


**JULIA ENGEL**

---

Mittels Multiplate® Analyzer bestimmte  
Thrombozytenfunktion bei Kleinpferden und Ponys  
sowie bei Equiden mit Systemic Inflammatory  
Response Syndrome



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2020

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2020

© 2020 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin,  
Klinik für Pferde mit Lehrschiene, Innere Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. Kerstin Fey

und der

Professur für klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Andreas Moritz

**Mittels Multiplate® Analyzer bestimmte Thrombozytenfunktion  
bei Kleinpferden und Ponys sowie bei Equiden mit Systemic  
Inflammatory Response Syndrome**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Julia Engel**

Tierärztin aus Surgut (Russland)

Gießen 2020

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter/in: Prof. Dr. Kerstin Fey

Prof. Dr. Andreas Moritz

Prüfer: Prof. Dr. Christoph Rummel

Tag der Disputation: 24.04.2020

Im folgenden Fachvortrag wurden bereits Teile dieser Arbeit präsentiert:

Engel J, Moritz A, Held L, Fey K, Roscher K: Impedanzaggregometrisch bestimmte Thrombozytenfunktion bei klinisch unauffälligen Ponys. 25. Jahrestagung der FG Innere Medizin und klinische Labordiagnostik der DVG, 03.-04. Februar 2017, Göttingen

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und 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 nicht veröffentlichten 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.

Julia Engel

**Für meinen Vater**

## Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG .....	1
2	LITERATURÜBERSICHT .....	3
2.1	Thrombozytenmorphologie .....	3
2.2	Thrombozytenfunktion .....	4
2.2.1	Zelluläre Gerinnung .....	4
2.2.2	Thrombozytäre Fehlfunktionen beim Pferd .....	5
2.2.3	Die Rolle der Thrombozyten bei Entzündungen.....	6
2.2.3.1	Aktivierung der Thrombozyten .....	7
2.2.3.2	Thrombozyten und Pathogene .....	8
2.2.3.3	Thrombozytäre Granula .....	8
2.2.3.4	P-Selektin Expression .....	9
2.2.3.5	Wirkung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten (TLA) .....	9
2.2.3.6	Expression von CD40L .....	10
2.2.3.7	TLR4-regulierte NET Entstehung .....	11
2.2.3.8	MHC Class I.....	11
2.2.3.9	Mikropartikel.....	12
2.2.3.10	Transkriptome .....	13
2.3	Verknüpfung von Inflammation und Koagulation .....	14
2.3.1	Situation beim Menschen.....	14
2.3.2	Situation beim Equiden .....	14
2.4	Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) .....	16
2.4.1	Definition.....	16
2.4.2	Pathophysiologie .....	17
2.4.3	SIRS bei Pferden .....	19
2.5	Diagnostika zur Messung der Thrombozytenfunktion .....	20
2.5.1	<i>In vivo</i> Blutungszeit.....	20
2.5.2	Thrombozytenzahl und Aktivierungsindizes.....	20
2.5.3	Platelet Function-Analyzer (PFA)-100.....	21
2.5.4	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS).....	21
2.5.5	Lichttransmissionsaggregometrie (LTE) .....	22
2.5.6	Impedanzaggregometrie .....	23
2.6	Thrombozytenagonisten und ihre Aktivierungswege .....	24
2.6.1	Kollagen.....	24
2.6.2	Adenosindiphosphat (ADP) .....	25
2.6.3	ADP und Prostaglandin E <sub>1</sub> (PGE <sub>1</sub> ).....	26
2.6.4	Thromboxan A <sub>2</sub> (TXA <sub>2</sub> ) .....	26
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....	28
3.1	Material und Methodik zur Ermittlung der Referenzintervalle bei Kleinpferden .....	28
3.1.1	Ein- und Ausschlusskriterien .....	29
3.1.2	Klinische Untersuchung.....	29
3.1.3	Blutprobenentnahme .....	30
3.1.4	Verarbeitung und Lagerung des Probenmaterials.....	31

3.2	Material und Methodik der SIRS-Patientenstudie.....	32
3.2.1	Ein- und Ausschlusskriterien .....	32
3.2.2	Klinische Untersuchung.....	33
3.2.3	Blutprobenentnahme .....	33
3.2.4	Verarbeitung und Lagerung des Probenmaterials.....	34
3.3	Labormedizinische Analytik.....	35
3.3.1	Klinische Chemie .....	35
3.3.2	ADVIA2120® .....	35
3.3.2.1	Messtechnik .....	35
3.3.2.2	Erythrozyten und Thrombozyten .....	37
3.3.2.3	Leukozyten .....	39
3.3.3	Multiplate® Analyzer .....	40
3.3.3.1	Messprinzip .....	40
3.3.3.2	Messablauf.....	45
3.4	Statistische Auswertung.....	49
3.4.1	Ermittlung der Referenzintervalle für Kleinpferde.....	49
3.4.2	Unterschiede in der Thrombozytenfunktion der Referenzintervall- Population .....	49
3.4.3	Einfluss ausgewählter hämatologischer Variablen auf die Thrombozytenfunktion.....	50
3.4.4	SIRS-Patienten .....	50
3.4.5	Unterschiede der Thrombozytenfunktion zwischen den Kontrollgruppen und den SIRS-Patienten .....	50
3.4.6	Einfluss ausgewählter hämatologischer Variablen auf die Thrombozytenfunktion bei SIRS-Patienten .....	51
3.5	Ergebnisse zur Ermittlung der Referenzintervalle bei Kleinpferden .....	52
3.5.1	Probandendaten.....	52
3.5.2	Klinische Untersuchung.....	52
3.5.3	Hämatologie und klinischen Chemie .....	52
3.5.4	Multiplate® Analyzer Resultate bei gesunden Kleinpferden .....	53
3.5.4.1	COLtest.....	55
3.5.4.2	ADPtest .....	56
3.5.4.3	ADPtest HS .....	57
3.5.4.4	ASPItest .....	58
3.5.5	Vergleich der Thrombozytenfunktion bei Kleinpferden und Warmblutpferden.....	59
3.5.5.1	COLtest.....	60
3.5.5.2	ADPtest .....	61
3.5.5.3	ADPtest HS .....	62
3.5.5.4	ASPItest .....	63
3.5.6	Korrelationen zwischen ausgewählten hämatologischen Variablen und der Thrombozytenfunktion .....	64
3.5.6.1	Leukozytenzahl.....	64
3.5.6.2	Thrombozytenzahl und thrombozytäre Variablen .....	64
3.5.6.3	Variablen des roten Blutbildes .....	65

3.6	Ergebnisse der SIRS-Patientenstudie.....	66
3.6.1	Patientendaten.....	66
3.6.2	Klinische Untersuchung.....	67
3.6.3	ADVIA2120® Ergebnisse bei Patienten.....	68
3.6.4	Klinische Chemie.....	69
3.6.5	Multiplate® Analyzer Resultate bei SIRS-Patienten.....	71
3.6.5.1	COLtest.....	75
3.6.5.2	ADPtest.....	76
3.6.5.3	ADPtest HS.....	77
3.6.5.4	ASPItest.....	78
3.6.6	Vergleich der Thrombozytenfunktion zwischen der Kontrollgruppe und den SIRS-Patienten.....	79
3.6.6.1	COLtest.....	80
3.6.6.2	ADPtest.....	81
3.6.6.3	ADPtest HS.....	82
3.6.6.4	ASPItest.....	84
3.6.7	Korrelationen zwischen ausgewählten hämatologischen Variablen und der Thrombozytenfunktion.....	86
4	DISKUSSION.....	88
4.1	Diskussion des Materials.....	88
4.1.1	Ermittlung der Referenzintervalle bei Kleinpferden.....	88
4.1.1.1	Probandenauswahl.....	88
4.1.1.2	Präanalytik.....	90
4.1.1.2.1	Blutprobenentnahme.....	90
4.1.1.2.2	Verwendetes Probenmaterial.....	91
4.1.1.2.3	Verwendetes Antikoagulans.....	91
4.1.1.2.4	Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Messbeginn.....	92
4.1.2	SIRS-Patienten.....	93
4.1.2.1	Patientenauswahl.....	93
4.1.2.2	Präanalytik.....	94
4.1.2.2.1	Blutprobenentnahme.....	95
4.2	Diskussion der Methodik.....	97
4.2.1	Multiplate® Analyzer.....	97
4.2.1.1	AUC als Hauptzielparameter.....	97
4.2.1.2	Verwendete Thrombozytenagonisten.....	98
4.2.1.3	Eingestellte Messdauer.....	99
4.3	Diskussion der Ergebnisse.....	101
4.3.1	Multiplate® Analyzer Referenzintervalle bei Kleinpferden.....	101
4.3.1.1	Auswahl gesunder Probanden.....	101
4.3.1.1.1	Globuline und Fibrinogenkonzentration.....	101
4.3.1.1.2	ADVIA2120®.....	101
4.3.1.2	Bestimmung der Referenzintervalle.....	103
4.3.1.3	Rasseabhängige Unterschiede der Thrombozytenfunktion.....	104
4.3.1.4	Gruppierung der Werte beim ADPtest und ADPtest HS.....	105

