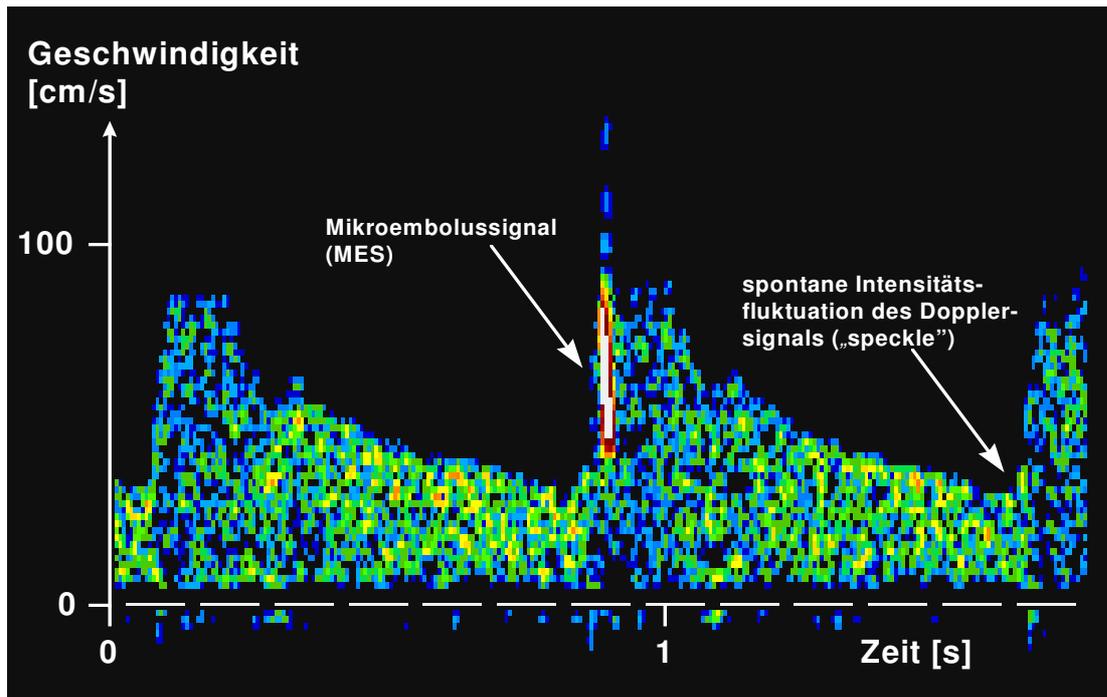


Abbildung 1.2: Beispiel eines transkraniellen Dopplerspektrums mit einem Mikroemboliesignal in der Mitte des Bildes. Auf der x-Achse ist die Zeit in Sekunden, auf der y-Achse die Blutflussgeschwindigkeit in cm/s aufgetragen. Die Intensität des Dopplersignals wird in Farbabstufungen dargestellt. Visuell war dieses MES am transienten Intensitätsanstieg innerhalb des Dopplerspektrums zu erkennen (hellrote Farbe), akustisch hörte man ein Klicken (audiovisuelle Auswertung). Rechts im Bild ein spontaner Intensitätsanstieg („Speckle“) im Dopplerspektrum, der aber aufgrund des nur geringen Intensitätsanstieges (visuell gelbgrüne Farbe, akustisch nicht aus dem Dopplersignal herauszuhören) noch nicht oberhalb der Detektionsschwelle liegt. Dies ist natürlich nicht der einzige „Speckle“ in diesem Spektrumausschnitt. Das ganze Spektrum besteht aus mehr oder weniger intensiven „Speckles“. Der untersuchte Patient hatte eine künstliche, mechanische Herzklappe als Emboliequelle.

Aufgrund experimenteller Befunde wird die Größe klinisch stummer zirkulierender Mikroembolien auf etwa 5 μm (gasförmig) bis zu 100 μm (fest, d.h. atheromatös oder thrombotisch) geschätzt [52; 72]. Wegen der stärkeren Ultraschallstreuung/-reflexion erzeugen größere Mikroembolien intensivere MES als kleinere.

MES sind, laut Definition, von kurzer Dauer (< 300 ms), liegen mindestens 3 dB über dem Frequenzspektrum des normalen Blutflusses im Hintergrund, sind unidirektional

im Flussspektrum lokalisiert und werden begleitet von einem für sie charakteristischen musikalischem Geräusch.

Die Internationale Consensus Gruppe über Mikroemboliedetektion entwickelte 1997 in Frankfurt 14 Kriterien die bei der Anwendung von transkraniellem Doppler zur Emboliedetektion zu berücksichtigen und zu dokumentieren sind um eine höhere Sensitivität, Spezifität und Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Untersucher zu erreichen [70].

Dabei handelt es sich um folgende, die Detektion beeinflussende Parameter:

- 1) Ultraschallausrüstung (Sonde, verwendete Software),
- 2) Art und Größe des Transducers (2MHz-Sonde, 1,7cm Durchmesser),
- 3) untersuchte Arterie (A. cerebri media) ,
- 4) Schalltiefe (48 – 58 mm),
- 5) für die Signalintensitätsmessung verwendete Algorithmen,
- 6) Skaleneinstellung (32 – 100 cm/s),
- 7) Detektionsschwelle (3 – 12 dB),
- 8) axiale Ausdehnung des Messvolumens (3 – 10 mm),
- 9) FFT-Größe (i.A. 64-Punkt-FFT),
- 10)FFT-Länge (2 ms),
- 11)FFT Überlappung (mindestens 50%),
- 12)verwendete Ultraschallfrequenz (i.A. 2 MHz),
- 13)High-pass Filtereinstellung (konstant für die Dauer der Untersuchung),
- 14)Dauer der Aufzeichnung (optimal 60 min, mindestens 30 min).

Zwar besitzen alle handelsüblichen Geräte einen MES Detektionsalgorithmus für die routinemäßige Durchführung der Untersuchung, diese Algorithmen konnten sich aber wegen ihrer Unzuverlässigkeit für wissenschaftliche Untersuchungen nicht durchsetzen. Ein wesentlicher Grund hierfür sind spontane Intensitätsschwankungen (Speckles) des Hintergrundsignals der fließenden Erythrozyten, die bei zu geringer Detektionsschwelle falsch positiv als MES interpretiert werden. Bei einer zu hohen Detektionsschwelle können niedrig intense MES der Auswertung entgehen. Leider führen auch Artefakte wie Husten oder Sondenerschütterung zu einem kurzfristigen Intensitätsanstieg im Dopplerfrequenzspektrum, der vom Algorithmus als MES

identifiziert werden kann, bei manueller Auswertung aber unschwer als Artefakt zu identifizieren ist. Eine Verbesserung der automatisierten Auswertung stellen Mehrkanalsonden dar, bei denen ein Mikroembolus in den verschiedenen Kanälen bei unterschiedlichen Detektionstiefen und –zeitpunkten erfasst wird (Abbildung 1.3, Pfeile mit Doppelspitzen), was so eine zusätzliche Abgrenzung gegenüber Artefakten durch den Zeitversatz der Signale erlaubt [67]. Für wissenschaftliche Untersuchungen stellt die manuelle Auswertung immer noch den Goldstandard dar. Dennoch konnte bisher bei der Beurteilung einer Ableitung durch verschiedene Untersucher keine hundertprozentige Übereinstimmung erreicht werden [81].

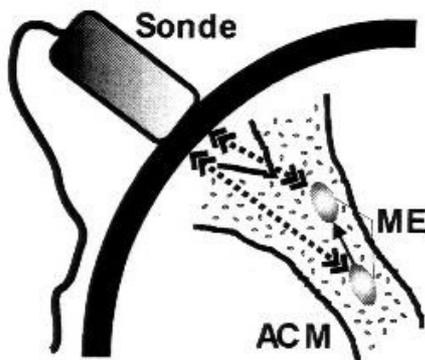


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung einer Untersuchung zur Mikroemboliedetektion

Die auf die Schädelkalotte temporal aufgesetzte Schall-Sonde wird so positioniert, dass sie die Signale der Arteria cerebri media (ACM) erfasst. Hierbei wird das Dopplersignal fast ausschließlich durch Erythrozyten rückgestreut und führt zu den charakteristischen Flusssignalen. Eventuell durch das Schallfenster zirkulierende Mikroemboli (ME) produzieren demgegenüber einen charakteristischen Anstieg im TCD-Signal gemäß ihrer physikalischen Eigenschaften [Aus 67].

Mikroembolien können aus Thrombozyten, gemischten Thromben, Atheromen, Fett oder Luft bestehen, wobei es im Rahmen von Routineuntersuchungen noch nicht möglich ist, anhand der Signale Rückschlüsse auf das Material zu ziehen [51; 81].

1.3 Hämatologische Erkrankungen im Zusammenhang mit der Entstehung von Thrombosen

Myeloproliferative Erkrankungen sind Erkrankungen der blutbildenden Stammzellen im Knochenmark, die ohne das Vorliegen eines adäquaten Stimulus mit einer klonalen Überproduktion von ein oder mehreren Blutzelllinien einhergehen. Je nachdem welche Zellreihe(n) betroffen ist/sind, unterscheidet man Polycythaemia rubra vera (PVR, alle 3 Zellreihen), Essentielle Thrombozythämie (ET, Thrombozyten), Chronisch myeloische Leukämie (CML, Leukozyten) und Mischformen, die hier unter dem Begriff unklassifizierte myeloproliferative Syndrome (UMS) zusammengefasst werden.

Im Zusammenhang mit MPS werden sowohl thromboembolische als auch hämorrhagische Komplikationen beschrieben [35; 38; 73]. Thromboembolische Ereignisse können sowohl das venöse wie das arterielle System betreffen. Etwa 75% der arteriellen Thrombosen spielen sich im zerebrovaskulären und kardialen Kreislauf ab [23; 46; 56; 57]. Dabei gibt es bezüglich des Auftretens arterieller Thrombosen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Unterformen der MPS.

Im Folgenden werden die einzelnen Unterformen der myeloproliferativen Erkrankungen insbesondere hinsichtlich ihres Thromboembolierisikos und des Auftretens von MES im Rahmen früherer Studien noch einmal gesondert betrachtet.

1.3.1 Polycythaemia rubra vera

Polycythaemia rubra vera (PVR) ist eine primäre myeloproliferative Erkrankung der pluripotenten Stammzellen im Knochenmark, die zu einer monoklonalen Panhyperplasie aller drei Zelllinien (Erythrozyten, Leukozyten, Megakaryozyten) des Knochenmarks führt, wobei die erythrozytäre Zellreihe am Stärksten von der monoklonalen Überproduktion betroffen ist. Dadurch kommt es zu einem Anstieg der Blutviskosität und damit zu einer zerebralen Minderdurchblutung [35], die vermutlich die Ursache der häufigsten neurologischen Symptome der PVR ist. Das Thromboserisiko korreliert mit der Hämatokriterhöhung, dem Alter und der Blutungsfrequenz, kann aber nur unzureichend mit der begleitenden Thrombozytose in Verbindung gebracht werden. Thrombotische Verschlüsse größerer zerebraler Arterien treten bei 10 – 20% der Patienten auf [38].

Weiterhin ergab sich die Vermutung, dass PVR Thrombenbildung aufgrund einer erhöhten Thrombozytenaktivierung begünstigt, insbesondere bei Vorschäden an der arteriellen Gefäßwand [75].

1.3.2 Essentielle Thrombozythämie

Die essentielle Thrombozythämie (ET) ist eine primäre myeloproliferative Erkrankung, die von der Polycythemia Vera Study Group definiert wird, als die Subgruppe von Patienten, bei denen sich eine persistierende Thrombozytose (Thrombozytenzahlen $\geq 1.000.000/\mu\text{l}$) mit megakaryozytärer Hyperplasie in Kombination mit einer Abwesenheit von anderen identifizierbaren Ursachen, (Philadelphia Chromosom, Knochenmarksfibrose und/oder myeloischer Metaplasie und erhöhter Erythrozytenzahl bei normalem Eisenspiegel) findet [59]. Es handelt sich also um eine Ausschlussdiagnose. Bei ET-Patienten finden sich stark vergrößerte, stark gelappte Megakaryozyten, die zur Clusterbildung neigen [96]. Auch die Thrombozyten sind normalerweise vergrößert und dysfunktional [59].

Häufigkeit und Schwere von thrombotischen Komplikationen sind jedoch, laut verschiedener Studien, unabhängig von der Thrombozytenzahl [66; 73; 102]. Die Pathogenese von Thrombosen in Rahmen der ET ist ungeklärt. Es werden vier verschiedene Mechanismen diskutiert: Thrombozytenhyperaggregabilität [92; 103], morphologisch abnormale Megakaryozyten aus denen abnorme Thrombozyten freigesetzt werden [37; 102], Thrombozytenfunktionsstörungen [8; 38], sowie eine gestörte Interaktion zwischen Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten [8]. Der wichtigste Mechanismus ist wahrscheinlich die Thrombozytenhyperaggregabilität.

1.3.3 Chronisch myeloische Leukämie

Die chronisch myeloische Leukämie (CML) gehört ebenfalls zu den chronisch myeloproliferativen Erkrankungen und ist charakterisiert durch das typische Blutbild (Leukozytose über $30000/\mu\text{l}$, Linksverschiebung, Vermehrung der Basophilen), das Vorhandensein des Philadelphia-Chromosoms und einer hohen Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung einer Blastenkrise.

Die Megakaryozytenkonzentration ist bei CML nur leicht erhöht. Die Megakaryozyten sind hier, im Gegensatz zu den bei ET und PVR beobachteten, eher klein, atypisch und bilden keine Cluster [96]. Die Inzidenz von thrombotischen und hämorrhagischen Komplikationen im Rahmen der CML ist gering [73; 96].

1.3.4 Unklassifizierte myeloproliferative Syndrome

Unter dem Begriff unklassifizierte myeloproliferative Syndrome (UMS) sind hier alle Patienten zusammengefasst, deren Erkrankung sich nicht genauer klassifizieren ließ. Darunter sind u.a. Patienten mit megakaryozytärer Myelose und myelodysplastischem Syndrom.

Wie bereits anfangs erwähnt, werden im Zusammenhang mit MPS häufig thrombotische und hämorrhagische Komplikationen beschrieben. Die Entstehung von Thrombosen hängt dabei wahrscheinlich mit einer Hyperaggregabilität der Thrombozyten zusammen und ist unabhängig von der Thrombozytenzahl [50].

Eine Übersicht über die Charakteristika der einzelnen Subgruppen der myeloproliferativen Erkrankungen sowie über die aktuelle Studienlage bzgl. des Thromboembolierisikos und MES-Detektion bei diesen Patienten findet sich in Tabelle 1.2.

MPS-Form	Betroffene Zellreihe(n)	Hämatokrit	Neurologische Symptome	Häufigkeit v. Thromboembolien	Betroffene Gefäße	Detektion von MES
PVR	Erythrozyten Leukozyten Thrombozyten	erhöht	Cephalgien Lethargie Schwindel	10-90%	Arterien Venen	ja
ET	Thrombozyten (megakaryozytäre Hyperpalsie, Thrombozyten-funktionsstörung)	Normal – erhöht	Cephalgien Parästhesien Sehstörungen Epileptische Anfälle	10-90%	Arterien Venen mikrovaskulär	ja
CML	Leukozyten	Normal – erhöht	Nicht typisch	6 - 17%	mikrovaskulär	nein
UMS	Unterschiedlich (oft aktivierte Thrombozyten)	Normal – erhöht	Nicht typisch	6 - 17%	Arterien Venen	ja

Tabelle 1.2: Übersicht über die Charakteristika der einzelnen myeloproliferativen Syndrome bzgl. hämatologischer Daten, Klinik und Auftreten von MES in der transkraniellen Mikroemboliedetektion MPS: Myeloproliferatives Syndrome, PVR: Polycythaemia rubra vera, ET: Essentielle

Thrombozythämie, CML: Chronisch myeloische Leukämie, UMS: Unklassifizierte myeloproliferative Syndrome, MES: Mikroembolische Signale [4; 5; 13; 16; 23; 35; 36; 38; 40; 50; 64; 66; 77; 86; 91; 98; 102].

Es scheint also, wie sich aus der großen Inzidenz-Spanne schließen lässt, bei den Patienten mit MPS Subgruppen mit einem besonders hohen Risiko für das Auftreten thromboembolischer Ereignisse zu geben. Wie in mehreren Studien beschrieben wurde, hängt die Entstehung von Thrombosen im Rahmen der MPS wahrscheinlich mit einer Hyperaggregabilität der Thrombozyten zusammen [50; 99; 102]. Diese ist wahrscheinlich auf einen Defekt der Plättchen zurückzuführen, der im Rahmen der klonalen Zellproduktion bei diesen Erkrankungen auftritt. Der genaue Mechanismus dieser Hyperaggregabilität ist jedoch unbekannt [100].

Zur Vermeidung von thromboembolischen Komplikationen bei Patienten mit myeloproliferativen Syndromen gibt es zwei Haupttherapieansätze: Thrombozytenaggregationshemmung und Zytoreduktion.

Acetylsalizylsäure (ASS) wird von mehreren Autoren als effizient zur Therapie und Prävention von Thrombosen bei MPS eingestuft, das Blutungsrisiko wird hierbei insbesondere bei Gabe niedriger Dosen als gering angesehen [92; 93]. Goertler et al. konnten in zwei Studien [32; 33] einen Rückgang mittels TCD detektierter zerebraler Mikroembolien unter ASS –Therapie verzeichnen.

Auch Hydroxyurea (Litalir®) gilt als effektiv zur Senkung der Thrombozytenzahl, ebenso zur Prävention von Thrombosen [12]. Dabei scheint bei relativ niedrigen Thrombozytenzahlen eine weitere Zytoreduktion sogar noch sinnvoller zu sein als ASS [66]. Hydroxyurea steht bei ET- und PVR-Patienten in Verdacht akute Leukämie auszulösen [12].

Trotz der Effektivität beider oben genannter Therapieansätze werden sowohl unter zytoreduzierender, als auch unter antikoagulatorischer Therapie weiterhin thrombotische Komplikationen und das Auftreten von MES beschrieben, was eventuell durch ein vermindertes Ansprechen der klonal produzierten Thrombozyten auf o.g. Medikamente erklärt werden kann [12; 50].

Bislang sind, außer den üblichen klinischen Parametern (Alter, Thromboembolien in der Vorgeschichte) und einer erhöhten Thrombozytenzahl, keine Kriterien bekannt, die helfen würden solche Hochrisikopatienten zu identifizieren [23; 86] und selbst bezüglich der Höhe der Thrombozytenzahl wurde in mehreren Studien das Fehlen eines Zusammenhangs zwischen deren Höhe und dem Auftreten von thromboembolischen Komplikationen, speziell bei Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen, beschrieben, was eventuell auf die o.g. Funktionsdefekte der klonal produzierten Zellen zurückzuführen sein könnte [66; 73; 102]. Eine Screeningmethode zur Identifizierung dieser Risikopatienten wäre also äusserst wünschenswert.

In der Diagnostik von Patienten mit MPS und einem daraus eventuell resultierendem erhöhtem Schlaganfallrisiko wird der transkranielle Doppler noch nicht standardmäßig eingesetzt. Von einigen Autoren wird die Verwendung des TCD zur Therapiekontrolle empfohlen [5].

1.4 Durchflusszytometrische Untersuchung

In dieser Studie wurde durch Herrn Dr. Torben Villmow in der Medizinischen Klinik IV (Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie) der Justus-Liebig-Universität, bei 17 Patienten parallel zur Mikroemboliedetektion eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Diese Untersuchung diente dazu, das Auftreten von MES mit den Basisparametern des Blutbildes und dem Vorhandensein bzw. der Verteilung von aktivierten singulären Thrombozyten, Thrombozytenmikropartikeln sowie Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten korrelieren zu können. Die angewandte Technik wurde bereits publiziert [90; 94]. Hier soll nur in Kürze ein Überblick über die Methode und die Bedeutung der einzelnen untersuchten Parameter im Hinblick auf die mögliche Entstehung von Thrombosen bei MPS-Patienten gegeben werden.

Das Prinzip der Durchflußzytometrie beruht darauf, dass Zellen in einem Flüssigkeitsstrom linear aufgereiht werden und einen definierten Lichtstrahl kreuzen. Anhand der gemessenen Vorwärts- und Seitwärtsstreuung können Aussagen über Größe und Granularität der Zellen gemacht werden [90]. Eine weitere Differenzierung erreicht man durch den Einsatz fluoreszierender Antikörper (Ak), die die zu

untersuchenden Zellen über definierte Antigene markieren und deren Expression gemessen und zur Beurteilung herangezogen wird.

So werden z.B. zur Detektion aktivierter Thrombozyten markierte anti-CD62p-Antikörper verwendet. CD62p (synonym: P-Selektin) ist ein Aktivierungsantigen; es wird nur auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten exprimiert [6; 47; 54; 87] und in vielen Studien als Marker für eine vermehrte Thrombozytenaktivierung bei myeloproliferativen Syndromen verwendet. Bislang konnte jedoch noch keine Korrelation zwischen der Expression von CD62p und dem Auftreten von Thrombosen oder Blutungen bei den entsprechenden Patienten gefunden werden [7;10; 34; 97].

Mikropartikel sind kleinste Phospholipidpartikel, die aus aktivierten Thrombozyten freigesetzt werden und die Aktivierung von plasmatischen Gerinnungsfaktoren unterstützen [14; 101]. Durchflusszytometrisch können sie von anderen Zellfragmenten dadurch abgegrenzt werden, dass sie GPIb und GPIIb/IIIa auf der Oberfläche tragen, über die sie evt. auch in Thrombozytenaggregate mit eingebaut werden können. Über CD62p können Mikropartikel auch mit anderen Zellen interferieren [30; 42], dabei ist umstritten, ob Mikropartikel nur lokal die Gerinnung unterstützen, oder sie diese Wirkung auch systemisch entfalten, wenn sie in die Zirkulation gelangen [27; 79].

Die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten wird ebenfalls über P-Selektin (CD62p) vermittelt. Ihr Auftreten gilt als wichtiger Marker in der Pathogenese von vaskulären Durchblutungsstörungen [15; 44]. Beim Auftreten von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten im Rahmen von myeloproliferativen Syndromen kann dies auch als Aktivierung des gesamten Gerinnungssystems im Rahmen der klonalen Produktion von Blutzellen gewertet werden [25].

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Querschnittsuntersuchung an 42 konsekutiven Patienten (mittleres Alter $64,3 \pm 14,5$ Jahre, 22 Frauen, 20 Männer) mit einer myeloproliferativen Erkrankung aus der hämatologischen Ambulanz des Zentrums für Innere Medizin des Universitätsklinikums Giessen. Alle Patienten wurden nach Einschluss in die Studie im Verlauf hinsichtlich des Auftretens thromboembolischer Ereignisse beobachtet (Mittelwert $29,7 \pm 7,3$ Monate (Median 30, Spannweite 16,5 – 40,5 Monate)).

Das Studienprotokoll wurde der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität vorgelegt, die keine Einwände gegen die Durchführung der Untersuchung erhob. Alle Patienten wurden über die Studie aufgeklärt und dokumentierten schriftlich ihre Bereitschaft zur Teilnahme. Tabelle 2.1 fasst klinisch relevante Daten der Patientenkohorte zusammen.

Parameter	
Alter (Median)	69.0 [57 - 75; 24 - 87] Jahre
Frauen	64.5 [56,5 - 73; 24 - 80] Jahre
Männer	70.5 [59 - 78; 27 - 87] Jahre
Geschlecht	
Frauen	22 (52.4%)
Männer	20 (47.6%)
Prospektiver Beobachtungszeitraum	30 [27 - 36; 16.5 - 40.5] Monate
Myeloproliferative Erkrankungen	
Essentielle Thrombozythämie	19 (45.2%)
Unklassifizierte myeloproliferative Syndrome	8 (19.1%)
Polyzythämia vera	8 (19.1%)
Chronische myeloische Leukämie	7 (16.7%)
Blutbildveränderungen	
Thrombozytose	25 (59.5%); 591 [519 - 910; 434 - 1337] x 10 ⁹ /l
Thrombozytopenie	2 (4.9%); 110 [81 - 139; 81 - 139] x 10 ⁹ /l
Anämie	15 (35.7%); 3.6 [31 - 3,9; 2.6 - 4.2] x 10 ¹² /l
Polyglobulie	6 (14.3%); 5,8 [5,6 - 6,1; 5.6 - 6.9] x 10 ¹² /l
Leukozytose	10 (23.8%); 17,2 [14,3 - 22,3 ;13.2 - 196.5] x 10 ⁹ /l
Leukopenie	5 (11.9%); 3.5 [2,9 - 3,5; 2.3 - 3.7] x 10 ⁹ /l
Medikation bei Einschluss	
Acetylsalicylsäure (ASS)	21 (50,0%)
Hydroxyurea	19 (45,2%)
Interferon	2 (4,8%)

Tabelle 2.1: Demographische und klinische Daten der Patientenkohorte. Kontinuierliche Daten wurden als Median [25%-75%-Perzentile; Spannweite], Häufigkeiten als n (%) angegeben.

2.2 Dopplersonographische Mikroemboliedetektion

Bei jedem Patienten wurde eine dopplersonographische Mikroemboliedetektion (Multi Dop X, DWL, Sindelfingen, Deutschland) für die Dauer von 30 Minuten durchgeführt. Dazu wurde beim liegenden Patienten mit einer 2 MHz–Ultraschallsonde die A. cerebri medial in einer Untersuchungstiefe von 45 bis 58 mm eingestellt und die Sonde mit Hilfe eines Stirnbandes an der Schläfe des Probanden befestigt. Es wurden ein Messvolumen von 5 mm Größe und eine geringe Signalverstärkung gewählt, um eine ausreichende Unterscheidung von Mikroemboliesignalen und dem Hintergrundsignal zu gewährleisten. Während der Ableitung wurde die Geschwindigkeitsskala auf –40 bis 130 cm/s eingestellt. Das Gerät war mit einer 64-Punkt Fourier Transformation ausgestattet. Die Länge der schnellen Fourier Transformation betrug 2 ms, die Überlappung 60%. Der Hochpassfilter betrug 100 Hz, die Intensitätsschwelle ≥ 7 dB. Die Ableitung wurde dabei mittels eines Sony DAT-Recorders (Sony Typ DTC ZE 700) auf Digitale Audio Tape (DAT; DG–120 Fujifilm 4 mm Data-Tape, DG 90P Sony Data Cartridge, KD4 120 mm KAO 4 mm Data Cartridge-Träger 4 mm, 120 min) aufgezeichnet. Während der Aufzeichnung wurde das Dopplersignal durch einen Untersucher optisch und akustisch überwacht. Dies ist nach wie vor notwendig um ggf. die Sonde zu repositionieren oder evt. auftretende Besonderheiten während der Ableitung, z.B. extern aufgetretene Artefaktquellen, zu dokumentieren. Durch den Untersucher wurden dann nach Abschluss der Ableitung die vom Softwarealgorithmus ausgewählten Ereignisse, d.h. potentielle Mikroembolien, überprüft.

Die eigentliche Auswertung erfolgte durch zwei Untersucher (Dr. med. Tibo Gerriets, Priv.-Doz. Dr. med. Erwin Stolz) indem die DAT-Bänder in den FFT-Eingang des Geräts rücküberspielt und akustisch sowie optisch hinsichtlich vorhandener Mikroembolien ausgewertet wurden. Dabei waren die Untersucher hinsichtlich des Ergebnisses des Anderen und hinsichtlich klinischer und hämatologischer Daten geblindet. Eine übereinstimmende Bewertung eines Ereignisses wurde als identifizierte Mikroembolie gewertet.