4.3.1.5	Einfluss ausgewählter hämatologischer Parameter auf die Thrombozytenfunktion bei gesunden Kleinpferden .....	106
4.3.1.5.1	Leukozytenzahl .....	106
4.3.1.5.2	Thrombozytenzahl .....	107
4.3.1.5.3	Thrombozytäre Variablen .....	108
4.3.1.5.4	Variablen des roten Blutbildes .....	110
4.3.2	SIRS-Patienten .....	112
4.3.2.1	Vergleich der Thrombozytenfunktion von gesunden Kleinpferden und Warmblütern mit SIRS-Patienten .....	112
4.3.2.2	Einfluss ausgewählter hämatologischer Parameter auf die Thrombozytenfunktion bei SIRS-Patienten .....	116
4.3.2.2.1	Leukozytenzahl .....	116
4.3.2.2.2	Thrombozytenzahl .....	116
4.3.2.2.3	MPC und MPV .....	117
4.3.2.2.4	Variablen des roten Blutbildes .....	118
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	120
6	SUMMARY .....	122
7	LITERATURVERZEICHNIS .....	124
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	144
9	ANHANG .....	146
9.1	Tabellenverzeichnis .....	146
9.2	Abbildungsverzeichnis .....	147
9.3	Datenverzeichnis .....	148



### 1 EINLEITUNG

Thrombozyten sind ein wichtiger Bestandteil des Gerinnungssystems. Die gemeinhin bekannte Rolle der Blutplättchen besteht in dem Verschließen eines endothelialen Defekts. Seit Beginn dieses Jahrtausends wurden weitere wichtige Funktionen der Thrombozyten im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen aufgezeigt. So belegen humanmedizinische Studien, die sich mit Erkrankungen wie Atherosklerose (Gawaz et al. 2005, Davi und Patrono 2007) oder Sepsis (Yaguchi et al 2004, Clark et al. 2007, Vieira de Abreu et al. 2012) beschäftigten, eine wichtige Rolle von aus Thrombozyten freigesetzten Mediatoren bei diesen Krankheitsbildern. Die Bestimmung der Thrombozytenfunktion ist heute ein Bestandteil in der Diagnostik von Sepsis und bei Systemic Inflammatory Response Syndrome (Brenner et al. 2012, Davies et al. 2014).

Ein zuverlässiges Verfahren zur Messung der thrombozytären Funktion ist die Impedanzaggregometrie nach Cardinal und Flower (1980). Auf dieser Methodik beruht auch die Analytik des in der eigenen Arbeit verwendeten Multiplate® Analyzers (Roche Diagnostics, Mannheim, D). Bei Menschen mit SIRS und Sepsis wird dieses Gerät eingesetzt (Adamzik et al. 2012, Davies et al. 2014). In der Veterinärmedizin findet der Multiplate® Analyzer vereinzelt Gebrauch (Defontis et al. 2013, Ponschab et al. 2016, Ho et al. 2017). Allerdings existieren bisher kaum Untersuchungen zur thrombozytären Funktion bei Pferden.

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde erstmals der Multiplate® Analyzer bei gesunden Warmblutpferden evaluiert (Held 2018). Da in dieser Studie ausschließlich gesunde Warmblüter als Probanden verwendet wurden, stellte sich die Frage ob die für diese Rasse bestimmten Referenzintervalle der Thrombozytenfunktion auch für Kleinpferde und Ponys gelten. Des Weiteren wurden mit Hilfe des Multiplate® Analyzers die Effekte und Dosierungen der Thrombozytenfunktionshemmer Clopidogrel und Aspirin® bei gesunden Großpferden untersucht (Roscher et al. 2015, Roscher et al. 2017, Roscher 2018). Clopidogrel gehört zu den Thienopyridinen. Es hemmt die Funktion der Blutplättchen über eine Bindung des thrombozytären ADP-Rezeptors (P2Y<sub>12</sub>).

## EINLEITUNG

In der equinen Literatur wurden bislang nur selten thrombozytäre Dysfunktionen beschrieben, so die Glanzmann's Thrombasthenie (Livesey et al. 2005) und die atypische equine Thrombasthenie (Norris et al. 2006). Einige wenige Untersuchungen beschäftigten sich mit der Rolle der Thrombozyten bei systemisch inflammatorischen Erkrankungen der Pferde (Dunkel et al. 2007, Segura et al. 2007, Bailey et al. 2009, Roscher 2018).

Die Ziele der Arbeit bestehen darin, die thrombozytäre Funktion bei Equiden mit einem „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS) mittels des Multiplate® Analyzers zu überprüfen und mit gesunden Probanden zu vergleichen. Zudem soll anhand dieser Dissertation untersucht werden, ob sich thrombozytäre Funktionen von Kleinpferden und Ponys von jenen der Warmblüter unterscheiden um gegebenenfalls eigene Referenzintervalle am Multiplate® Analyser zu erstellen.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Thrombozytenmorphologie

Der humane Thrombozyt ist eine drei bis fünf Mikrometer große, scheibenförmige Struktur ohne Zellkern, die eine Dicke von etwa 0,5  $\mu\text{m}$  aufweist. Blutplättchen von Equiden sind ungefähr um ein Drittel kleiner (Gader et al. 2008). Im Zellinneren befinden sich diverse Substanzen, die wichtige Aufgaben in der Adhäsion und Aggregation erfüllen. Darunter zählen die  $\alpha$ -Granula, dense Bodies und Lysosome. Die  $\alpha$ -Granula sind die zahlreichsten Organellen und enthalten u.a. den von-Willebrand-Faktor (vWF), P-Selektin und Fibrinogen. Dense Bodies beinhalten Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Serotonin, Histamin, Kalzium und Magnesium. Lysosome kommen meist vereinzelt vor und enthalten saure Hydrolasen (White 2013). Pferdethrombozyten besitzen, anders als humane Thrombozyten, keine als offenes Kanalsystem bezeichnete Einstülpungen der Zellmembran in das Innere (Gader et al. 2008). Über dieses spezielle System findet beim Menschen die Degranulation statt (White 2013). Beim Pferd verschmelzen die  $\alpha$ -Granula nach Aktivierung miteinander und entlassen ihren Inhalt durch Fusion mit der Oberflächenmembran in die Umgebung (Gader et al. 2008). Zur Degranulation der anderen Organellen beim Equiden gibt es nach Kenntnisstand der Autorin keine Untersuchungen.

Auf der Thrombozytenoberfläche befinden sich spezifische Rezeptoren, die bei Bindung der richtigen Agonisten eine Aktivierung der Zellen hervorrufen. Das ADP wirkt über die purinergen Rezeptoren  $\text{P2Y}_{12}$  und  $\text{P2Y}_1$  bei Menschen und Pferden (Mateos-Trigos et al. 2002). Kollagen aktiviert humane Thrombozyten über das Glykoprotein GPVI (Gibbins et al. 1997). Ein indirekter Mechanismus vermittelt die aktivierende Wirkung von Arachidonsäure. Diese wird enzymatisch in Thromboxan  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) umgewandelt. Über spezifische  $\text{TXA}_2$ -Rezeptoren kommt es zu einer Thrombozytenaktivierung (Offermanns et al. 1994).

Thrombozyten werden von Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, abgeschnürt und aus dem Knochenmark in das Blutgefäßsystem entlassen. Equine Thrombozyten haben eine durchschnittliche Lebensdauer von neun Tagen im Blut (Carter et al. 1974). Beim

Pferd zirkulieren physiologischer Weise 100 bis 350 G/l Plättchen im Blutgefäßsystem (Grondin und Dewitt 2010).

### **2.2 Thrombozytenfunktion**

Eine maßgebliche Aufgabe von Thrombozyten ist das Verschließen von endothelialen Defekten durch die Formation eines primären Thrombus. Auch später sind die Blutplättchen bei der Wundheilung beteiligt. Zudem spielen sie eine große Rolle bei Entzündungsprozessen (Smyth et al. 2009, Semple et al. 2011, McFadyen und Kaplan 2015). Im nächsten Abschnitt wird ausschließlich auf die thrombozytären Eigenschaften bzw. Funktionen im Rahmen der Hämostase eingegangen. Anschließend wird die Literatur zu Kenntnissen der thrombozytären Beteiligung an entzündlichen Prozessen zusammengefasst.

#### **2.2.1 Zelluläre Gerinnung**

Bei einer Schädigung des Endothels kommt das Subendothel mit Blutbestandteilen in Kontakt. Dadurch kann der vWF an die subendotheliale Matrix mit Hilfe des Oberflächenintegrins GPIb-V-IX gebunden werden. Die Verbindung am Ort des Defekts ist zunächst instabil (Alevriadou et al. 1993). Zu einer Festigung kommt es, sobald durch den vWF herangelockte Blutplättchen mit ihrem thrombozytären Rezeptor GPVI ebenfalls an das subendotheliale Kollagen binden. Infolgedessen werden die Blutplättchen aktiviert und immobilisiert (Jackson et al. 2000). Dieser Vorgang sowie stimulierende Agonisten, die durch Thrombozyten und das umliegende Gewebe produziert werden (u.a. Thrombin, Serotonin, ADP, TXA<sub>2</sub>), führen zu einer Aktivierung weiterer thrombozytärer Oberflächenintegrine, wie dem GPIIb-IIIa (Jackson et al. 2003). Durch die Agonist-Rezeptor-Interaktion kommt es zu einem Kalziumeinstrom in die Thrombozyten. Dieser Prozess ist unter anderem für den „shape change“, d.h. die Änderung der Konformation der Thrombozyten mit Entwicklung von Pseudopodien zur Erweiterung der Zelloberfläche, verantwortlich (Gawaz 1999). Des Weiteren wird durch die Signaltransduktion eine Degranulation der Thrombozyten veranlasst. Freiwerdende Inhaltsstoffe aus den dense Bodies und  $\alpha$ -Granula sorgen für Chemotaxis weiterer, sich an bereits aggregierte Zellen heftender Thrombozyten

## LITERATURÜBERSICHT

(Kulkarni et al. 2000). Als Aggregation wird die Vernetzung der Thrombozyten untereinander bezeichnet. Dabei kommt es zur Bindung des vWF an bereits immobilisierte Plättchen, wobei der vWF zudem mit dem GPIb-V-IX freier Zellen interagiert. Diese zunächst noch reversible Aggregation wird irreversibel, wenn Fibrinogen an die GPIIb-IIIa Bindungsstellen der Thrombozyten andockt (Kulkarni et al. 2000).

### **2.2.2 Thrombozytäre Fehlfunktionen beim Pferd**

Eines der Ziele des Hämostasesystems ist es, bei gleichzeitiger Verhinderung einer hämorrhagischen Krise den Blutfluss aufrecht zu erhalten. Auch im physiologischen Zustand ist dieses System ständig aktiv und unterliegt komplex regulierten Mechanismen sowohl zur Bildung als auch zur Lyse von Gerinnseln. Bei einer Imbalance kann es entweder zu einer Hyper- oder zu einer Hypokoagulopathie kommen. Klinisch äußern sich diese pathologischen Prozesse in Thrombosen und/oder einer vermehrten Blutungsneigung (Brooks 2008, Epstein 2014).

Da im Rahmen der eigenen Untersuchungen am Pferd ausschließlich die Funktion der Thrombozyten bestimmt wurde, beschränkt sich die weitere Literaturübersicht auf die Darstellung der Kenntnisse zu thrombozytären Fehlfunktionen. Es wird also nicht auf Störungen im Bereich der Gerinnungsparameter oder der Anzahl der Thrombozyten eingegangen.

Thrombozytäre Fehlfunktionen können angeboren oder erworben sein, wobei solche Störungen bei Equiden relativ selten vorkommen. Zu den angeborenen Erkrankungen gehört die Glanzmann Thrombasthenie, welche bei Vollblütern, Quarter Horses und Oldenburgern in Einzelfällen beschrieben ist (Livesey et al. 2005, Macieira et al. 2007). Bei dieser Erkrankung liegt ein quantitativer oder funktioneller Defekt des Integrins GPIIb-IIIa vor, welches als Fibrinogen-Rezeptor fungiert und damit wichtig für die Bildung von Thrombozytenaggregaten ist. Klinisch und labormedizinisch zeigen die Pferde eine verlängerte Blutungszeit, abnorme Thrombozytenadhäsion und Gerinnselretraktion, fehlende oder verminderte Aggregation und fehlende oder reduzierte GPIIb-IIIa-Komplexe. Eine weitere, selten vorkommende angeborene Thrombozytenfunktionsstörung wurde bei Vollblütern beobachtet (Norris et al. 2006).

## LITERATURÜBERSICHT

Klinisch zeigen die betroffenen Pferde eine verlängerte Blutungszeit, die Blutplättchen weisen abnorme Aggregationsantworten auf einige Agonisten auf und es besteht eine gestörte Fibrinogenbindung. Erworbene Funktionsstörungen werden durch metabolische Grunderkrankungen oder im Rahmen einer disseminierten intravaskulären Gerinnungsstörung (DIG) verursacht. Auch die Verabreichung von bestimmten Arzneimitteln beeinflusst die equine Thrombozytenfunktion. Die Arbeitsgruppe von Segura untersuchte *in vitro* und *in vivo* einen möglichen Einfluss des Hämostatikums Etamsylat auf die Funktion von Blutplättchen. Die Ergebnisse der *in vitro* Studie deuten darauf hin, dass Etamsylat in equinen Thrombozyten einen präaktivierenden Zustand erzeugt. *In vivo* konnte dies jedoch nicht bestätigt werden (Segura et al. 2007b). Johnstone konnte einen signifikant inhibitorischen Effekt auf die Plättchenaggregation bei Verabreichung der NSAIDs Phenylbutazon, Naproxen und Flunixin Meglumine feststellen (Johnstone 1983). In der eigenen Arbeitsgruppe wurden Clopidogrel und Acetylsalicylsäure bei gesunden Warmblütern auf ihre inhibitorische Wirkung der thrombozytären Funktion untersucht (Roscher et al. 2015, Roscher et al. 2017).

### **2.2.3 Die Rolle der Thrombozyten bei Entzündungen**

Der Zusammenhang zwischen Thrombozyten und Entzündungsgeschehen hat in den letzten 20 Jahren immer mehr an Beachtung gewonnen. Thrombozyten wurden als multifunktional erkannt und spielen eine tragende Rolle nicht nur in der Wundheilung, sondern auch bei inflammatorischen Prozessen und Immunantworten. Die Blutplättchen werden nicht nur durch spezifische Agonisten, sondern auch durch inflammatorische Agentien wie Antikörper oder Bakterien stimuliert. Sie sind zudem durch direkte Interaktionen mit Entzündungszellen an entzündlichen Geschehnissen und Erkrankungen beteiligt. Darunter fällt die Sepsis (Gawaz et al. 1997) und Erkrankungen ohne infektiöse Ursachen, z.B. Atherosklerose (Lievens und von Hundelshausen 2011).

Die Arbeitsgruppe von Youssefian fand heraus, dass Thrombozyten Mikroorganismen binden und Phagozyten dazu anregen, diese aufzunehmen (Youssefian et al. 2002). Bei Menschen mit schwerer Sepsis konnten durch thrombozytäre „toll-like-receptors“

## LITERATURÜBERSICHT

(TLR's) neutrophile extrazelluläre Traps („NETs“) aktiviert werden. Dieser Mechanismus sorgt für ein „Einfangen“ von Bakterien (Clark et al. 2007). Es besteht zusätzlich eine thrombozytäre Kommunikation mit Kupffer-Zellen zur Eliminierung von bakteriellen Infektionen (Wong et al. 2013). Blutplättchen bilden über den GPIIb-Rezeptor eine vorübergehende „touch-and-go“ Interaktion mit dem auf den Kupffer-Zellen exprimierten vWF. Sobald sich Mikroorganismen auf der Zelloberfläche befinden, wird ein zusätzliches Antigen präsentiert, welches eine Thrombozytenaktivierung initiiert. Anschließend kommt es zu einer kontinuierlichen GPIIb-medierten Bindung der Plättchen an die Kupffer-Zellen. Die betroffenen Kupffer-Zellen werden umhüllt, eine Ausbreitung der Erreger wird somit verhindert (Wong et al. 2013). Auch indirekt über die Hemmung der thrombozytären Funktion konnte gezeigt werden, dass die Plättchen an entzündlich bedingten Erkrankungen pathogenetisch beteiligt sind. So untersuchten Eisen und Kollegen eine mögliche Wirkung von Gerinnungshemmern auf das „Outcome“ bei an Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) Erkrankten. Von 5523 Patienten erhielten 2082 Acetylsalicylsäure. Die Gabe des Medikaments war assoziiert mit einer geringeren Mortalität (Eisen et al. 2012). In einer retrospektiven Studie bei Patienten mit Pneumonien wurde ein positiver Effekt von Clopidogrel ermittelt (Gross et al. 2013). Diese Patienten wiesen im Vergleich mit Patienten, die kein Clopidogrel erhielten, signifikant weniger Lungenschäden auf. Außerdem war die Dauer einer maschinellen Beatmung sowie die Mortalitätsrate geringer. Die Arbeitsgruppe von Tsai erforschte in einer Kohortenstudie den Zusammenhang zwischen einer frühzeitigen Verabreichung der Thrombozytenaggregationshemmer Acetylsalicylsäure, Clopidogrel und Ticlopidin und dem Überleben bei Sepsis. Die Ergebnisse zeigen ein geringeres Mortalitätsrisiko (OR 0,82;  $p < 0,001$ ) bei diesen Patienten (Tsai et al. 2015).

### **2.2.3.1 Aktivierung der Thrombozyten**

Unabhängig vom Auslöser ihrer Aktivierung verlieren die Thrombozyten ihre scheibchenförmige Struktur und werden irregulär mit Pseudopodienausbildung. Die Degranulation sorgt für eine Freisetzung u.a. von Immunomediatoren wie Plättchenfaktor 4, Interleukin- $\beta$  und Immunoglobuline. Stimulierte Plättchen

## LITERATURÜBERSICHT

exprimieren zusätzliche, meist als Rezeptoren fungierende Moleküle an ihrer Außenmembran. Zusätzlich ist die Affinität der Oberflächenmoleküle GPIIb-V-IX (vWF), GPIIb-IIIa (u.a. Fibrinogen) und GPVI (Kollagen) zu ihren Liganden erhöht, was eine gesteigerte Plättchenadhäsion und ihre Aggregation bewirkt. Auch Fc-Rezeptoren, TLR's und G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren finden sich nach Aktivierung auf der thrombozytären Membran und vermitteln ebenfalls ihre Adhäsion und Aggregation. Die klassischen Liganden aus dem Hämostasemodell, wie Thrombin und TXA<sub>2</sub> fungieren zudem als Schlüsselregulatoren bei Entzündungen (Ma und Dorling 2012, Liverani et al. 2014). Im Folgenden werden die wichtigsten Mechanismen der Thrombozyten zur Modulierung von Entzündungen und immunologischen Antworten beschrieben.