Folgende allgemein akzeptierte Kriterien des Consensus Committee des neunten internationalen Cerebral Hemodynamics Symposium [11] wurden für die Identifikation von MES herangezogen:

- Typisches akustisches Signal (Zirpen, Klicken, "Blupp").

- Kurze Signaldauer.
- Zufälliges Auftreten von hochintensen Signalanteilen im Dopplerfrequenzspektrum ohne zeitliche Bindung an den Herzzyklus.
- Intensitätsanstieg von ≥ 5 dB über das Hintergrundsignal hinaus.

Bei 6 der 42 Patienten war es möglich, eine Verlaufsuntersuchung (6 Zweituntersuchungen, 1 Drittuntersuchung) durchzuführen. Dieser Teil der vorliegenden Arbeit erfolgte unsystematisch, die Auswahl der Patienten, die nachuntersucht wurden, wurde seitens der Hämatookologischen Ambulanz des Zentrums für Innere Medizin getroffen.

Alle Patienten erhielten eine extra- und transkranielle Farbduplexsonographie (Philips Sonos 5500, 2,5 MHz Sektor- und 7,5 MHz Linearsonde), um eine intrakranielle Gefäßstenose jeglichen Grades und eine extrakranielle Gefäßstenose der A. carotis interna von $\geq 70\%$ lokalem Stenosegrad auszuschließen. Deshalb wurde die Mikroemboliedetektion unilateral auf der Seite mit der besten Ultraschallpenetration und der zuverlässigsten Einstellbarkeit der A. cerebri media durchgeführt.

2.3. Laboruntersuchungen

2.3.1 Blutbildveränderungen

Bei allen Patienten wurde eine Blutbilduntersuchung am Tag der Dopplersonographie durchgeführt, so dass Informationen über Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahlen vorlagen, die mit dem dopplersonographischen Befund korreliert wurden. Als Normwerte wurden die Ergebnisse der 3rd United States National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) [9] zugrundegelegt. NHANES III lieferte Blutbilddaten von insgesamt 29314 amerikanischen Bürgern.

Diese Untersuchungen wurden in einem Labor mit interner und externer Qualitätskontrolle durchgeführt [39; 48; 49], so dass die maximale Unpräzision und Ungenauigkeit der Messung für die Erythrozytenzellkonzentration bei 4% bzw. 3%, für die Hämoglobinkonzentration bei jeweils 2%, für den Hämatokrit bei jeweils 3%,

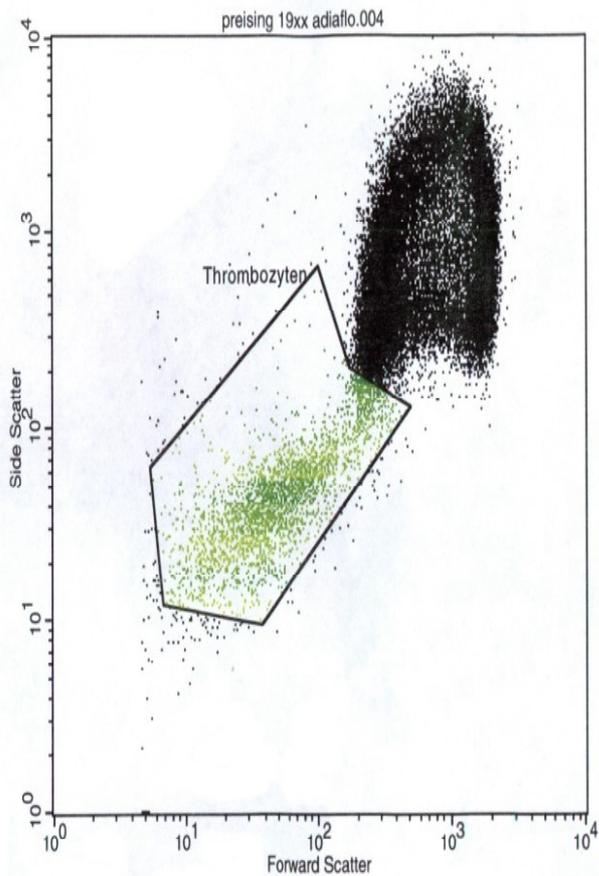
für die Thrombozytenzellkonzentration bei jeweils 7% und für die Leukozytenzellkonzentration bei jeweils 6% liegen [68].

2.3.2 Durchflusszytometrie

Bei 17 Patienten (40,5%) konnte am Tag der Mikroemboliedetektion eine Thrombozyten-Durchflusszytometrie durchgeführt werden. Der Einschluss aller Patienten in diesen Studienteil gelang nicht, da nicht zu jedem Zeitpunkt ein erfahrener Untersucher und/oder das Gerät verfügbar waren. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden von Herrn Dr. Torben Villmow im hämatologischen Labor der Abteilung Innere Medizin des Universitätsklinikums Gießen durchgeführt. Das detaillierte Messprotokoll wurde bereits veröffentlicht [94]. Kurz zusammengefasst wurde venöses Blut ohne Stauung über eine 21 G Butterfly in gepufferte Zitratlösung abgenommen, die als Fixans Paraformaldehyd und Glyoxal enthielt. Thrombozyten wurden nach vorheriger Verdünnung im Vollblut mit Phycoerythrin-(PE)-anti-CD42b (Anti-GPIIb α , Clone SZ2, IgG1, Maus, Immunotech, Marseille, France) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-anti-CD62p Antikörpern (Clone CLB-Thromb/6, IgG1, Maus, Immunotech, Marseille, Frankreich) markiert und mit einem Epics XL2 Zytometer (Coulter, Miami, FL, USA) hinsichtlich der folgenden Parameter untersucht: Thrombozytenaggregate, thrombozytäre Mikropartikel, aktivierte singuläre Thrombozyten (CD62p-Expression). Die CD62p-Bindung diente als Marker aktivierter Thrombozyten, die CD42b-Bindung der Abgrenzung der Thrombozyten von anderen Blutbestandteilen. Zur Erfassung von Thrombozyten-Leukozyten-Konjugaten wurde ein weiteres Aliquot der Blutprobe mit PE-anti-CD14 (Clone RMO52, IgG2a, Maus, Immunotech, Marseille, France), FITC-anti-CD42b (Clone SZ2, IgG1, Maus, Immunotech, Marseille, Frankreich), und PerCP-anti-CD45 (Clone 2D1, IgG1, Maus, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) Antikörpern inkubiert. Neutrophile und Monozyten wurden über ihre jeweilige Bindungscharakteristik von Anti-CD45 (Pan-Leukozyten Marker) und Anti-CD14 (Monozyten Marker) identifiziert. Die Bindung von FITC-anti-CD42b Antikörpern identifizierte dann Thrombozyten-Neutrophilen- oder Thrombozyten-Monozyten-Konjugate. Die Normalbereiche dieser Parameter wurden an Hand der Ergebnisse bei 16 gesunden Kontrollen (mittleres Alter 42 Jahre, Spannweite 23 – 63 Jahre, 6 Frauen, 10 Männer) definiert. Dazu wurden willkürlich untere und obere Grenzen der Vorwärtslichtstreuung definiert, die 90%

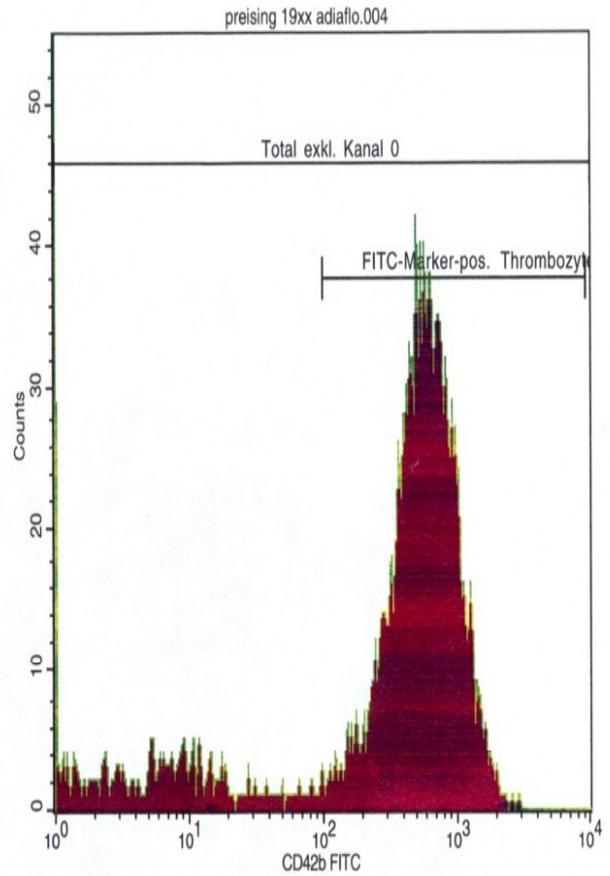
aller CD42b-positiven Ereignisse einschlossen. Diese Ereignisse wurden operational als singuläre Thrombozyten definiert, während alle Ereignisse unter der unteren Grenze der Vorwärtslichtstreuung als thrombozytäre Mikropartikel und die Ereignisse oberhalb der Grenze dieses 90%-Intervalls als Mikroaggregate definiert wurden. Singuläre Thrombozyten wurden einem weiteren FITC-Fluoreszenzkanal zugeleitet. Auch hier wurde arbiträr ein 90%-Intervall für die FITC-CD62p-Fluoreszenz festgelegt. Alle Ereignisse unterhalb der Intervallgrenze wurden als nicht aktiviert, die Ereignisse oberhalb der Intervallgrenze als aktivierte Thrombozyten angesehen. Die obere und untere Grenze des 90%-Intervalls wurde durch FITC-markierte Isotyp-Kontrollantikörper (Clone 679.1Mc7, Isotype IgG1, Maus, Immunotech, Marseille, Frankreich) verifiziert.

Neutrophile und Monozyten wurden wie bereits oben beschrieben an Hand ihrer Bindung von anti-CD45 und anti-CD14-Antikörpern identifiziert. Leukozyten mit Bindung dieser Antikörper wurden einem weiteren Fluoreszenzkanal, mit einer Fluoreszenzgrenze unter der sich bei Untersuchung mit Isotyp-Kontrollen (Clone 679.1Mc7, Isotype IgG1, Maus, Immunotech, Marseille, Frankreich) 95% aller Ereignisse befanden, zugeleitet. Nach Doppelmarkierung mit FITC-anti-CD42b Antikörpern wurden alle Ereignisse oberhalb dieser Grenze als Thrombozyten-Neutrophilen- oder Thrombozyten-Monozyten-Konjugate definiert (Drei-Farben-Methode [65]). Zur Veranschaulichung dienen folgende Abbildungen (Abbildung 2.1 und 2.2), die die verschiedenen Antikörpermarkierungen anhand der Blutprobe eines Probanden zeigen.



File: preising 19xx adiaflo.004 Patient ID: tag 1
 Tube: CD42b Panel: ADIAflo
 Acquisition Date: 31-Jul-1 Gate: No Gate
 Y Parameter: SSC-H Side Scatter (Log)

Region	Events	% Gated	X Mean	Y Mean	Y Geo Mean	Px,Py
Thrombozyten	5873	8.85	80.92	58.04	45.96	1, 2



File: preising 19xx adiaflo.004 Patient ID: tag 1
 Tube: CD42b Panel: ADIAflo
 Acquisition Date: 31-Jul-1 Gate: Thrombozytengate

Marker	Events	% Gated	Mean	CV
All	5873	100.00	530.97	72.76
Total exkl. Kanal 0	5700	97.05	547.06	69.61
FITC-Marker-pos. Thrombozyten	4898	83.40	634.30	53.36

Abbildung 2.1: Auswertung der Durchflusszytometrie I: *Linkes Bild:* Verteilung CD 42bmarkierter Zellen: Anhand der unterschiedlichen Vorwärtslichtstreuung (forward scatter) werden diejenigen Zellsignale als von singulären Thrombozyten ausgelöst definiert, die in einem willkürlich festgelegtem 90%-Intervall liegen. Die unterhalb dieser willkürlichen Grenze liegenden Zellen werden als Mikropartikel, die darüber liegenden als Mikroaggregate definiert (Skalierung logarhythmisch). *Rechtes Bild:* CD 42b-positive Zellen, Häufigkeitsverteilung [Aus 26].