### **2.2.3.2 Thrombozyten und Pathogene**

Thrombozyten können auf der Plasmamembran als auch intrazellulär Antigene von Pathogenen wie Viren (Flaujac et al. 2010, Assinger 2014), Bakterien (Kerrigan und Cox 2010, Yeaman 2010) und Parasiten (McMorran et al. 2009) beherbergen. Bei einer Infektion mit dem Hepatitis B Virus sorgen die Thrombozyten für eine virusspezifische Hochregulierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und unspezifischen Entzündungszellen in der Leber (Aiolfi und Sitia 2015). Des Weiteren sind aktivierte Blutplättchen bei der Eindämmung einer Staphylococcus aureus Infektion beteiligt. Durch die thrombozytäre Sekretion des antimikrobiell wirksamen Peptids  $\beta$ -Defensin und Entstehung von „neutrophilen extrazellulären traps“ (NETs) wird die bakterielle Wachstumsrate gesenkt (Flaujac et al. 2010, Kraemer et al 2012). Die Bindung von Infektionserregern an die Thrombozyten kann jedoch auch übersteigerte und lebensbedrohliche Effekte haben. Beim Vorliegen einer Sepsis können aktivierte Thrombozyten eine disseminierte intravasale Gerinnungsstörung (DIG) hervorrufen (de Stoppelaar et al. 2014).

### **2.2.3.3 Thrombozytäre Granula**

Bei Aktivierung von Thrombozyten werden viele Substanzen synthetisiert bzw. ausgeschüttet. Die Meisten sind in Granula gespeichert. Dabei unterteilt man drei

## LITERATURÜBERSICHT

Typen,  $\alpha$ -Granula, dense Bodies und Lysosomen, wobei die Erstgenannten am Häufigsten vorkommen (White 2013).

Die in  $\alpha$ -Granula enthaltenen Moleküle beeinflussen hämostatische und entzündliche Prozesse sowie Zell-Matrix Interaktionen (Rendu und Brohard-Bohn 2001). Zu solchen Substanzen gehören u.a. Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle (Blair und Flaumenhaft 2009) wie platelet factor 4 (PF4), RANTES oder Interleukin-1 (IL-1). Haupteffekte dieser Substanzen sind das Regulieren der Leukozytenbewegung, insbesondere ihrer Migration aus dem vaskulären System ins Gewebe sowie weitere wesentliche entzündungsfördernde Aufgaben wie u.a. die Phagozytose und Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies (Lindemann et al. 2001, Mause et al. 2005, Kasper et al. 2007).

Dense Bodies enthalten Moleküle, die eine essentielle Rolle bei der Amplifikation der Thrombozytenreaktionen einnehmen, u.a. ADP, ATP, Histamin und Serotonin. Insbesondere das Nukleotid ADP besitzt eine bedeutende Funktion in der Aktivierung von Thrombozyten (Evangelista et al. 2005).

Lysosome beinhalten Proteasen, Glykosidasen und weitere Proteine mit bakteriziden Eigenschaften (Rendu und Brohard-Bohn 2001).

### **2.2.3.4 P-Selektin Expression**

Dieses Adhäsionsmolekül ist in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten enthalten und wird bei ihrer Aktivierung exprimiert bzw. in löslicher Form ausgeschüttet. Das P-Selektin interagiert mit seinem Liganden P-Selektin Ligand-1 (PSGL-1), welches sich auf Leukozyten befindet. Diese Bindung ist essentiell für die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten. Zusätzlich sorgt der Komplex für eine Brückenbildung zwischen Entzündungs- und Endothelzellen (Ma et al. 2004).

### **2.2.3.5 Wirkung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten (TLA)**

Durch die Formation von TLA's kommt es zu einer Hochregulierung entzündungsfördernder Funktionen der Leukozyten. Dazu gehören die Freisetzung von Zytokinen, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies sowie die Anregung von Phagozytose und endothelialer Adhäsion (Semple et al. 2011). Als Folge der Bindung an

## LITERATURÜBERSICHT

die Gefäßwand kann es zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels und damit zu Ödembildung kommen (de Stoppelaar et al. 2014). Weiterhin ist es möglich, dass die Mikrozirkulation so stark beeinträchtigt wird, dass es zu einem vollständigen Gefäßverschluss mit nachfolgender Ischämie kommt (McDonald et al. 2012). In der Humanmedizin werden solche Folgen vorrangig bei Sepsis beobachtet. Dabei werden TLA's mitverantwortlich für das Auftreten lebensbedrohlicher Komplikationen, wie etwa Schädigungen an Niere und Lunge bis hin zum Multiorganversagen gemacht (McDonald et al. 2012).

### **2.2.3.6 Expression von CD40L**

CD40L, auch CD 154 genannt, ist ein Transmembranprotein mit einer strukturellen Homologie zum Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Antoniades et al. 2009). Thrombozyten sind eine wichtige Quelle für das CD40L (Henn et al. 1998). Insbesondere die lösliche Form stammt überwiegend aus den Blutplättchen (Heeschen et al. 2003). Bei Aktivierung der Thrombozyten wird das auf der thrombozytären Oberfläche exprimierte CD40L in die extrazelluläre Umgebung abgegeben. Dieser Ligand interagiert dann mit seinem Rezeptor CD40, welches sich auf der Oberfläche verschiedener Zelltypen, einschließlich Endothelzellen, dendritischen Zellen und Leukozyten, befindet. Bei Exposition des Liganden gegenüber Endothelien wird die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und P-Selektin induziert und die Ausschüttung von tissue factor und IL-6 initiiert (Anand et al. 2003, Hammwöhner et al. 2007). Des Weiteren kann das CD40L die CD8<sup>+</sup> Zellreaktion verstärken und die T-Zell Responsibilität nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* fördern (Elzey et al. 2008). Thrombozyten können zudem über CD40L die Differenzierung und Aktivierung der dendritischen Zellen induzieren (Kissel et al. 2006). Daraus resultiert die Freisetzung von proinflammatorischen Zyto- und Chemokinen, als auch die Aktivierung von naiven T-Zellen. Das Oberflächenmolekül unterstützt die T-Zell abhängige B-Zell Differenzierung (Kroczek et al. 1994). Weiterhin kann das Oberflächenprotein mit neutrophilen Granulozyten interagieren, wie es bei der Entstehung des "transfusion-related acute lung injury" (TRALI) nachgewiesen wurde. Dabei aktiviert das

thrombozytäre CD40L Neutrophile in den Lungen betroffener Patienten, wodurch weitere endotheliale Schäden entstehen (Khan et al. 2006).

### **2.2.3.7 TLR4-regulierte NET Entstehung**

Toll-like receptors (TLRs) gehören zu den „Erkennungsrezeptoren“, da sie bestimmte molekulare Bestandteile von Pathogenen erkennen (Kawai und Akira 2010). Diese Proteine werden von Phagozyten, z.B. Neutrophile, dendritische Zellen und Makrophagen, aber auch von Thrombozyten exprimiert (Andonegoui et al. 2005, Cognasse et al. 2005). TLR4 befindet sich auf der Zellmembran von Thrombozyten und bindet insbesondere bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) (Akira et al. 2006). Die LPS-induzierte TLR4-Zellsignalisierung sorgt bei Mäusen für eine thrombozytäre Adhäsion an Fibrinogen und Plättchensequestrierung im mikrovaskulären System der Lunge, Leber und Milz (Andonegui et al. 2005). Zusätzlich wurde gezeigt, dass das Erkennen von LPS durch thrombozytäre TLR4 eine Thrombozyten-Neutrophilen-Interaktion mit anschließender Aktivierung der Neutrophilen auslöst. Dabei präsentieren die TLR4-exprimierenden Thrombozyten gebundenes LPS den Neutrophilen, die dadurch stimuliert werden reaktive Sauerstoffspezies zu generieren. Zudem sorgt die plättchenvermittelte Präsentation von LPS für ein Extrudieren der neutrophilen DNA. Dies führt zur Bildung von neutrophilen extrazellulären traps, „NETs“ (Clark et al. 2007). Diese Formationen sind eine große Hilfe beim Einfangen und Eliminieren von freien Bakterien und Viren *in vivo* (McDonald und Kubes 2012, Jenne et al. 2013). Neben dem Einfangen von Bakterien und Viren können auch parasitäre Pathogene die Bildung von NETs veranlassen (Hermosilla et al. 2014). NETs besitzen auch prothrombotische Effekte und tragen zum Gerüst eines Thrombus bei (Maugeri et al. 2014, Mangold et al. 2015). TLR4 moduliert zudem Sepsis-induzierte Thrombopenie und TNF Produktion (Aslam et al. 2006).

### **2.2.3.8 MHC Class I**

Thrombozyten verfügen über Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Moleküle sowohl auf der Plasmamembran als auch in ihrem Zytoplasma. Auf der Membran bestehen diese Moleküle aus denaturierten schweren Ketten, welche von

anderen Zellen gespalten und von den Thrombozyten adsorbiert wurden (Kao et al. 1986). Diese MHC Class I Moleküle können nach einer Transfusion fehlerhafte Interaktionen mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen eingehen, in deren Folge es zu einer mangelnden Generierung zytotoxischer T-Lymphozyten kommen kann. Dies ist beim sogenannten „Transfusionseffekt“ bei Hauttransplantaten zu beobachten (Aslam et al. 2008). Intrazelluläre MHC Class I Moleküle sind intakt und in  $\alpha$ -Granula enthalten (Zufferey et al. 2014). Im Zuge von syngenen Transplantationen exprimieren aktivierte Thrombozyten neu entstehende MHC Class I Moleküle. Diese besitzen die Fähigkeit, Antigene den CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu präsentieren (Chapman et al. 2012). Thrombozyten können also, abhängig von der Herkunft MHC Class I Moleküle, eine Suppression oder eine Aktivierung von T-Zellen medieren.

### **2.2.3.9 Mikropartikel**

Thrombozytäre Mikropartikel sind kleine extrazelluläre Vesikel, die durch zytoplasmatisches „Blebbing“ (Bildung von Membranbläschen auf der Zelloberfläche) und Spaltung entstehen. Bei inflammatorischen Prozessen mit Aktivierung von Thrombozyten, wie bei der rheumatoiden Arthritis oder Sepsis, wurden solche Mikropartikel entdeckt (György et al. 2012, Reid und Webster 2012). Der genaue Triggermechanismus zur Bildung der Mikropartikel durch die Thrombozyten ist nicht bekannt. Mehrere Aktivierungswege können die Generierung dieser Mikropartikel bei entzündlichen Geschehnissen fördern. Dazu gehören hoher Scherstress, Aktivierung von thrombozytären Rezeptoren oder Apoptose (Brown und McIntyre 2011). Mikropartikel enthalten inflammatorische Substanzen, u.a. Zytokine, Chemokine, Enzyme, Rezeptoren und Nukleinsäuren. Sie beteiligen sich an der Zellkommunikation. Dabei interagieren sie mit anderen Zellen u.a. über Integrine (Dasgupta et al. 2009, Dasgupta et al. 2012). Die Vesikel präsentieren dem Endothel z.B. IL-1 $\beta$  und RANTES (Mause et al. 2005, Brown und McIntyre 2011). Des Weiteren sind sie bedeutsam für die Signalübertragung zwischen Thrombozyten und dem angeborenem Immunsystem (Italiano et al. 2010, Vajen et al. 2015).

### **2.2.3.10 Transkriptome**

Trotz eines fehlenden Zellkerns können Thrombozyten signifikante Mengen an RNA, darunter mRNA, strukturelle und katalytische, regulatorische und nichtkodierende RNA synthetisieren (Landry et al. 2009, Rowley et al. 2011, Rowley et al. 2012, Simon et al. 2014). Die RNA kann anschließend mittels Mikropartikel zu anderen Zellen transportiert werden um dort die zelluläre Funktion zu regulieren (Risitano et al. 2012, Laffont et al. 2013, Clancy und Freedman 2014).

### **2.3 Verknüpfung von Inflammation und Koagulation**

#### **2.3.1 Situation beim Menschen**

Die Mehrzahl der septisch erkrankten humanen Patienten entwickelt eine Gerinnungsstörung (Esmon 2003, Levi und Opal 2006, Levi et al. 2012). Bei Vorliegen solcher Koagulopathien kommt es zu diversen klinischen und labormedizinischen Veränderungen, beginnend mit einer erniedrigten Thrombozytenzahl bis hin zur Entwicklung einer disseminierten intravasalen Gerinnungsstörung (DIG) (Levi et al. 1993). Diese ist durch das Auftreten von mikrovaskulären Thromben charakterisiert, wodurch die Blutversorgung nachgeschalteter Organe beeinträchtigt wird, was zu einem Organversagen führen kann (Levi und ten Cate 1999, Levi 2007). Aufgrund der anhaltenden Aktivierung des Gerinnungssystems, aber auch weiterer Mechanismen, wie einer gestörten Synthese und einem erhöhten Abbau von Gerinnungsproteinen und Protease Inhibitoren, kommt es zu einem fulminanten Verbrauch von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten. Dadurch entsteht eine erhöhte Blutungsneigung, aus der großflächige Blutungen resultieren können (Levi und van der Poll 2013). Hauptmechanismus ist die tissue factor-medierte Thrombin Generierung (Levi et al. 2006) und eine Imbalance der physiologischen antikoagulatorischen Mechanismen. Dazu zählen das Antithrombin- und Protein C-System (Esmon 1987, Lay et al. 2007). Es gibt eine Vielzahl von Belegen, dass die Aktivierung der Gerinnung durch inflammatorische Aktionen modifiziert wird (Levi und van der Poll 2010). Im Rahmen der Sepsis erfolgt die thrombozytäre Aktivierung direkt durch Endotoxine oder proinflammatorische Mediatoren, wie dem plättchenaktivierenden Faktor („PAF“).

#### **2.3.2 Situation beim Equiden**

Über die Rolle der Blutplättchen bei Pferden mit systemischen entzündlichen Erkrankungen gibt es nur wenige Arbeiten. In diesen Untersuchungen wurde eine verstärkte Aktivierung der Thrombozyten v.a. bei Endotoxämie, Hufrehe und gastrointestinalen Störungen festgestellt (Jarvis und Evans 1994, Weiss et al. 1995, Monreal et al. 2000, Dunkel et al. 2007, Bailey et al. 2009). Bei thrombozytopenischen

## LITERATURÜBERSICHT

Ponys aufgrund experimentell induzierter equiner infektiöser Anämie wurde *in vivo* eine Aktivierung der Blutplättchen ermittelt. Die Zellen waren *in vitro* hypofunktional (Russell et al. 1999). Segura et al. wiesen indirekt eine *in vivo* Aktivierung der Blutplättchen aufgrund einer Degranulation, die durch einen verminderten MPC erfasst wurde, bei adulten Pferden und Fohlen mit entzündlichen Erkrankungen nach (Segura et al. 2007).

Feige und Kollegen konnten in einer prospektiven kontrollierten klinischen Studie eine Aktivierung der plasmatischen Gerinnung und Bildung von Mikrothromben mit anschließenden Organschäden bei laparotomierten Pferden nachweisen. Bei den 30 chirurgisch versorgten Kolikpatienten war die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) verlängert. Außerdem kam es zu einem signifikanten Anstieg der Fibrin-Monomere und D-Dimere sowie signifikantem Abfall des Antithrombin III (Feige et al. 2003). Eine prospektive observatorische klinische Studie zeigte bei 40 septischen Neonaten, die mit 41 nicht septischen und 22 gesunden Fohlen verglichen wurden, ebenfalls eine signifikant verlängerte Prothrombinzeit (PT), aPTT und erhöhte D-Dimere bzw. erniedrigtes Antithrombin (Armengou et al. 2008). In einer Arbeit von Cotovio und Kollegen wurden bei 66 Equiden mit schwerwiegenden Erkrankungen des Magendarmtrakts (Ischämie, Enteritis, Peritonitis) vermehrt Fibrinauflagerungen, die mit Mikrothromben, Multiorganversagen und DIG einhergingen, gefunden. Im Vergleich dazu wurden bei Pferden mit moderaten gastrointestinalen Erkrankungen wie Dickdarmverlagerungen oder Obstipationen (n=11) und Schlachtpferden (n=16) solche Veränderungen in signifikant geringerem Ausmaß nachgewiesen (Cotovio et al. 2007).

### 2.4 Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)

SIRS ist eine komplexe entzündliche Reaktion, die aufgrund einer Vielzahl von akuten, hochgradigen Insulten wie Trauma, Verbrennungen, schwerer Infektion oder einer Exposition gegenüber bakteriellen Substanzen entsteht (Lohmann und Barton 2014).

#### 2.4.1 Definition

1991 wurde erstmals eine gemeinsame Konferenz vom American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) abgehalten. Das Treffen diente der Etablierung medizinischer Definitionen, wodurch eine Verbesserung von Diagnosestellung, Monitoring und Therapie bei septischen Patienten erzielt werden sollte (Bone et al. 1992). Maßgeblich wurden die Bedeutungen des „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS) und der Sepsis erörtert. Es kam zu dem Konsensus, dass für das Vorliegen eines SIRS infektiöser oder nicht infektiöser Genese mindestens zwei Veränderungen in den folgenden klinischen bzw. labormedizinischen Parametern erfüllt sein müssen:

- Körpertemperatur  $\geq 38,0^{\circ}\text{C}$  oder  $\leq 36,4^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz  $\geq 90/\text{min}$
- Tachypnoe, manifestiert durch eine Atemfrequenz  $\geq 20/\text{min}$  oder Hyperventilation mit  $\text{PaCO}_2 \leq 33 \text{ mm Hg}$
- Anzahl der Leukozyten  $> 12.000$  oder  $< 4.000/\mu\text{L}$  oder die Anwesenheit von über 10 % von unreifen Neutrophilen

Nicht infektiös bedingte Ursachen eines SIRS können u.a. eine Pankreatitis, Ischämie und Trauma sein. Komplikationen eines SIRS sind z.B. Schock, Nierenversagen und Multiorganversagen. Eine Sepsis liegt dann vor, wenn dem klinisch manifesten SIRS eine infektiöse Ursache zugrunde liegt.

2001 wurden die Definitionen durch die Arbeitsgruppen der European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), American Thoracic Society (ATS) und Surgical Infection Society (SIS) ergänzt. Die Autoren bemängelten die 1991 festgelegten SIRS Kriterien als zu unspezifisch. Sie schlugen vor, biochemische anstatt klinischer Parameter zur Erkennung inflammatorischer Phänomene zu benutzen. Vor allem eine

## LITERATURÜBERSICHT

erhöhte Konzentration von zirkulierendem Interleukin 6, Procalcitonin oder C-reaktivem Protein belegen das Vorhandensein einer systemischen Entzündung (Levy et al. 2003).

Eine fachspezifische gemeinsame Arbeitsgruppe des ESICM und SCCM veröffentlichte zuletzt 2016 die für diese Gesellschaft gültigen Definitionen zum SIRS. Für das Vorhandensein eines SIRS werden weiter die oben genannten, 1991 veröffentlichten Kriterien verwendet. Das Vorliegen einer Sepsis wurde genauer definiert und differenziert. Hierfür wurden Scoring Systeme, wie z.B. das Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) Modell entwickelt. Dies dient der Etablierung von Kriterienkatalogen, um den Schweregrad und die Prognose einer bestehenden Sepsis zu bestimmen (Singer et al. 2016).