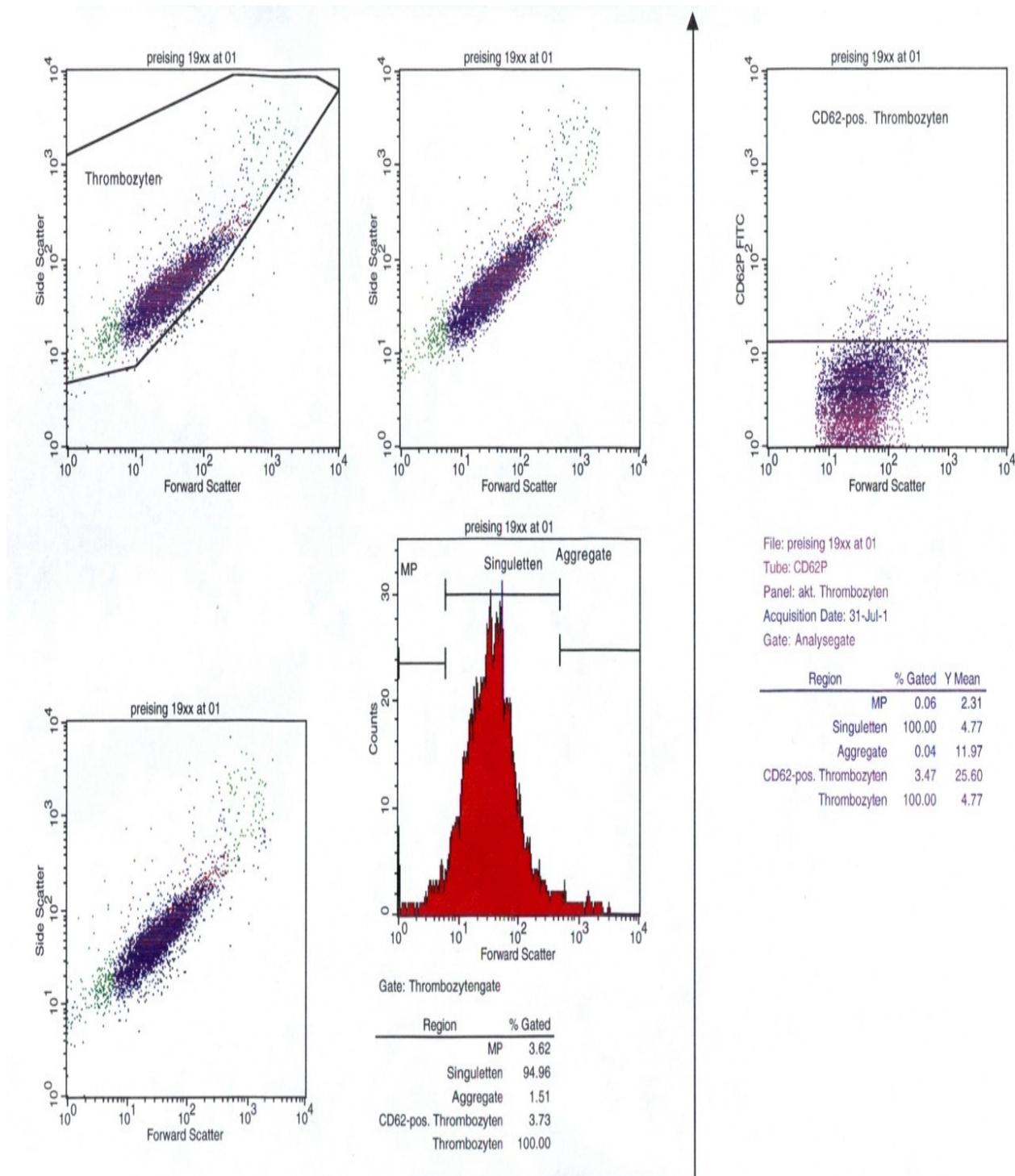


Abbildung 2.2: Auswertung der Durchflusszytometrie II: Mit der Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper die gegen bestimmte Oberflächenproteine der Thrombozytenmembran gerichtet sind, lässt sich der Aktivierungszustand der Thrombozyten weiter differenzieren: Singuläre Thrombozyten werden mit CD 62p konjugiert, CD-62p-positive Zellen gelten innerhalb eines willkürlich definierten 90% - Intervalls als aktiviert [Aus 26].

2.4 Statistische Auswertung

Zur deskriptiven Beschreibung der Daten wurden der Mittelwert, Standardabweichung, Median, Spannweite und 25%-75% Perzentile verwendet. Häufigkeitsdaten wurden mit dem χ^2 -Test oder wenn notwendig mit dem exakten Test nach Fisher verglichen. Kontinuierliche Daten wurden mit einem nicht parametrischen U-Test verglichen. Die Assoziation zwischen MES und verschiedenen Variablen wurde mit der Spearman-Rangkorrelation analysiert. Die Übereinstimmung zweier geblindeter Untersucher hinsichtlich des Vorhandenseins von MES wurde mit dem Korrelationskoeffizienten in Klassen untersucht.

3. Ergebnisse

3.1 Übereinstimmung geblindeter Untersucher hinsichtlich des Vorhandenseins von zirkulierenden Mikroembolien

Die Übereinstimmung zweier geblindeter Untersucher hinsichtlich des Vorhandenseins von zirkulierenden Mikroembolien war mit einem Korrelationskoeffizienten in Klassen von 0,67 (95% Konfidenzintervall 0,47 - 0,80) gut.

3.2 Zirkulierende Mikroembolien und klinische Variablen

MES traten in unserem Kollektiv insgesamt bei 15/42 Patienten (35,7%) auf. Die Rate pro 30 min lag im Median bei 2,5, die Spannweite reichte von 1 - 108, die 25% - 75% Perzentile von 1 - 10.

Die Häufigkeit MES-positiver Patienten war bei Störungen der roten Blutreihe etwas höher als bei den anderen MPS, jedoch ohne statistische Signifikanz: ET 8/19 Patienten (42,1%), PVR 3/8 Patienten (37,5 %), UMS 5/8 Patienten (37,5%) und CML 1/7 Patienten (14,3 %) ($p = 0,29$). Ein ähnlicher nicht signifikanter Trend ergab sich auch für die MES-Raten pro 30 min: ET-Patienten $7,2 \pm 24,7$, 25% - 75% Perzentile 0 - 1, Spannweite 0 - 108, UMS-Patienten $2,6 \pm 4,9$, 25% - 75% Perzentile 0 - 3,5, Spannweite 0 - 14, PVR-Patienten $2,4 \pm 5,6$, 25% - 75% Perzentile 0 - 1,5, Spannweite 0 - 16. Die geringsten Raten wurden bei CML-Patienten ($1,1 \pm 3,0$, 25% - 75% Perzentile 0 - 0, Spannweite 0 - 8) gefunden. Zwischen den verschiedenen MPS-Typen bestand kein signifikanter Unterschied ($p = 0,71$).

Alter ($p = 0,94$) und Geschlecht ($p = 0,59$) spielten für die Häufigkeit und Rate der MES keine Rolle. Überraschenderweise konnten wir keinen Zusammenhang mit der Häufigkeit MES-positiver Patienten und der MES-Rate pro Zeit und der Medikation feststellen ($p = 0,62$). Tabelle 3.1 fasst die Daten zusammen.

3.3 Zirkulierende Mikroembolien und Blutbildveränderungen

Es bestand weder eine Korrelation zwischen der Thrombozyten- (Spearman $\rho = 0,23$, $p = 0,11$), Leukozyten- (Spearman $\rho = 0,02$, $p = 0,90$) oder Erythrozytenzahl (Spearman $\rho = -0,10$, $p = 0,49$) und der Rate von MES pro Zeiteinheit noch dem Vorhandensein von MES als kategorischer Variable (Spearman $\rho = 0,25$, $p = 0,09$; Spearman $\rho = -0,09$, $p = 0,52$; Spearman $\rho = -0,16$, $p = 0,28$). Lediglich Patienten mit sowohl Thrombozytose als auch Anämie (8/15, 53,3%) hatten signifikant häufiger MES-positive Untersuchungen als Patienten ohne diese Blutbildstörungen (1/11, 9,1%, $p = 0,02$).

In Tabelle 3.1 sind Daten zu MES und Blutbildveränderungen zusammengefasst.

	MES-positiv (n = 15)	MES-negativ (n = 27)	P
Alter	70,0 [57-74, 27-87] Jahre	68,0 [57-75, 24-80] Jahre	0,94
Geschlecht	Männer 8/15 (53,3%) Frauen 7/15 (46,7%)	Männer 13/27 (48,2%) Frauen 14/27 (51,9%)	0,59
Thrombozyten	552 [388-939, 139-1249] $\times 10^9/l$	434 [295-642, 81-1058] $\times 10^9/l$	0,11
Erythrozyten	4.1 [3,6-4,6, 2,6-6,9] $\times 10^{12}/l$	4.4 [4,0-5,0, 2,8-6,1] $\times 10^{12}/l$	0,27
Leukozyten	7.4 [3,5-18,6, 2,9-97] $\times 10^9/l$	7.8 [4,1-214, 2,3-296] $\times 10^9/l$	0,94
Thrombozytose	11/15 (73,3%)	14/27 (51,9%)	0,15
Thrombozytopenie	1/15 (6,7%)	1/27 (3,7%)	0,59
Anämie	8/15 (53,3%)	7/27 (25,9%)	0,08
Polyglobulie	2/15 (13,3%)	4/27 (14,8%)	0,64
Leukozytose	5/15 (33,3%)	5/27 (18,5%)	0,24
Leukopenie	3/15 (20,0%)	2/27 (7,4%)	0,23
ASS	6/15 (40,0%)	15/27 (55,6%)	0,26
Hydroxycarbamid	9/15 (60,0%)	10/27 (37,0%)	0,13
Interferon	1/15 (6,7%)	2/27 (7,4%)	0,83

Tabelle 3.1: Vergleich verschiedener Parameter zwischen MES-positiven und MES-negativen Patienten. Kontinuierliche Daten werden als Median [25% - 75% Perzentile; Spannweite], Häufigkeiten als n (%) angegeben. ASS: Acetylsalicylsäure.

3.4 Zirkulierende Mikroembolien und thrombozytäre Durchflusszytometrie

Bei einer Untergruppe von 17 Patienten war es möglich, am Tag der dopplersonographischen Mikroemboliedetektion eine thrombozytäre Durchflusszytometrie (DFZ) durchzuführen. Diese Patienten unterschieden sich nicht signifikant von den Patienten, die keine Durchflusszytometrie erhielten (Tabelle 3.2). Damit kann diese Subpopulation als repräsentativ für die Gesamtkohorte gelten.

	DFZ (n = 17)	Keine DFZ (n = 25)	P
Alter (Jahre)	59,5 ± 18,2	66,3 ± 12,5	0,11
Geschlecht			0,19
Frauen	7 (41,2%)	15 (60,0%)	
Männer	10 (58,8%)	10 (40,0%)	
Myeloproliferatives Syndrom			0,60
ET	9 (53%)	10 (40,0%)	
PVR	2 (12%)	6 (24%)	
UMS	4 (24%)	4 (16%)	
CML	2 (12%)	5 (20%)	
Medikation			
ASS	8 (47%)	14 (56%)	0,40
Hydroxycarbamid	11 (65%)	14 (56%)	0,41
Interferon	1 (6%)	1 (4%)	0,65
MES-positive Patienten	6/17 (35%)	9/25 (36%)	0,61
MES-Rate pro 30 min	8,1 ± 26,1 [0 - 2; 0 -108]	1,8 ± 4,1 [0 - 1, 0 - 16]	0,83

Tabelle 3.2: Vergleich verschiedener Parameter zwischen Patienten, die eine durchflusszytometrische Untersuchung erhielten, und Patienten, die diese nicht erhielten. Kontinuierliche Daten werden als Median [25% - 75% Perzentile; Spannweite], Häufigkeiten als n (%) angegeben. ASS: Acetylsalicylsäure, DFZ: Durchflusszytometrie.

Sechs der Patienten mit durchgeführter Durchflusszytometrie waren MES-positiv, 11 MES-negativ. Der prozentuale Anteil CD62p-positiver, d.h. aktivierter Thrombozyten bei MPS-Patienten mit MES (MPS+MES, Median 12,5%) war gegenüber gesunden Kontrollen signifikant erhöht ($p = 0,04$), bei MPS-Patienten ohne MES war der prozentuale Anteil aktivierter Thrombozyten zwar tendenziell erhöht (MPS-MES, Median 12,6%), erreichte aber im Vergleich zu gesunden Kontrollen keine Signifikanz ($p =$

0,08) (Abbildung 3.1a). Auch der Vergleich der MPS+MES- mit MPS-MES-Patienten ergab keine signifikanten Unterschiede des Anteils aktivierter Thrombozyten ($p = 0,72$).

Thrombozyten-Mikroaggregate waren weder in der MPS+MES-Gruppe (Median 1,7%) noch in der MPS-MES-Gruppe (Median 1,8%) im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht ($p = 0,18$ beide Gruppen). Auch die MPS-Gruppen unterschieden sich hinsichtlich des prozentualen Anteils von Thrombozyten-Mikroaggregaten untereinander nicht ($p = 0,61$) (Abbildung 3.1b).

Der Anteil von Thrombozyten-Mikropartikeln unterschied sich bei MPS+MES-Patienten (Median 9%, $p = 0,17$) nicht signifikant von gesunden Kontrollen, er war aber bei MPS-MES-Patienten signifikant gegenüber Kontrollen erhöht (Median 11%, $p < 0,01$). MPS+MES- und MPS-MES-Patienten unterschieden sich aber nicht untereinander hinsichtlich des Anteils von Thrombozyten-Mikropartikeln ($p = 0,29$) (Abbildung 3.1c).

Im Vergleich zu gesunden Kontrollen waren bei MPS+MES-Patienten Thrombozyten-Monozyten-Konjugate signifikant erhöht (Median 14,5%, $p < 0,01$), jedoch nicht in der MPS-MES-Gruppe (Median 8,6%, $p = 0,21$). Im Vergleich beider MPS-Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,45$) (Abbildung 3.2a). Thrombozyten-Neutrophilen-Konjugate waren gegenüber gesunden Kontrollen in der MPS+MES-Gruppe deutlich und signifikant erhöht (Median 14,5%, $p < 0,01$), während sich die Gruppe der MPS-MES-Patienten nicht signifikant von gesunden Kontrollen unterschieden (Median 8,6%, $p = 0,69$). Hier ergab der Vergleich beider Gruppen einen deutlichen Unterschied mit erhöhtem Anteil von Konjugaten in der MPS+MES-Gruppe, der fast das Signifikanzniveau erreichte ($p = 0,09$) (Abbildung 3.2b).