Zurzeit (2019) ist in Deutschland noch die S2k Leitlinie zur Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) in Gebrauch (Reinhart et al. 2010). Eine Expertenkommission erarbeitet momentan eine neue S3-Leitlinie zur Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. Auf diese kann bei Fertigstellung über die Internetseite <https://www.sepsis-gesellschaft.de/leitlinien/> zugegriffen werden (letzter Zugriff am 14.04.2019). Die derzeitige Leitlinie gibt vor, dass SIRS-Patienten die Veränderungen, wie bereits von Bones und Kollegen (1991) beschrieben, bei Körperinnentemperatur, Herz- und Atemfrequenz sowie des Blutbildes (s. S. 16) zeigen. Um eine Infektion als Ursache nachzuweisen, sollten zwei Blutkulturen durchgeführt werden. Fallen die Blutkulturen negativ aus, müssen alle vier klinischen Kriterien erfüllt sein, um von einem SIRS infektiöser Genese zu sprechen. Organdysfunktionen liegen u.a. bei akuter Enzephalopathie, arterieller Hypotension und Schock, absoluter oder relativer Thrombozytopenie, arterieller Hypoxämie, renaler Dysfunktion oder metabolischer Azidose vor (Reinhart et al. 2010).

### **2.4.2 Pathophysiologie**

Die Pathogenese eines SIRS ist hochkomplex und viele Aspekte sind noch nicht vollständig aufgeklärt (Bosmann und Ward 2013). Im Allgemeinen bestehen auch nach

## LITERATURÜBERSICHT

einem akuten Insult eng kontrollierte Interaktionen zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren. Das Immunsystem, aber auch hämostatische, kardiovaskuläre, neurogene und endokrine Mechanismen sind bei der Entstehung der ausufernden entzündlichen Prozesse, die letztlich als SIRS bezeichnet werden, beteiligt (de Jong et al. 2010). Inflammatorische Mediatoren sollen der Elimination einer Noxe dienen, wobei lokale und systemische Gewebeschäden durch antiinflammatorische Transmitter begrenzt werden (Fry 2012). Das Entstehen eines SIRS bzw. einer Sepsis aktiviert nochmals das angeborene Immunsystem (Denk et al. 2012). Bei einer ausgeprägten Immunantwort kann die schädigende Wirkung größer ausfallen als der intendierte Schutz des Wirtes vor dem Mikroorganismus. SIRS entsteht durch verschiedene Ursachen, insbesondere durch Produkte von Bakterien (Werners und Bryant 2012). Der Entzündungsprozess wird durch das Erkennen von PAMPs („pathogen-associated molecular patterns“) aktiviert. Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien, Lipoteichonsäure grampositiver Bakterien, Peptidoglykane, doppelsträngige virale RNA oder bakterielle DNA sind Beispiele für PAMPs (Werners und Bryant 2012). Alternativ kann das Immunsystem aufgrund geschädigter Zellen nach Trauma oder Ischämie-Reperfusionsschädigung auch durch endogene Produkte, sogenannte DAMPs („damage-associated molecular patterns“) aktiviert werden. Diese werden passiv aufgrund eines unphysiologischen Zelltods oder aktiv als Alarmsignale, sogenannte „Alarmins“, frei (Denk et al. 2012). Zellassozierte „pattern-recognition receptors“ (PRRs) erkennen PAMPs und DAMPs. Dadurch werden mehrere Signalwege ausgelöst, was zu einer raschen Aktivierung des unspezifischen Immunsystems mit Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie Interferon- $\gamma$  und anderen Mediatoren führt (Kawasaki und Kawai 2014). Zu den PRRs gehören unter anderem die toll-like receptors (TLRs). Des Weiteren werden proinflammatorische Zyto- und Chemokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, und IL-12 freigesetzt (Lin et al. 2011, Lewis et al. 2012). Die stark gesteigerte Expression dieser Substanzen trägt zur Entstehung eines SIRS bei (Gogos et al. 2000). Stimulierte PAMPs und DAMPs führen zu einer Aktivierung der Gerinnungs- und Komplementkaskaden (Rittirsch et al. 2008). Folge des Entzündungsprozesses kann daher wiederum eine Imbalance des hämostatischen

Gleichgewichts bzw. eine Verbrauchskoagulopathie sein (Cavaillon und Annane 2006). So kann es zu Koagulopathien kommen, aus denen mikrovaskuläre Thrombosen und Organfunktionsstörungen resultieren können (Denk et al. 2012).

### **2.4.3 SIRS bei Pferden**

Erste Definitionen wurden 2015 für kranke Fohlen erarbeitet (Wong und Wilkins 2015). Dabei hielten sich die Autoren an die bereits in der Humanmedizin vorgeschlagenen Kriterien. Demzufolge wurde bei Fohlen von einem manifesten SIRS ausgegangen, wenn zusätzlich zu einer abnormen Körpertemperatur oder Leukozytenzahl mindestens zwei weitere der folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Erhöhte Herzfrequenz und/oder Atemfrequenz sowie
- veränderter Laktat- und/oder Glukosewert im Blut.

Lambert et al. (2016) wiesen die vermehrte Anwesenheit stabkerniger und toxischer Neutrophiler bei adulten Pferden mit Anzeichen eines SIRS nach. Deren Vorkommen korrelierte mit einem ungünstigen Verlauf bzw. erhöhter Todesrate. In einer weiteren Studie von Roy et al. (2017) wurde der prognostische Wert der SIRS-Diagnose bei Equiden überprüft. Zusätzlich zu den oben genannten Kriterien verwendeten die Autoren einen SIRS-Score zur Identifizierung von Patienten im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium. Epstein et al. (2011) zeigten, dass viele Pferde mit entzündlichen Darmveränderungen und strangulierenden Obstruktionen die SIRS-Kriterien (Epstein et al. 2011) erfüllen. Insbesondere bei einer Kolitis ist ein SIRS mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert (Moore und Vandenplas 2014). Bei Pferden mit schwerwiegenden Erkrankungen wie Pleuropneumonie, septischer Endometritis und Kohlenhydratüberladung tritt gehäuft eine SIRS bzw. Sepsis bedingte Hufrehe auf (Belknap und Black 2012). Zusätzlich ist die Entstehung eines Multiorganversagens bei einem SIRS wahrscheinlich (Belknap et al. 2009). Allerdings wurde noch 2017 bemängelt, dass in der Pferdemedizin keine einheitlichen Kriterien für das auch beim Pferd auftretende SIRS definiert sind (Wilkins 2017).

### **2.5 Diagnostika zur Messung der Thrombozytenfunktion**

In der Labordiagnostik gibt es mehrere Verfahren zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion, die meisten benötigen jedoch spezielle Gerätschaften, geschultes Fachpersonal und isolierte Thrombozyten als Probenmaterial. Dies grenzt deren Verwendung in der Praxis deutlich ein (Shah und Ma 2007). Immerhin existieren einige Point-of-Care (POC) Tests, die eine Untersuchung der thrombozytären Funktion in der Humanmedizin wesentlich vereinfachen. Diese Systeme werden hauptsächlich bei Patienten mit Blutungsneigung v.a. in der präoperativen Phase und zum Monitoring bei Einnahme von Gerinnungshemmern gebraucht (Goble und Rocafort 2017).

Die in der Pferdemedizin bekanntesten Verfahren sind die *in vivo* Blutungszeit, die Erfassung der Thrombozytenzahl und deren Aktivierungsindizes, die Plättchenfunktionsanalyse und die Detektion von spezifischen Aktivierungsmarkern mittels Durchflusszytometrie (Brooks 2008).

#### **2.5.1 *In vivo* Blutungszeit**

Die Blutungszeit ist der älteste Test zur Messung der thrombozytären Aktivierung, Adhäsion und Aggregation und wurde seit 1910 in der Humanmedizin angewandt (Duke 1910). Um die Blutungszeit beim Pferd zu bestimmen wird eine oberflächliche Wunde in der Gingivalschleimhaut mit einer definierten Tiefe und Länge verursacht (Kopp et al. 1985). Die erwartete Blutungszeit bei gesunden Equiden beträgt ungefähr fünf Minuten. Dauert die Blutung länger, spricht dies für eine Thrombozytopenie, eine Funktionsstörung oder ein von-Willebrand Syndrom. Zwar ist die Methode simpel, jedoch auch invasiv, unspezifisch und besitzt eine schlechte Reproduzierbarkeit (Brooks 2008). Daher gilt sie mittlerweile als obsolet.

#### **2.5.2 Thrombozytenzahl und Aktivierungsindizes**

Durch das Hämatologie-Gerät ADVIA2120® können neben der Anzahl der Thrombozyten weitere Parameter zur indirekten Ermittlung einer thrombozytären Aktivierung gemessen werden (Beard et al. 2011). Eine detaillierte Angabe der Aktivierungsindizes findet sich in Kapitel 3.3.2. Der wahrscheinlich wichtigste Index ist

die Mean Platelet Component (MPC). Sie entspricht der Dichte der Thrombozyten und nimmt ab, wenn die Zellen degranulieren. Segura et al. (2007) überprüften die Nutzbarkeit von Thrombozytenindizes bei Pferden anhand des ADVIA120® und stellten fest, dass die MPC eine sinnvolle Variable zur Erkennung einer Aktivierung der Plättchen ist (Segura et al. 2007).

Neben der Granularität der Thrombozyten wurde auch ihre Größe, gemessen als mittleres Zellvolumen (Mean Platelet Volume, MPV), als Marker für eine Plättchenstörung vorgeschlagen (Bessman et al. 1985). Es hat sich jedoch in einigen humanmedizinischen Studien herausgestellt, dass es bei Verwendung unterschiedlicher Methoden zu uneinheitlichen Ergebnissen kommt und diese nicht miteinander vergleichbar sind (Lippi et al. 2015). In einer equinen Studie war das MPV kein zuverlässiger Blutparameter zur Überprüfung einer Thrombozytenaktivierung (Segura et al. 2007).

### **2.5.3 Platelet Function-Analyzer (PFA)-100**

Der PFA-100 (Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, D) ist ein vollautomatisiertes Point-of-Care (POC) Gerät und misst die Formation eines Thrombozytenpfropfs *in vitro* unter hohen Scherströmungen. Über eine Kapillare fließt antikoaguliertes Blut durch eine kleine Öffnung in einer Membran, die mit Aktivatoren (z.B. Kollagen oder ADP) beschichtet ist. Zum Verschluss der Öffnung kommt es durch Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten. Diese Zeit wird Verschlusszeit genannt. Das Verfahren wird zur Detektion von Adhäsions- und Aggregationsdefekten sowie des von-Willebrand Syndroms genutzt. Nachteilig an dieser Methode ist, dass die Verschlusszeit nicht nur von der Thrombozytenfunktion, sondern u.a. auch von dem Hämatokrit beeinflusst wird. Für gesunde Pferde wurden am PFA-100 Referenzintervalle für die Agonisten Kollagen und ADP erstellt (Segura et al. 2005).

### **2.5.4 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)**

Dies ist eine Methode, bei der Laserlicht zur Untersuchung einer Zellsuspension verwendet wird. Prinzipiell wird nach Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper die Expression von Oberflächenantigenen nachgewiesen. Sie eignet sich zur Untersuchung

## LITERATURÜBERSICHT

der Thrombozytenfunktion in Vollblut durch Detektion von thrombozytären Glykoproteinen. In der Humanmedizin werden mit dieser Methodik zirkulierende aktivierte Thrombozyten, Thrombozyten-Thrombozyten-Aggregate und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate gemessen (Michelson et al. 2000).

Es gibt einige Studien über die Verwendung des FACS im Pferdeblut. Weiss und Evanson (1997) wiesen mit dieser Methodik Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate nach. Auch gebundene Antikörper gegen die thrombozytären Glykoproteine GPIIb-IIIa und GPVI sowie aktivierungsabhängige Antigene, wie das P-Selektin (Segura et al. 2006) wurden so detektiert. Dunkel et al. (2009) untersuchten equine Blutplättchen unter Verwendung von fluoreszenzkonjugierten Antikörpern gegen den Fibrinogenrezeptor CD41/61 (GP IIb-IIIa) und CD62P (P-Selektin) bei Pferden mit Recurrent Airway Obstruction (RAO). Zwar wurde eine erhöhte CD13 Expression nachgewiesen, eine Bildung von CD41/61 und CD62P oder Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregaten konnte jedoch nicht festgestellt werden (Dunkel et al. 2009). In der eigenen Arbeitsgruppe etablierten Theuerkauf und Kollegen eine durchflusszytometrische Methode zur Messung aktivierter Thrombozyten und von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten beim Pferd anhand des FACS (Theuerkauf et al. 2017). Außerdem wurde mit dieser Methode die Anwesenheit von aktivierten Blutplättchen und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten bei Equiden mit SIRS untersucht (Theuerkauf et al. 2018).

### **2.5.5 Lichttransmissionsaggregometrie (LTE)**

Die Methode galt lange Zeit als Goldstandard in der Thrombozytenfunktionsdiagnostik und misst ihre Aggregation *in vitro* (Born 1962). Das Prinzip beruht auf der photometrischen Erfassung der Lichttransmissionsänderung nach Zugabe eines Aktivators. Als Probenmaterial wird plättchenreiches Plasma verwendet. Da die Thrombozytenzahl der Probe vorab eingestellt wird, ist die Methode gut standardisiert (Harrison 2005). Allerdings liegen die Thrombozyten nicht in ihrer natürlichen Umgebung vor, da die roten und weißen Blutzellen aus der Probe entfernt werden. Die LTE erfasst daher die alleinige Reaktion der Plättchen und vernachlässigt den *in vivo* vorhandenen Einfluss der anderen Blutzellen auf die Aggregation. Ein weiterer Nachteil

ist die aufwendige Aufbereitung mit mehreren Zentrifugationsschritten. Dabei kann es u.a. zur Zellschädigung kommen (Dyszkiewicz-Korpany et al. 2005). Pelagalli et al. (2002) untersuchten bei verschiedenen Tierarten, u.a. dem Pferd, die Thrombozytenfunktion mit einem Lichttransmissionsaggregometer und stellten dabei Speziesunterschiede fest. Nach Kenntnis der Autorin existiert lediglich eine weitere Studie zum Einsatz der LTE beim Pferd. Dabei wurde ein Effekt von Clopidogrel bei gesunden Equiden nachgewiesen, es kam zu einer signifikant erniedrigten Aggregation (Brooks et al. 2013).

### **2.5.6 Impedanzaggregometrie**

Das Prinzip der Impedanzaggregometrie wurde 1980 durch Cardinal und Flower eingeführt. Dabei haften durch Agonisten aktivierte Thrombozyten an in Messzellen befindlichen Sensordrähten und aggregieren miteinander. Der dadurch erhöhte elektrische Widerstand zwischen den Sensoren wird kontinuierlich aufgezeichnet. Im Gegensatz zum Lichttransmissionsaggregometer wird Vollblut, also das natürliche Milieu der Thrombozyten, verwendet. Mit der neuesten Technik, der multiplen Elektroden Aggregometrie (Multiplate® Analyzer), wird die Methode in der Humanmedizin regelmäßig als POC Test genutzt (Tóth et al. 2006). Es gibt mittlerweile viele humanmedizinische Studien zum Nutzen des Multiplate® Analyzers als Diagnostikum für die Thrombozytenfunktion (Manu et al. 2015, Schmidt et al. 2017, Moenen et al. 2019).

In der Veterinärmedizin wurde die Impedanzaggregometrie bei den Tierarten Affe (Dugan et al. 2015, Ponschab et al. 2016), Braunbär (Fröbert et al. 2010), Hund (Kalbantner et al. 2010, Marschner et al. 2012, Defontis et al. 2013), Katze (Ho et al. 2015, Teuber und Mischke 2016), Ratte (Defontis et al. 2013), Schaf (Baumgarten et al. 2010, Hayes et al. 2015), Schwein (Haas et al. 2008, Mohr et al. 2013) und Pferd (Jarvis und Evans 1994, Kornreich et al. 2010, Roscher et al. 2015, Roscher et al. 2017, Held 2018, Roscher 2018) eingesetzt. Die im Multiplate® Analyzer verwendeten thrombozytären Aktivatoren wurden für die jeweils induzierte Thrombozytenaggregation für die Tierarten Hund (Kalbantner et al. 2010), Schaf (Baumgarten et al. 2010) und Warmblutpferd (Held 2018) Referenzintervalle erstellt.

## LITERATURÜBERSICHT

Aktuell existieren nur wenige Studien über den Einsatz des Multiplate® Analyzers bei Equiden. Kornreich et al. (2010) verwendeten das Gerät, um einen Einfluss von Pentoxifyllin auf die thrombozytäre Funktion von Pferden zu detektieren - den Autoren gelang dieser Nachweis nicht. Pentoxifyllin gehört zu den Phosphodiesterase hemmenden Xanthinderivaten. Das Arzneimittel soll vasodilatatorisch wirksam sein, die Blutviskosität senken können und antiinflammatorische Eigenschaften besitzen. Weiter validierten Roscher et al. (2015) die korrekte Dosierung von Clopidogrel bei gesunden Warmblütern mit Hilfe des Multiplate® Analyzers. Die thrombozytäre Inhibition konnte mittels ADPtest, ADPtest HS und ASPItest, jedoch nicht mit dem COLtest nachvollzogen werden. 2017 publizierten Roscher und Kollegen eine Arbeit über den Effekt von Acetylsalicylsäure (ASS) bei Pferden. Dafür erhielten zehn gesunde Warmblutpferde das Medikament. Der ASPItest zeigte eine signifikant inhibierte Funktion der Thrombozyten nach 24 und 48 Stunden ( $p < 0,05$ ) sowie nach 96 Stunden ( $p < 0,01$ ), obwohl bei drei von den zehn Pferden von einer Resistenz gegenüber ASS ausgegangen werden musste (Roscher et al. 2017).

### **2.6 Thrombozytenagonisten und ihre Aktivierungswege**

Eine thrombozytäre Aktivierung kann über zahlreiche Substanzen erfolgen. Eine Vielzahl der Aktivatoren wird *in vivo* bei einer Endothelläsion generiert und freigesetzt. Sie stammen auch aus bereits aktivierten Blutplättchen oder geschädigten Erythrozyten bzw. Endothelzellen. *In vitro* eingesetzte Agonisten sind je nach Spezies unterschiedlich potent. In den folgenden Kapiteln werden jene Agonisten detaillierter betrachtet, die in der eigenen Arbeit verwendet wurden. Über ihre spezifischen Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche, die zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören (Gentry 2000), werden die Blutplättchen aktiviert.