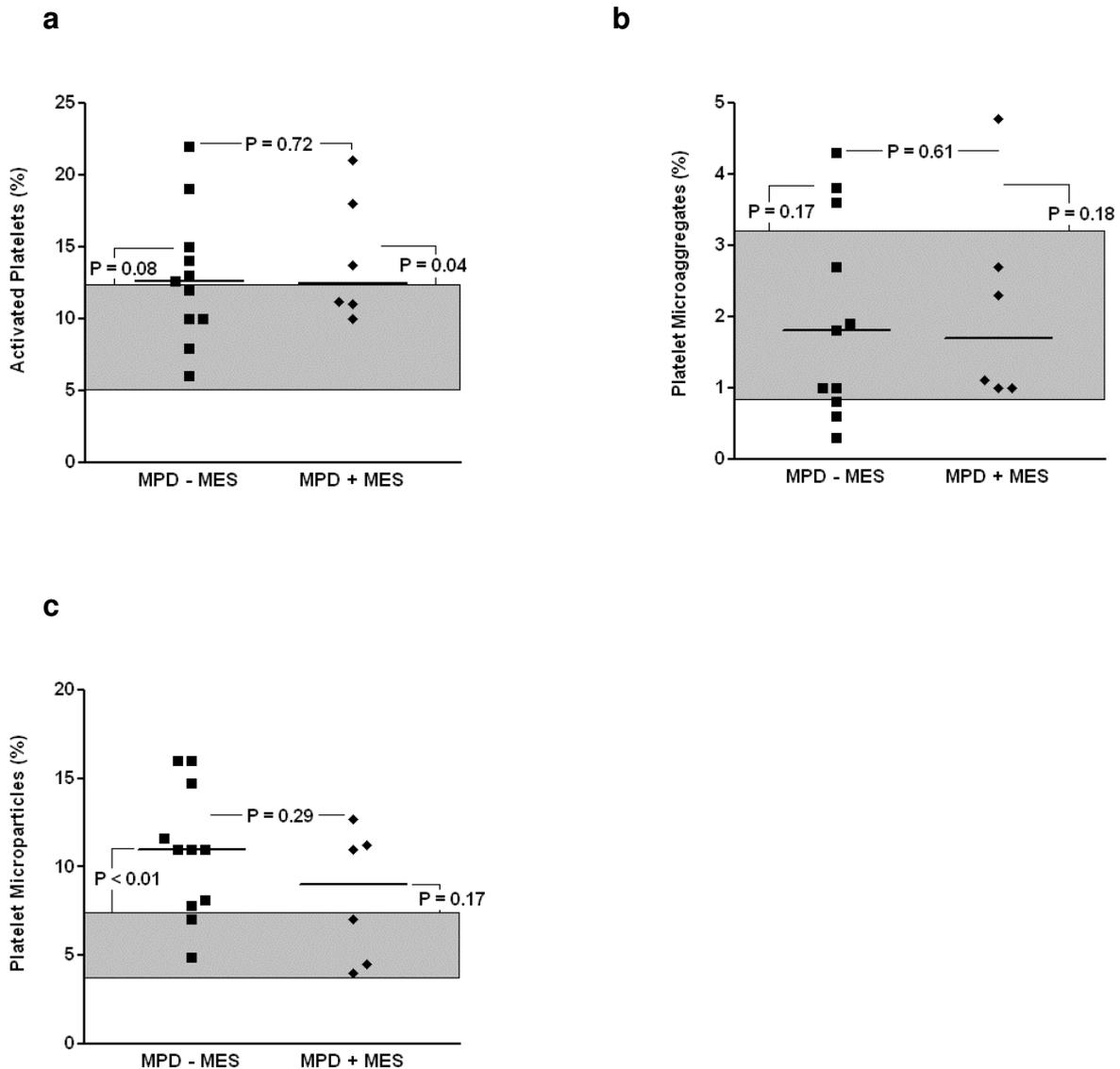


Abbildung 3.1: Vergleich der medianen prozentualen Anteile von aktivierten Thrombozyten (a), Thrombozyten-Mikroaggregaten (b) und Thrombozyten-Mikropartikeln (c) zwischen Patienten mit und ohne zirkulierende Mikroembolien und Kontrollen. Die Quadrate und Rauten zeigen die individuellen Messwerte, die horizontale Linie den Median der Messwerte und das graue Rechteck die 5% - 95% Perzentile der Messwerte bei gesunden Kontrollen. MPD: Myeloproliferative Disorders

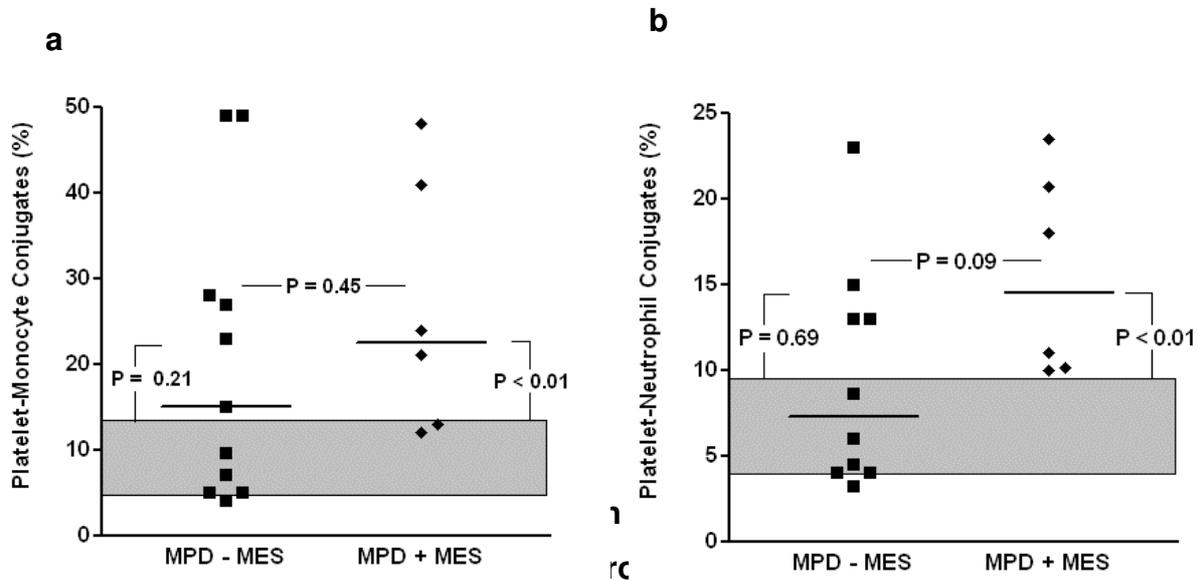


Abbildung 3.2: Vergleich der medianen prozentualen Anteile von Thrombozyten-Monozyten-Konjugaten (a) und Thrombozyten-Neutrophilen-Konjugaten (b) zwischen Patienten mit und ohne zirkulierende Mikroembolien und Kontrollen. Die Quadrate und Rauten zeigen die individuellen Messwerte, die horizontale Linie den Median der Messwerte und das graue Rechteck die 5% - 95% Perzentile der Messwerte bei gesunden Kontrollen. MPD: Myeloproliferative Disorders

3.5 Zirkulierende Mikroembolien und klinischer Verlauf

Fünf der Patienten (11,9%) hatten, in den letzten 24 Monaten vor der Untersuchung thromboembolische Ereignisse erlitten (3 Hirninfarkte/ transitorisch ischämische Attacken, 1 Myokardinfarkt und 1 tiefe Beinvenenthrombose (TVT)). Während des Nachuntersuchungszeitraums dieser Studie (Mittelwert $29,7 \pm 7,3$ Monate (Median 30, Spannweite 16,5 - 40,5 Monate)) entwickelten 9 (21,4%) Patienten thromboembolische Komplikationen, darunter 4 zerebrale Ischämien (transitorisch ischämische Attacke oder Hirninfarkt) und 5 TVT.

Insgesamt lag die Rate der thromboembolischen Ereignisse in unserem Patientenkollektiv bei 35,7%. Es wurde jedoch weder ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von MES überhaupt und der Ereignisrate ($p = 0,22$), noch zwischen der Anzahl

der MES pro 30 min und dem Auftreten klinischer Ereignisse gefunden (Spearman $\rho = 0,19$, $p = 0,23$). Auch die Einschränkung der Analyse auf arterielle Thromboembolien (Ereignisrate 19%) ergab keine Assoziation zwischen der Rate von MES pro Zeiteinheit oder dem Auftreten von MES überhaupt und klinischen Ereignissen (Spearman $\rho = 0,12$, $p = 0,35$, Fishers exakter Test $p = 0,40$). Die Häufigkeit MES-positiver Patienten unterschied sich nicht zwischen der Gruppe von Patienten die im Verlauf thromboembolische Ereignisse hatten und der Gruppe von Patienten die asymptomatisch blieben ($p = 0,22$).

3.6 Dopplersonographische Verlaufsuntersuchungen

Bei 6 der 42 Patienten war es möglich eine Verlaufsuntersuchung, z.T. auch nach Änderung der Medikation durchzuführen.

Dabei wurden bei einem Patienten mit essentieller Thrombozythämie, in der Erstuntersuchung (keine Medikation, $591 \times 10^9/l$ Thrombozyten) 108 MES gefunden. In der Verlaufskontrolle unter ASS-Gabe waren bei einer Thrombozytenzahl von $437 \times 10^9/l$ keine MES mehr nachweisbar. Bei einem weiteren Patienten mit essentieller Thrombozythämie erfolgte sogar eine zweite Verlaufskontrolle. Bei diesem Patienten wurden im Rahmen der Erstuntersuchung unter Marcumartherapie 10 MES, in der ersten Verlaufsuntersuchung 4 MES und in der zweiten Verlaufsuntersuchung keine MES detektiert. Anamnestisch sind bei diesem Patienten 2 Hirninfarkte bekannt. Zum Zeitpunkt beider Verlaufsuntersuchungen erhielt der Patient keinerlei Antikoagulation. Die Thrombozytenzahl lag bei allen 3 Untersuchungen in vergleichbar hohen Bereichen ($939 \times 10^9/l$, $939 \times 10^9/l$, $915 \times 10^9/l$). Tabelle 3.3 fasst die Ergebnisse der dopplersonographischen Verlaufsuntersuchungen zusammen.

Pat-Nr.	Geschl.	Alter	Diagnose	Vorerkr.	Verlauf	MES	Thrombozyten	Medikation
1	m	58	CML	0	E	0	844 x10 ⁹ /l	ASS
1	m	58	CML	0	F1 (28 d)	0	698 x10 ⁹ /l	0
2	m	46	ET	HI (2x)	E	10	939 x10 ⁹ /l	Marcumar
2	m	47	ET	HI (2x)	F1 (36 d)	4	939 x10 ⁹ /l	0
2	m	47	ET	HI (2x)	F2 (137 d)	0	915 x10 ⁹ /l	0
3	m	37	ET	0	E	108	591 x10 ⁹ /l	0
3	m	38	ET	0	F1 (173 d)	0	437 x10 ⁹ /l	ASS
4	m	77	ET	0	E	0	574 x10 ⁹ /l	ASS
4	m	77	ET	0	F1 (199 d)	0	543 x10 ⁹ /l	ASS
5	w	84	ET	0	E	2	552 x10 ⁹ /l	0
5	w	84	ET	0	F1 (44 d)	0	648 x10 ⁹ /l	ASS
6	m	71	PVR	TVT	E	0	367 x10 ⁹ /l	ASS
6	m	72	PVR	TVT	F1 (137 d)	0	582 x10 ⁹ /l	0

Tabelle 3.3: Ergebnisse der Verlaufsuntersuchungen mit und ohne Medikation

m: männlich, w: weiblich, CML: chronisch myeloische Leukämie, ET: essentielle Thrombozythämie, PVR: Polyzythämia vera rubra, HI: Hirninfarkt, TVT: tiefe Beinvenenthrombose, E: Erstuntersuchung, F: Folgeuntersuchung (in Klammern Zeit zwischen Erst- und Folgeuntersuchung in Tagen), ASS: Acetylsalicylsäure

4. Diskussion

Die transkranielle Mikroemboliedetektion wird bei den unterschiedlichsten Erkrankungen verwendet, um über das Auftreten mikroembolischer Signale (MES) Rückschlüsse auf das individuelle Risiko möglicher zerebraler Ischämien zu ziehen, so z.B. bei Karotisstenosen, in deren Rahmen das Risiko für das Auftreten thromboembolischer Komplikationen erhöht ist.

Auch viele Erkrankungen aus dem hämato-onkologischen Formenkreis gehen mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten solcher Komplikationen einher. Diese Arbeit konzentrierte sich auf die Untersuchung von Patienten mit myeloproliferativen Syndromen. Myeloproliferative Erkrankungen gehen nachgewiesenermaßen mit einem erhöhten Risiko für hämorrhagische und thromboembolische Komplikationen einher [35; 38; 50; 57; 73]. Es gibt jedoch keine verlässliche Methode um diejenigen Patienten zu identifizieren, die ein besonders hohes Risiko für das Auftreten solcher Komplikationen haben.

Um hierüber Aussagen treffen zu können, wurden in dieser Studie zwei Techniken angewandt: Die Transkranielle Dopplersonographie und, um Rückschlüsse auf den Aktivierungszustand des Gerinnungssystems zu ziehen, die Durchflusszytometrie. Anschliessend wurden die aus beiden Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse korreliert und mit dem klinischen Verlauf verglichen.

Für symptomatische Stenosen der A. carotis interna ist, ebenso wie für symptomatische Stenosen der intrakraniellen Arterien, das Auftreten und die Anzahl von MES ein Surrogatparameter für das Risiko des Auftretens von Schlaganfällen [22; 28; 98]. Auch für asymptomatische Karotisstenosen wurde ein solcher Zusammenhang beschrieben [58; 82]. Die Ergebnisse sind diesbezüglich aber noch widersprüchlich. Obwohl es dafür keinen Beweis gibt, ist es doch hinsichtlich des Pathomechanismus arterieller Embolien sehr wahrscheinlich, dass MES bei diesen Patienten durch zirkulierende Zellaggregate, deren Bildung vermutlich auf die Aktivierung von Thrombozyten zurückgeht, verursacht werden. Unser Ziel war nun herauszufinden, ob diese Zusammenhänge auch auf Patienten mit myeloproliferativen Syndromen zutreffen, auch unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es sich

um klonal gebildete, z.T. funktionsgestörte oder veränderte Blutzellen handelt. Von zusätzlichem Interesse war über die Durchflusszytometrie herauszufinden, aus welchen Blutzellen sich die MES bei diesen Erkrankungen überhaupt zusammensetzen.

4.1 Methodische Aspekte

4.1.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Untersuchung handelt es sich um eine Querschnittsstudie, bei der uns die Patienten aus der Hämatologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums zugewiesen wurden. Das heißt, wir rekrutierten sowohl de novo diagnostizierte Patienten als auch Patienten, die bereits unter Medikation standen. Auf Grund dieses Designs hätten a priori bereits deutliche Gruppenunterschiede auftreten können. Einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Zahl MES-positiver Patienten oder der absoluten Zahl der gemessenen MES in Abhängigkeit von der Medikation konnten wir allerdings nicht feststellen.

Insgesamt konnten 42 Patienten in diese Studie eingeschlossen werden. Legt man Daten aus Untersuchungen an Patienten mit asymptomatischen Karotisstenosen und einer Rate von MES-positiven Patienten von 5 – 10% sowie mit symptomatischen Karotisstenosen und Raten MES-positiver Patienten von 30 – 40% [22] zugrunde, erreicht diese Studie eine Power von 70-80%, um einen relativen Risikoanstieg von 2,0 für thrombembolische Komplikationen bei MES-positiven Patienten gegenüber MES-negativen signifikant auf einem Niveau von 5% nachzuweisen. Da allerdings die Rate an MES-positiven Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen bei Beginn dieser Studie unbekannt war, ließ sich der Fehler 2. Art und damit die Power der Studie a priori nicht abschätzen.

Obwohl bei jedem Patienten eine durchflusszytometrische Untersuchung geplant war, konnte diese aber nur bei 17 (40,5%) Patienten durchgeführt werden, da das Gerät nur an 2 Tagen der Woche zur Verfügung stand und nicht an allen Terminen ein Kollege die Untersuchungen durchführen konnte. Deshalb ist die statistische Aussagekraft dieses Teils der Untersuchung eingeschränkt und es lassen sich entsprechend nur Tendenzen ableiten. Hinsichtlich wichtiger demographischer Daten unterschieden sich die Patienten mit durchflusszytometrischer Untersuchung nicht

von solchen, bei denen die Untersuchung nicht möglich war (Tab. 3.2), so dass davon auszugehen ist, dass die ausgewählte Subgruppe für die Gesamtpopulation repräsentativ ist.

Ein weiterer limitierender Faktor dieser Untersuchung besteht in der nicht konstanten Nachbeobachtungszeit bezüglich klinischer, thromboembolischer Ereignisse. Außerdem ist die Zahl der potentiell zu erfassenden Ereignisse durch die relativ kleine Kohortengröße limitiert, was entsprechend die Aussagekraft der Studie einschränkt.

4.1.2 Dopplersonographische Mikroemboliedetektion

Die Ableitdauer der dopplersonographischen transkraniellen Mikroemboliedetektion im Rahmen dieser Studie betrug 30 Minuten. Laut der Internationalen Consensus Gruppe für transkraniale Mikroemboliedetektion [70] wird dies als die Mindestmessdauer angesehen. Optimalerweise wird eine Messdauer von 60 Minuten angestrebt. Die Studie von Droste und Mitarbeitern [20] zeigte in einer 24-stündigen Ableitung, im Gegensatz zu häufiger auftretenden 30-minütigen MES-freien Episoden, nur einmal ein 60-minütiges Intervall, in dem bei einem MES-positiven Patienten keine MES nachgewiesen werden konnten, sodass diese Messdauer als zuverlässig angesehen werden kann.

Diese Messdauer konnte jedoch aufgrund von eingeschränkter Compliance bei dem hier untersuchten chronisch kranken Patientenkollektiv nicht eingehalten werden. Es ist möglich, dass durch die kürzere Messdauer einige Patienten fälschlicherweise als MES-negativ eingestuft wurden. Jedoch ist es, wie auch die Verlaufuntersuchungen, die bei 6 Patienten im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführt werden konnten, zeigten, möglich, dass bei MES-positiven Patienten, bei unveränderter Therapie, an manchen Tagen keine MES nachweisbar sind, sodass, trotz des rein anekdotischen Charakters der hier erhobenen Beobachtungen, davon ausgegangen werden kann, dass unabhängig von der Ableitdauer der einzelnen Untersuchung ein Restrisiko bleibt, einen MES-positiven Patienten nicht als solchen zu identifizieren.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde das Strömungsspektrum der A. cerebri media bei den einzelnen Probanden jeweils einseitig abgeleitet. Für manche Fragestellungen werden simultane oder bidirektionale Ableitungen empfohlen. Bei einer simultanen Ableitung der rechten und linken Arteria media wäre z.B. im Falle

eines nur einseitigen Nachweis von MES eine Aussage über Art und Lokalisation der Emboliequelle möglich. Da aber bei Patienten mit myeloproliferativen Syndromen von einer systemischen Aktivierung des Gerinnungssystems ausgegangen wird, vermutet man eine seitengleiche Verteilung der darunter entstehenden MES, sodass von einer beidseitigen simultan durchgeführten Ableitung für die Fragestellung dieser Studie, kein Informationsgewinn zu erwarten gewesen wäre. Darüber hinaus wurden Patienten mit hochgradigen Karotisstenosen ausgeschlossen, die eine Quelle unilateraler MES hätten darstellen können.

Anders ist die Zweitor-Ableitung zu werten, bei der ein Gefäß über zwei Sonden in jeweils unterschiedlicher Tiefe untersucht wird, wodurch „echte“ Embolien, die mit dem Blutstrom weitergeleitet werden und dadurch zweizeitig Signale auslösen, besser von Artefakten unterschieden werden können, die nur ein Signal verursachen. Es ist möglich, dass, bei der hier durchgeführten einseitigen Ableitung einige Artefakte fälschlicherweise als MES klassifiziert worden sein könnten, dieses Risiko ist jedoch hinsichtlich der guten Übereinstimmung der beiden geblindeten, erfahrenen Untersucher (Korrelationskoeffizient in Klassen 0,67), durch welche die Auswertung erfolgte, als gering einzustufen.

4.2. Zirkulierende Mikroembolien und klinische Parameter

4.2.1 Thromboembolische Komplikationen

Trotz einer hohen Anzahl von thromboembolischen Komplikationen und eines hohen Anteils MES-positiver Patienten (35,7%) innerhalb unserer Kohorte, konnte für diese Patienten kein prognostischer Zusammenhang zwischen dem Auftreten von MES und der Entwicklung thromboembolischer Erkrankungen festgestellt werden. Es zeigte sich zwar eine Tendenz für ein vermehrtes Auftreten von MES im Zusammenhang mit MPS der roten Zellreihen (PVR und ET), die auch klinisch die höchste Rate thromboembolischer Komplikationen aufweisen, jedoch ohne signifikanten Unterschied zu Patienten mit CML und UMS. In dieser Studie zeigte sich, dass das Auftreten von MES unabhängig von der Thrombozytenzahl ist, was auch der klinischen Beobachtung entspricht, dass die absolute Thrombozytenzahl ein schlechter Prediktor thromboembolischer Komplikationen ist [65; 72; 102].

Da nur wenige Patienten im Verlauf nachuntersucht werden konnten und letztlich kein Patient im engen Zusammenhang mit einem thromboembolischen Ereignis, können wir nicht ausschließen, dass die Zahl der MES und auch die MES-Positivität bzw. –Negativität Schwankungen unterliegt. Möglicherweise sind die MES-Zahlen in engem Zusammenhang mit einem thromboembolischem Ereignis erhöht, was wir nicht erfassen konnten. Zumindest konnten wir an Hand einer einzigen Messung keinen Zusammenhang mit klinischen Ereignissen herstellen.

4.2.2 Medikation

Überraschenderweise waren Vorhandensein und Anzahl der MES, ebenfalls unabhängig von der Gabe thrombozytenaggregationshemmender Medikamente wie Acetylsalicylsäure oder Pyridinen. Dies ist vermutlich dadurch bedingt, dass die über P-Selektin vermittelte Bindung von Thrombozyten an Leukozyten, die bei der Entstehung von MES bei MPS-Patienten eine Rolle zu spielen scheint, nicht, oder nicht vollständig, durch Acetylsalicylsäure (Hemmung der Cyclooxygenase) oder Pyridine (Hemmung des ADP-Rezeptors) gehemmt wird.

Eine pharmakologische Hemmung der P-Selektin-vermittelten inflammatorischen und koagulatorischen Wirkung ist derzeit im klinischen Alltag noch nicht standardmässig möglich und Bedarf weiterer Studien [1; 60; 62].

4.3 Zirkulierende Mikroembolien und Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Man vermutet, dass die Entstehung von Thromboembolien bei Patienten mit MPS auf qualitative und quantitative Abnormalitäten der Thrombozyten zurückzuführen sind, der genaue Mechanismus ist nicht bekannt. Die Tatsache, dass die Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern das Auftreten klinischer vaskulärer Komplikationen reduziert [46], führte jedoch zu der Annahme, dass bei diesen Erkrankungen eine Thrombozytenhyperaggregabilität vorliegt.

Thrombozyten zirkulieren normalerweise in einem inaktiven Funktionszustand durch den Körper und werden erst durch das Vorhandensein von Agonisten (z.B. Thrombin, ADP, Kollagen) aktiviert. Erst dann heften sie sich auf verletzte Stellen der Gefässwände und initiieren die Bildung eines den Defekt verschliessenden Koagels.

An diesem Prozess sind jedoch außer den Thrombozyten auch membrangebundene, also endotheliale Faktoren beteiligt.

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Versuche unternommen die aktivierten, d.h. „klebrigen“ Thrombozyten im Patientenblut aufzuspüren, um so Risikopatienten zu identifizieren [49]. Studien, die die traditionelle Thrombozyten-Aggregometrie (turbimetrisches Verfahren nach Born [29]) verwendeten, kamen diesbezüglich zu kontroversen Ergebnissen. Während in einigen Untersuchungen eine Thrombozytenhyperreagibilität nachgewiesen wurde [89; 95], konnte dies in anderen Studien nicht nachgewiesen werden [23]. Manoharan et al. [50] legten 1999 in ihrer Arbeit sogar nahe, dass die ebenfalls im Rahmen dieser Erkrankungen auftretende Thrombozytenhypoaggregabilität sogar noch eher zu Thrombosen führen könnte, als eine normale Thrombozytenfunktion.

Eine frühere Studie aus der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. med. Matzdorff zeigte ein vermehrtes Auftreten von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten bei MPS-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen [94]. Sowohl Thrombo- als auch Leukozyten verfügen über Membranrezeptoren, die die Bindung dieser Zellen aneinander vermitteln. Einer dieser Rezeptoren ist das P-Selektin (CD 62p), das auch als Marker für die Thrombozytenaktivität dient [2; 24]. Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen sind Teil der vaskulären Gerinnung. Bei einigen Patienten mit zerebrovaskulären Ischämien fanden sich überdurchschnittlich viele Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate [55].

In der vorliegenden Studie war die Zahl der aktivierten, d.h. CD62p-positiven Thrombozyten bei MPS-Patienten mit MES im Vergleich mit MES-negativen MPS-Patienten, nur leichtgradig erhöht.

Auch fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von MES und dem Vorhandensein zirkulierender Thrombozytenaggregate, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass zum Zeitpunkt der Untersuchung fast die Hälfte der Patienten mit Acetylsalicylsäure behandelt wurden, wodurch die Thrombozytenaggregationsfähigkeit gehemmt wird.

Die Zahl der Mikropartikel war in der Gruppe der MES-negativen Probanden erhöht, während diese bei MES-positiven Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen im Normbereich lagen.

Bei Mikropartikeln handelt es sich um kleinste Phospholipidpartikel, die aus den Membranen aktivierter Thrombozyten freigesetzt werden und u.a. die Aktivierung plasmatischer Gerinnungsfaktoren unterstützen [101]. Mikropartikel sind also einerseits ein Marker für den Aktivierungszustand der Thrombozyten, nehmen andererseits aber auch aktiv am Gerinnungsprozess teil [41]. Mikropartikel können über den CD62p-Rezeptor auch an Leukozyten binden [42].

Diese Theorie lässt sich durch den starken Trend zum vermehrten Auftreten von Thrombozyten-Neutrophilen und Thrombozyten-Monozyten Aggregaten bei MES-positiven MPS-Patienten stützen. Zudem wird die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten Aggregaten nicht durch Acetylsalicylsäure beeinflusst [76], was erklären könnte, warum der Anstieg von Thrombozyten-Leukozyten Aggregaten bei MES-positiven MPS-Patienten wesentlich deutlicher ist, als der Anstieg aktivierter (CD62p-positiver) Thrombozyten und warum sich kein Zusammenhang mit der Einnahme aggregationshemmender Medikamente feststellen lässt.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie lassen vermuten, dass MES bei MPS-Patienten mit dem Auftreten von Thrombozyten-Neutrophilen- oder Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten assoziiert sind. Es bleibt allerdings spekulativ, ob diese Aggregate tatsächlich eine Grösse erreichen, die im TCD detektierbar ist. Auch wissen wir nicht, ob im Rahmen der klonalen Hämatopoese bei myeloproliferativen Syndromen funktionsgestörte Leukozyten mit einer erhöhten Affinität zu Thrombozyten oder Thrombozyten mit einer erhöhten Expressionsrate des leukozytenbindenden Rezeptors CD62p produziert werden. Es ist ebenso möglich, dass die Änderungen der Gerinnungsparameter und Zellfunktionen bei myeloproliferativen Erkrankungen auf einen übergeordneten, bislang noch unentdeckten, Mechanismus zurückzuführen sind.

Obwohl wir davon ausgehen, dass sowohl das Auftreten von MES als auch das von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten bei MPS-Patienten als Marker für eine erhöhte Gerinnungsaktivität gewertet werden können, sind diese ohne prognostische Signifikanz bezüglich des Auftretens zerebraler thromboembolischer Komplikationen und können daher nicht als Screeningmethode empfohlen werden.

5. Zusammenfassung / Summary

5.1 Zusammenfassung

Myeloproliferative Syndrome (MPS) gehen mit einem erhöhten Thromboembolierisiko einher. Ziel dieser Studie war es, den prognostischen Wert der Mikroemboliedetektion hinsichtlich des Auftretens klinischer Ereignisse zu untersuchen. Weiter sollte geprüft werden, ob es zwischen den detektierten Mikroembolien, Parametern des Blutbildes und den Ergebnissen der Thrombozyten-Durchflusszytometrie einen Zusammenhang gibt, aus dem sich Rückschlüsse auf die Zusammensetzung zirkulierender Mikroembolien (Microembolic signals, MES) bei diesen Patienten ziehen lassen. Dazu wurde in einer Kohorte von 42 Patienten mit myeloproliferativen Syndromen einmalig eine transkranielle Doppleruntersuchung mit Mikroemboliedetektion durchgeführt und die Ergebnisse mit den über einen Beobachtungszeitraum von 29,7 +/- 7,3 Monaten auftretenden thromboembolischen Ereignissen korreliert. Bei allen Patienten wurde am Tag der Untersuchung eine Blutbilduntersuchung und bei 17 Patienten eine Thrombozyten-Durchflusszytometrie durchgeführt.

Bei 15 der 42 Patienten (35,7%) wurden MES registriert, es konnte jedoch keinerlei Zusammenhang mit dem MPS-Typ, den Parametern des Blutbilds oder dem Auftreten von thromboembolischen Ereignissen (bei 9 von 42 Patienten; 21,4%) hergestellt werden. MES-positive und -negative Patienten unterschieden sich auch nicht hinsichtlich der Verteilung von aktivierten Thrombozyten, Thrombozyten-Mikroaggregaten oder Mikropartikeln. Es zeigte sich jedoch ein starker Trend für das vermehrte Auftreten von Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregaten bei MES-positiven Patienten ($p = 0,09$).

Insgesamt zeigte sich, dass die einmalige Emboliedetektion mittels transkraniellem Doppler bei Patienten mit MPS noch keinen prognostischen Wert besitzt. Hinsichtlich der Zusammensetzung der MES lassen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie vermuten, dass diese bei MPS-Patienten überwiegend aus Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregaten bestehen könnten.

5.2 Summary

Myeloproliferative disorders (MPD) are associated with an increased risk for thrombembolic events. In this study we examined the prognostic value of transcranial doppler (TCD) microemboli detection regarding clinical events and correlated TCD findings with results of blood cell counts and platelet flow cytometry to gain insight into the composition of circulating microemboli in these patients.

In a cohort of 42 patients with MPD TCD microemboli detection was performed on a single occasion and correlated with thrombembolic events during a prospective follow-up of 29.7 +/- 7.3 months. In all patients a complete blood cell count and in 17 patients platelet flow cytometry were performed on the day of the TCD examination.

Microembolic signals (MES) were recorded in 15 (35.7%) patients, however, without any correlation with the type of MPD, blood cell count, or thrombembolic events (9 (21.4%)). MES positive and negative patients did not differ regarding the levels of activated platelets, platelet microaggregates, or microparticles. We found a strong trend for higher rates of platelet-neutrophil conjugates in MES positive patients ($p = 0.09$).

In conclusion we found that detection of MES by TCD in MPD patients on a single occasion has no prognostic value. MES do not correlate with the type of MPD, nor blood cell counts or clinical events. Flow cytometry suggests that MES in MPD may primarily consist of platelet-neutrophil aggregates.

6. Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Studie wurden als Originalarbeit im European Journal of Neurology veröffentlicht:

Weber CA, Matzdorff A, Gerriets T, Villmow T, Stolz E. Circulating microemboli in patients with myeloproliferative disorders. Eur J Neurol 2007; 14(2): 199-205

Als Kongressabstract erschienen die Ergebnisse in Cerebrovascular Diseases:

Weber CA, Matzdorff A, Villmow T, Kaps M, Stolz E. Microembolic signals in patients with hematological disorders. Cerebrovasc Dis 2003; 16(suppl. 2): 38

Die Ergebnisse wurden ebenfalls als Vortrag auf dem 8th Meeting of the European Society of Neurosonology and Cerebral Hemodynamics (18.05. - 21.05.2003) in Alicante (Spanien) vorgestellt:

Weber CA, Matzdorff A, Villmow T, Kaps M, Stolz E. Microembolic signals in patients with hematological disorders.

7. Literaturverzeichnis

1. Abou-Saleh H, Theoret JF, Yacoub D, Merhi Y. Neutrophil p-selectin-glycoprotein-ligand-1 binding to platelet p-selectin enhances metalloproteinase 2 secretion and platelet-neutrophil aggregation. *Thromb Haemost.* 2005; 94:1230-5.
2. André P. P-selectin in haemostasis. *Br J Haematol* 2004; 126:298-306
3. Aronow HD, Shishehbor M, Davis DA, Catsan I, Bhatt D, Beajzer C, Abou-Cheble A, Derk K, Whitlow P, Yadav J. Leukocyte count predicts microembolic doppler signals during carotid stenting, A link between inflammation and embolization. *Stroke* 2005; 36:1919-1914
4. Barbui T, Barosi G, Grossi A, Gugliotta L, Liberato LN, Marchetti M, Mazzucconi MG, Rodghiero F, Tura S. Practice guidelines for the therapy of essential thrombocythemia. A statement from the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Haematologica* 2004; 89:215-232
5. Blaser T, Krueger S, Kross R, Franke A, Wieker K, Goertler M. Acetylsalicylic acid induced cessation of transient ischaemic attacks and microembolic signals detected by transcranial Doppler in a patient with essential thrombocythaemia. *J Neurol*, 2001; 248:67-68
6. Bunescu A, Lundahl J, Söderström T, Lindahl T. Evaluation of platelet function by flow cytometric measurement of ligand binding. *Platelets* 1995; 6:340-345
7. Cahill MR, Macey MG, Newland AC. Correlation of GP53 and p-selectin expression in myeloproliferative disorders and normal controls. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; 7:169-71
8. Carulli G, Minnucci S, Gianfaldoni ML. Interactions between platelets and neutrophils in essential thrombocythaemia. Effects on neutrophil chemiluminescence and superoxide anion generation. *Eur J Clin Inv* 1995; 25:929-934
9. Cheng CK, Chan J, Cembrowski GS, van Assendelft OW. Complete blood count reference interval diagrams derived from NHANES III: stratification by age, sex and race. *Lab Hematol* 2004; 10:42-53

10. Cherian P, Hankey GJ, Eikelboom JW, Thom J, Baker RI, McQuillan A, Staton J, Yi Q. Endothelial and Platelet Activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes. *Stroke* 2003; 34:2132-2137
11. Consensus Committee of the Ninth International Cerebral Hemodynamic Symposium. Basic Identification Criteria of Doppler Microembolic Signals. *Stroke* 1995; 26:1123
12. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, Vestri O. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med* 1995; 332:1132-1136
13. Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, D'Emilio A, Rodeghiero F, Barbui T. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 1990; 8:556-562
14. Crawford N. The presence of contractile proteins in platelet microparticles isolated from human and animal platelet-free plasma. *Br J Haematol* 1971; 21:53-69
15. De Gaetano G, Cerletti C, Evangelista V. Recent advances in platelet-polymorphonuclear leukocyte interaction. *Haemostasis* 1999; 29:41-9
16. Doll DC, Greenberg BR. Cerebral thrombosis in smokers polycythemia. *Ann Intern Med* 1985 Jun; 102:786-7
17. Droste DW. Mikroemboliedetektion in Kaps M, von Reuteren GM, Stolz E, von Büdingen HJ (Herausgeber) *Ultraschall in der Neurologie*. 2.korrigierte Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, New York; 203-209
18. Droste D.W, Hagedorn G, Nötzold A, Siemens HJ, Sievers HH, Kaps M. Bigated transcranial Doppler for the detection of clinically silent circulating emboli in normal persons and patients with prosthetic cardiac valves. *Stroke* 1997; 28:2453-6
19. Droste DW, Markus HS, Nassiri D, Brown MM. The effect of velocity on the appearance of embolic signals studied in transcranial Doppler models. *Stroke* 1994; 25:986-991
20. Droste DW, Decker W, Siemens HJ, Kaps M, Schulte-Altendorneburg G. Variability in occurrence of embolic signals in long term transcranial Doppler recordings. *Neurol. Res* 1996 Feb; 18(1):25-30
21. Droste DW, Ringelstein EB. Detection of high intensity transient signals (HITS): How and why? *Eur J Ultrasound* 1998; 7:23-29

22. Droste DW, Dittrich R, Kemeny V, Schulte-Altendorneburg G, Ringelstein EB. Prevalence and frequency of microembolic signals in 105 patients with extracranial carotis artery occlusive disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 67:525-528
23. Elliot MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 2005; 128:275-290
24. Elwood PC, Beswick A, Pickering J, McCarron P, O'Brien JR, Rnaud SR, Flower RJ. Platelet tests in the prediction of myocardial infarction and ischaemic stroke: evidence from the Caerphilly Prospective Study. *Br J Haematol* 2001; 113:514-520
25. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, Vignoli A, Licini M, Balicco M, Manarini S, Finazzi G, Cerletti C, Barbui T. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2000;96:4261-6
26. Fromm A. Durchflußzytometrie thrombozytärer Oberflächenantigene: Änderungen im Langzeitverlauf in einer Population gesunder Erwachsener. Dissertation Justus-Liebig-Universität Gießen 2005
27. Galli M, Grassi A, Barbui T. Platelet-derived microvesicles in thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uremic syndrome. *Thromb Haemost* 1996; 75:427-431
28. Gao S, Wong KS, Hansberg T, Lam WWM, Droste DW, Ringelstein EB. Microembolic signal predicts recurrent cerebral ischemic events in acute stroke patients with cerebral artery stenosis. *Stroke* 2004; 35:2832-2836
29. Gawaz M. Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung, Thieme-Verlag Stuttgart, New York
30. George JN, Lewis PC, Sears DA. Studies on platelet plasma membranes.II. characterization of surface proteins of rabbit platelets in vitro and during circulation in vivo using diazotized [¹²⁵I] diiodosulfanilic acid as a label. *J Lab Clin Med* 1976; 88:247-260
31. Georgiadis D, Lindner A, Manz M, Sonntag M, Zunker P, Zerkowski HR, Borggrefe M. Intracranial microembolic signals in 500 patients with potential cardiac or carotid embolic source and in normal controls, *Stroke* 1997; 28:1203-1207

32. Goertler M, Bauemer M, Kross R, Blaser T, Lutze G. Rapid decline of cerebral microemboli of arterial origin after intravenous acetylsalicylic acid. *Stroke* 1999; 30:66-69
33. Goertler M, Blaser T, Krueger S, Lutze G. Acetylsalicylic acid and microembolic events detected by transcranial Doppler in symptomatic arterial stenoses. *Cerebrovasc Dis* 2001; 11:324-329
34. Griesshammer M, Beneke H, Nussbauerm B, Grünwald M, Bangerter M, Bergmann L. Increased platelet surface expression of p-selectin and thrombospondin as markers of platelet activation in essential thrombocthaemia. *Thromb Res* 1999; 96:191-6
35. Grotta JC, Manner C, Pettigrew C. Red Blood Cell Disorders and stroke. *Stroke* 1986; 17:811-817
36. Gruppo Italiano Studio Policitemia. Polycythemia vera:the natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Ann Intern Med* 1995; 123:656-664
37. Harrison CN, Gale RE, Machin SJ, Linch DC. A large proportion of patients with a diagnosis of Essential Thrombocythemia do not have a clonal disorder and may be at lower risk of thrombotic complications. *Blood* 1999; 93:417-424
38. Hart RG, Kanter MC. Hematologic Disorders and Ischemic Stroke. A selective review. *Stroke* 1990; 21:1111-1121
39. Hertzberg MS, Mammen J, McCraw A, Nair SC, Srivastava A. Achieving an maintaining quality in the laboratory. *Haemophilia*, 2006 Jul 12; Suppl 3:61-7
40. Jabaily J, Iland H, Laszlo J, Massey EM. Neurologic manifestations of Essential Thrombozythemia. *Ann Intern Med*.1983; 99:513-518
41. Jy W, Mao WW, Horstman L, Tap J, Ahn YS. Platelet microparticles bind, activated and aggegate neutrophils in vitro. *Blood Cells Mol Dis* 1995; 21:217-231
42. Jy W, Horstman LL, Park H, Mao WW, Valant P. Platelet aggregates as markers of platelet activation: Characterization of a flow cytometric method suitable for clinical applications. *Am J Hematol* 1998; 57:33-42
43. Kaps M, Hansen J, Weiher M, Tiffert K, Kayser I, Droste DW. Clinically silent microemboli in patients with artificial prosthetic aortic valves are predominantly gaseous and not solid. *Stroke* 1997; 28:322-5
44. Khairy M, Lasne M, Brohard-Bohn B, Aiach M, Rendu F, Bacelaot-Loza C. A new approach in the study of the molecular and cellular events implicated in

- heparin-induced thrombocytopenia. Formation of leukocyte-platelet aggregates. *Thromb Haemost* 2001; 85:1090-6
45. Kron J, Hamper UM, Petri M. Prevalence of cerebral microemboli in systemic lupus erythematosus:transcranial Doppler. *J Rheumatol* 2001; 28:2222-2225
 46. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, Barbui T. European Collaboration on low-dose Aspirin in Polycythemia Vera Investigators. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med* 2004; 350:114-124
 47. Lefer AM, Weyrich AS, Buerke M. Role of selectins, a new family of adhesion molecules, in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1994; 28:289-294
 48. Libeer JC, Baadenhuijsen H, Fraser CG, Petersen PH, Ricos C, Stockl D, Thienpont L. Characterization and classification of external quality assessment schemes (EQA) according to objectives such as evaluation of method and participant bias and standarddeviation. External Quality Assessment (EQA) Working Group A on Analytical Goals in Laboratory Medicine. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34:665-78
 49. Mammen EF. Ten years experience with the "sticky platelet syndrome". *Clin Appl Thrombosis Hemostasis* 1995; 1:66-72
 50. Manoharan A, Gemmel R, Brighton T. Thrombosis and Bleeding in myeloproliferative disorders:identification of at-risk patients with whole blood platelet aggregation studies. *Br J Haematology* 1999; 105:618-625
 51. Markus HS, Brown MM. Differentiation between different pathological cerebral embolic materials using transcranial Doppler in an in vitro model. *Stroke* 1993;24:1-5
 52. Markus HS, Loh A, Brown MM. Detection of circulatory cerebral emboli using Doppler ultrasound in a sheep model. *J Neurol Sci* 1994; 122:117-124
 53. Markus HS, Thomson ND, Brown MM. Asymptomatic cerebral embolic signals in symptomatic and asymptomatic carotid artery disease. *Brain* 1995; 118:1005-1011
 54. Marti GE, Magruder L, Schuette WE, Gralnick HR. Flow cytometric analysis of platelet surface antigens. *Cytometry* 1988; 9:448-455
 55. McCabe DJH, Harrison P, Mackie IJ, Sidhu PS, Purdy G, Lawrie AS, Watt H, Brown MM, Machin SJ. Platelet degranulation and monocyte - platelet complex formation are increased in the acute and convalescent phases after

- ischaemic stroke or transient ischaemic attack. *Br J Haematol* 2004; 125:777-787
56. Michiels JJ, Abels J, Steketee J. Erythromyalgia caused by platelet-mediated arteriolar inflammation and thrombosis in thrombocythemia. *Ann Intern Med* 1985; 102:466-471
 57. Michiels JJ, Koudstaal PJ, Mulder AH. Transient neurologic and ocular manifestations in primary thrombocythemia. *Neurology* 1993; 43:1107-1110
 58. Molloy J, Markus HS. Asymptomatic embolization predicts stroke and TIA risk in patients with carotid artery stenosis. *Stroke* 1999; 30:1440-1443
 59. Murphy S, Illand H, Rosenthal D, Laszlo J. Essential Thrombocythemia: an interim report from the Polycythemia Vera Study Group. *Semin Hematol* 1986; 23:177-182
 60. Myers DD Jr, Rectenwald JE, Bedard PW, Kaila N, Shaw GD, Schaub RG, Farris DM, Hawley AE, Wroblewski SK, Henke PK, Wakefield TW. Decreased venous thrombosis with an oral inhibitor of P-selectin. *J Vasc Surg* 2005; 42:329-36.
 61. Nötzold A, Droste DW, Hagedorn G, Berndt S, Kaps M, Graf B, Sievers HH (1997) Circulating microemboli in patients after aortic valve replacement using pulmonary autografts and mechanical valve prostheses. *Circulation* 1997; 96:1843-1846
 62. Park JB. Caffeodymine from Cocoa has COX inhibitory activity suppressing the expression of a platelet activation marker, P-selectin., *J Agric Food Chem.* 2007; 55:2171-5
 63. Rapp JH, Pan XM, Sharp FR, Shah DM, Wille GA, Velez PM, Troyer A, Higashida RT, Saloner D. Artheroemboli to the brain: size threshold for causing acute neuronal cell death. *J Vasc Surg* 2000; 32:68-76
 64. Ravandi-Kashani F, Cortes J, Talpaz M, Kantarjian HM. Thrombotic microangiopathy associated with interferon therapy for patients with chronic myelogenous leukemia: coincidence or true side effect? *Cancer* 1999; 85:2583-8
 65. Redlich H, Vickers J, Lösche W, Heptinstall S, Kehrel B, Spangenberg P. Formation of platelet-leukocyte conjugates in whole blood. *Platelets* 1997; 8:419-25

66. Regev A, Stark P, Blickstein D, Lahav M. Thrombotic Complications in Essential Thrombozythemia with relatively low platelet counts. *Am J Hematol* 1997; 56:168-172
67. Reinecke H, Nabavi DG, Allroggen A, Droste DW, Breithardt G, Ringelstein EB. Detektion zirkulierender cerebraler Mikroemboli mittels transkranieller Dopplersonographie. *Z Kardiol* 2001; 90:43-51
68. Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in Laboratorien, Stand Oktober 1987; *Dt Ärztebl* 1988; 85:C-449-C-464
69. Ries S, Schminke U, Daffertshofer M, Hennerici M. High intensity transient signals (HITS) in patients with carotid artery disease. *Eur J Res* 1996; 1:328-330
70. Ringelstein EB, Droste DW, Babikian VL, Evans DH, Grosset DG, Kaps M, Markus HS, Russel D, Siebler M. Consensus on microembolus detection by TCD. *Stroke* 1998; 28:725-729
71. Rothwell PM, Gibson R, Warlow CP. Interrelation between plaque surface morphology and degree of stenosis on carotid angiograms and the risk of ischemic stroke in patients with symptomatic carotid stenosis. *European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. Stroke* 2000; 31:615-621
72. Russel D, Madden KP, Clark WM, Sandset PM, Zivin JA. Detection of arterial emboli using Doppler ultrasound in rabbits. *Stroke* 1991; 22:253-8
73. Schafer AI. Bleeding and Thrombosis in the myeloproliferative disorders. *Blood* 1984; 64:1-12
74. Schönburg M, Baer J, Schwarz N, Stolz E, Kaps M, Bachmann G, Gerriets T. EmboDop: insufficient automatic microemboli identification. *Stroke* 2006; 37:342-3
75. Segura T, Serena J, Teruel J, Davalos A. Cerebral embolism in a patient with polycythemia rubra vera. *Eur J Neurol* 2000; 7:87-90
76. Serebruany VL, Malinin AI, Ziai W, Pokov AN, Bhatt DL, Alberts MJ, Hanley DF. Effect of clopidogrel and aspirin in combination versus aspirin alone on platelet activation and major receptor expression in patients after recent ischemic stroke: for the Plavix Use for Treatment of Stroke (PLUTO-Stroke) trial. *Stroke* 2005; 36:2289-2292

77. Shamma F, Meyer P, Heikkila R, Apeland T, Goranseson L, Berland J, Kjellevoid K. Thrombotic microangiopathy in a patient with chronic myelogenous leukemia on hydroxyurea. *Acta Haematol* 1997; 97(3):184-6
78. Siebler M, Kleinschmidt A, Sitzler M, Steinmetz H, Freund HJ. Cerebral microembolism in symptomatic and asymptomatic high-grade internal carotid artery stenosis. *Neurology* 1994; 44:615-618
79. Singh N, Gemmell CH, Daly PA, Yeo EL. Elevated platelet-derived microparticle levels during unstable angina. *Can J Cardiol* 1995; 11:1015-1021
80. Sitzler M, Sohngen D, Siebler M, Specker C, Rademacher J, Janda I, Aulich A, Steinmetz H (1995) Cerebral microembolism in patients with Sneddon's syndrome. *Arch Neurol* 1995; 52:2184-2186
81. Sliwka U, Diehl RR, Noth J. Bedeutung sogenannter "High- Intensity Transient Signals" (HITS) während der transkraniellen Dopplersonographie. *Deutsch Med Wochenschr* 1995; 120:1667-1670
82. Spence JD, Tamayo A, Lownie SP, Ng WP, Fergusson GG. Absence of microemboli on transcranial Doppler identifies low-risk patients with asymptomatic carotid stenosis. *Stroke* 2005; 36:2373-2378
83. Spencer MP. Transcranial Doppler monitoring and causes of stroke from carotid endarterectomy. *Stroke* 1997; 28:1324-1327
84. Spencer MP, Campell SD, Sealy JL, Henry FC. Experiments on decompression bubbles in the circulation using ultrasonic and electromagnetic flowmeters. *J Occup Med* 1969; 11:238-247
85. Spencer MP, Thomas GI, Nicholls SC, Sauvage R. Detection of middle cerebral artery emboli during carotid endarterectomy using transcranial Doppler ultrasonography. *Stroke* 1990; 21:415-423
86. Spivak JL, Barosi G, Barbatui T, Finazzi T, Marchioli R, Marchetti M. Chronic myeloproliferative disorders. *Hematology* 2003; 1:200-224
87. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins vascular adhesion molecules. *FASEB J* 1995; 9:866-873
88. Tong DC, Bolger A, Albers GW. Incidence of transcranial Doppler-detected cerebral microemboli in patients referred for echocardiography. *Stroke* 1994; 25:2138-2141

89. Trip MD, Cats VM, van Capelle FLJ, Vreeken J. Platelet hyperreactivity and prognosis in survivors of myocardial infarction *N Engl J Med* 1990; 323:1549-1554
90. Van Dilla MA, Melamed MR, Derman H. Cell microfluorimetry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science* 1969; 163:1213-1214
91. van Genderen PJJ, Michiels J. Erythromyalgia: a pathognomonic microvascular thrombotic complication in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Semin Thromb Hemost* 1997; 23:357-363
92. van Genderen PJJ, Prins FJ, Michiels JJ. Thromboxane-dependent platelet activation in vivo precedes arterial thrombosis in thrombocythaemia: a rationale for the use of low-dose aspirin as an antithrombotic agent. *Br J Haematol* 1999; 104:438-441
93. van Genderen PJJ, Mulder PGH, Waleboer M. Prevention and treatment of thrombotic complications in essential thrombocythaemia: efficacy and safety of aspirin. *Br J Haem* 1997; 97:179-184 95.
94. Villmow T, Kemkes-Matthes B, Matzdorff AC. Markers of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in patients with myeloproliferative syndroms. *Thrombosis Research* 2003; 108:139-145
95. Weber M, Gerdson F, Gutensohn K, Schoder V, Eifrig B, Hossfeld DK. Enhanced platelet aggregation with TRAP-6 and collagen in platelet aggregometry in patients with venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2002; 107:325-328
96. Wehmeier A, Südhoff T, Meierkord F. Relation of platelet abnormalities to thrombosis and hemorrhage in chronic myeloproliferative disorders. *Semin Thromb Hemost* 1997; 23:391-402
97. Wehmeier A, Tschöpe D, Esser J, Menzel C, Nieuwenhuis HK, Schneider W. Circulating activated platelets in myeloproliferative disorders. *Thromb Res* 1991; 61:271-8
98. Wehmeier A, Daum I, Jamin H, Schneider W. Incidence and clinical risk factors for bleeding and thrombotic complications in myeloproliferative disorders. A retrospective analysis of 260 patients. *Ann Hematol* 1991; 63:101-106

99. Wehmeier A, Fricke S, Scharf RE, Schneider W. A prospective study of haemostatic parameters in relation to the clinical course of myeloproliferative disorders. *Eur J Haematology* 1990;45:191-197
100. Wehmeier A, Schneider W. Megacaryocytes and platelets as the main cause for vascular events in chronic myeloproliferative disorders. *Hämostaseologie* 1996; 16:151-63
101. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 1967; 13:269-288
102. Wu KK. Platelet hyperaggregability and thrombosis in patients with thrombocythemia. *Ann Intern Med* 1978; 88:7-11
103. Wu KK, Hoak JC. A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency. *Lancet* 1976; ii:924-927

8. Abkürzungsverzeichnis

A

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACI	Arteria carotis interna
ACM	Arteria cerebri media
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ASS	Acetylsalicylsäure

C

CD	Cluster of differentiation
CML	Chronisch Myeloische Leukämie

D

DAT	Digital Audio Tape
dB	Dezibel
DFZ	Durchflußzytometrie

E

E	Erstuntersuchung
ET	Essentielle Thrombozythämie

F

F	Folgeuntersuchung
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflußzytometrie)
FT	Fourier Transform

FFT	Fast Fourier Transform
FITS	Fluoresceinisothyocyanat
FSC	Forward Scatter

G

GP	Glykoprotein
----	--------------

H

HI	Hirnfarkt
HITS	High Intensity Transient Signal

K

kHz	Kilohertz
-----	-----------

M

ME	Mikroembolie
MES	Microembolic Signal, mikroembolische Signale
MHz	Megahertz
MPD	Myeloproliferative Disorders
MPS	Myeloproliferative(s) Syndrom(e)

P

PVR	Polycythaemia vera rubra
-----	--------------------------

S

SSC	Side Scatter
-----	--------------

T

Tab.	Tabelle
TCD	Transcranial Doppler Sonography, transkranielle Dopplersonographie
TIA	Transitorisch Ischämische Attacke
TVT	Tiefe Venenthrombose

U

UMS	Unklassifiziert myeloproliferative Syndrome
-----	---

V

VWI	Vorderwandinfarkt
-----	-------------------

10. Danksagung

Ein besonderer Dank geht an PD Dr. med. Erwin Stolz, meinen Doktorvater, für seinen fachlichen Rat und seine Geduld.

Desweiteren danke ich PD Dr. med. A. Matzdorf, Prof. Dr. med. M. Kaps, Dr. med. T. Gerriets, Prof. Dr. med. H. Pralle, den Ärzten und Schwestern der hämatologischen Ambulanz, Dr. med. Torben Villmow, Dr. med. Annette Fromm, Fr. U. Reiz und Fr. H. Reckhaus vom Ultraschalllabor sowie den Schwestern der neurolog. Poliklinik für die Unterstützung der organisatorischen Abläufe durch gute, unkomplizierte Zusammenarbeit.

Meinen Freunden Katharina Waelsch, Christine Aldinger, Boris Langer, Gudrun Duscha, Nils Dümmer, Cornelia Hegel und Thomas Schmidts danke ich für ihre fortwährende praktische und moralische Unterstützung als Übungsprobanden, Computererretter, Korrekturleser und Zuhörer.

Ein besonders herzliches Dankeschön geht an meine Eltern Monika und Lothar Weber, die mir in allen Lebenslagen mit Rat, Tat und Liebe zur Seite stehen.