#### **2.6.1 Kollagen**

Bei Endothelläsionen kommt das sich im Subendothel befindliche Kollagen mit dem Blut in Kontakt und interagiert mit den Thrombozyten über spezifische Rezeptoren. Die Blutplättchen besitzen vier spezifische Kollagenrezeptoren in ihrer Oberflächenmembran (Brass et al. 2013). Zwei davon,  $\alpha_2\beta_1$  und GPVI, werden direkt

## LITERATURÜBERSICHT

vom Kollagen gebunden. Die anderen beiden Rezeptoren,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und GPIb-IX-V können Kollagen über den vWF binden. Bei Stimulation der Kollagenrezeptoren entfalten sich synergistische Wirkungen (Pugh et al. 2010). Dabei kommt es initial zu einer Adhäsion des Kollagens an den Thrombozyten über den vWF. Dieser Schritt erlaubt die anschließende Interaktion der beiden Kollagenrezeptoren  $\alpha_2\beta_1$  und GPVI (Nieswandt und Watson 2003). Beide können aber auch *in vitro* direkt ohne vorgeschaltete Schritte durch Zugabe von Kollagen stimuliert werden (Brass et al. 2013). Der genaue Mechanismus der durch den Kollagenrezeptor  $\alpha_2\beta_1$  erfolgenden Signaltransduktion ist bislang nicht geklärt. Der weitere direkte Kollagenrezeptor GPVI ist der am stärksten wirksame Signalrezeptor (Clemetson et al. 1999, Watson et al. 2005). Die Bindung des Kollagens an den GPVI Rezeptor führt über komplexe Vorgänge zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Dieses Protein hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und 1,2-Diacylglycerol (DAG). IP<sub>3</sub> und DAG sind „second messenger“ und sorgen für eine Freisetzung von Kalzium bzw. transmembranären Kalziumstrom und die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC). Dieses bewirkt eine Konformationsänderung des Fibrinogenrezeptors GPIIb-IIIa. Dadurch wird das Fibrinogen gebunden und die Thrombozyten können aggregieren (Bledzka et al. 2013).

### 2.6.2 Adenosindiphosphat (ADP)

ADP ist ein Molekül, das zur Gruppe der Nukleotide gehört und stellt einen wichtigen Thrombozytenagonisten dar. Es wird aus den thrombozytären dense Bodies, Erythrozyten und defekten Endothelien freigesetzt (Meyers et al. 1982, Brass et al. 2013). Auch ADP aktiviert die Thrombozyten über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die sich auf der thrombozytären Oberfläche befinden. Dazu gehören der P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>- und P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>-Rezeptor. Der über den P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelte Signalweg führt zu einer ADP-vermittelten Aktivierung der Phospholipase C. Folglich kommt es durch die Generierung von IP<sub>3</sub> zu einem intrazellulären Kalziumanstieg (Jin et al. 1998), der Effekt davon ist bereits im vorherigen Kapitel geschildert. Bei einer Aktivierung des P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>-Rezeptors kommt es also zu einer Formänderung und Aggregation der Thrombozyten. Die Bindung von ADP an den P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>-Rezeptor führt zu einer Hemmung

## LITERATURÜBERSICHT

der Adenylatcyclase (Daniel et al. 1998), was die Bildung von cAMP vermindert (siehe 2.6.3). Außerdem kann P2Y<sub>12</sub> bei einer hohen ADP Konzentration den GPIIb-IIIa Rezeptor aktivieren (Kauffenstein et al. 2001). Eine vollständige Thrombozytenaktivierung erfolgt nur, wenn beide Rezeptoren stimuliert werden. Es existiert eine weitere ADP-Bindungsstelle, der P2X<sub>1</sub>-Rezeptor. Dieser induziert einen transmembranen Kalziumeinstrom, hat aber ansonsten keine weitere Bedeutung in der ADP-induzierten Aggregation (Sun et al. 1998).

### **2.6.3 ADP und Prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>)**

Prostanoide werden in Thromboxane und Prostaglandine eingeteilt und entstehen aus der Arachidonsäure. Die Substrate binden an Thrombozyten über Prostanoidrezeptoren, die ebenfalls zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. Das PGE<sub>1</sub> bindet über Prostaglandin I- und Prostaglandin E<sub>3</sub>-Rezeptoren an Thrombozyten (Iyú et al. 2011). Der Prostaglandin I Rezeptor führt zu einer Erhöhung der Adenylatcyclase, was wiederum für eine Hemmung der Thrombozytenaktivität durch eine vermehrte Bildung von cAMP sorgt (Iyú et al. 2011). Die Stimulation des Prostaglandin E<sub>3</sub> Rezeptors bewirkt das Gegenteil, sie hemmt die Adenylatcyclase und sorgt damit für die Aktivierung der Blutplättchen (Iyú et al. 2011). Dieser Effekt ist jedoch gering und die inhibitorische Wirkung des PGE<sub>1</sub> auf die Thrombozytenfunktion überwiegt.

Im Labor wird die Kombination aus ADP und PGE<sub>1</sub> vorwiegend zur besseren Erfassung der Wirkung von P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-Antagonisten wie Clopidogrel genutzt (Johnson et al. 2008). Interagieren solche Arzneimittel mit dem P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor, wird der Effekt von PGE<sub>1</sub>, die Adenylatcyclase zu aktivieren, verstärkt. Dabei sorgt die gesteigerte cAMP-Konzentration für eine deutliche Hemmung der Aggregation in geeigneten Funktionstests (Fox et al. 2004).

### **2.6.4 Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)**

Thromboxane sind Arachidonsäurederivate und gehören zu den Eicosanoiden. Von ihnen ist TXA<sub>2</sub> der einzig bedeutsame Metabolit für die Plättchenaktivierung. Es stimuliert G-Protein-gekoppelte Rezeptoren um die Thrombozyten zu aktivieren. Dabei

## LITERATURÜBERSICHT

kommt es wieder über die Aktivierung der PLC zur Spaltung des PIP<sub>2</sub> in IP<sub>3</sub> und DAG. Dies führt zu einer Veränderung der thrombozytären Form, Aggregation, Sekretion von Granula und erhöhten Expression von GPIIb-IIIa-Rezeptoren (Bos et al. 2004, Nakahata 2008). TXA<sub>2</sub> wird aus der sich im Membranphospholipid befindlichen Arachidonsäure der Thrombozyten erzeugt. Die Säure wird durch die Wirkung von Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) freigesetzt (Quinn 2005). Das Enzym wird durch Kollagen über eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration und eine mitogen-activated-protein-Kinase (MAPK) aktiviert und hat die Aufgabe Membranphospholipide zu spalten. Es kommt zu einer Freisetzung der Arachidonsäure aus der Lipidmembran der Thrombozyten in das Zytoplasma. Die Arachidonsäure wird durch die Enzyme Cyclooxygenase (COX-1) und Thromboxansynthase, welche sich ebenfalls intrazellulär befinden, über das Zwischenprodukt Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), zum potenten Plättchenaktivator TXA<sub>2</sub> umgewandelt (Reilly und Fitzgerald 1993, Nakahata 2008). Dieser Agonist diffundiert durch die Plasmamembran und aktiviert weitere Thrombozyten über spezifische G-Protein gekoppelte Oberflächenrezeptoren (Fitzgerald 1991). Es existieren zwei Isoformen des spezifischen Rezeptors auf der thrombozytären Oberfläche, TXR $\alpha$  und TXR $\beta$ . Beide sind G-Protein-gekoppelt (Paul et al. 1999), wobei TXR $\alpha$  vorherrschend ist (Habib et al. 1999). Da TXA<sub>2</sub> *in vitro* zu instabil ist, wird im Labor die Arachidonsäure zur thrombozytären Aktivierung genutzt (Bos et al. 2004).

### 3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Ziel dieser Arbeit war der Nachweis von *in vivo* aktivierten Thrombozyten bei Warmblutpferden, Kleinpferden und Ponys mit schweren akuten systemischen Entzündungen unter Verwendung des Multiplate® Analyzers. Als Kontrollgruppen wurden einerseits die Daten gesunder Warmblüter aus der Dissertation von Held (2018) und andererseits von der Autorin rekrutierte gesunde Kleinpferde und Ponys verwendet.

#### 3.1 Material und Methodik zur Ermittlung der Referenzintervalle bei Kleinpferden

Zunächst wurden Blutproben von 20 gesunden Kleinpferden und Ponys am Multiplate® Analyser untersucht und mit den Referenzintervallen von gesunden Warmblutpferden verglichen, die bereits in der eigenen Arbeitsgruppe bestimmt worden waren (Held 2018). Der Begriff Kleinpferd wird in Deutschland für mittelgroße Pferde benutzt, deren Stockmaß mehr als 130 cm und weniger als 147,3 cm beträgt (Hobbylexikon Pferde, 1976, Frankfurt). Heutzutage wird der Begriff vor allem im Zusammenhang mit Pferdehalterhaftpflichtversicherungen als Synonym zum Begriff Pony verwendet. In dieser Arbeit werden alle Kleinpferde und Ponys als „Kleinpferde“ bezeichnet.

Da in drei von den vier kommerziell erhältlichen Tests zur Thrombozytenaktivierung mehr als fünf der 20 Messwerte außerhalb der Referenzintervalle der Warmblüter lagen (COLtest, ADPtest, ASPItest), wurde entsprechend der Leitlinien der American Society of Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) eine separate Erstellung von Referenzintervallen für die Gruppe der Kleinpferde notwendig (Friedrichs et al. 2012).

Hierfür wurden 62 Probanden verwandt, wobei die oben genannten 20 gesunden Kleinpferde hierin eingeschlossen sind. Die Messungen erfolgten im Zeitraum von Juni 2013 bis August 2014. Die Kleinpferde wurden entweder aus der näheren Umgebung der Universitätsklinik Gießen rekrutiert oder wurden in der Klinik für Pferde, Innere Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgestellt.

Die Blutprobenentnahme bei den Probanden wurde mit Einverständnis der Besitzer im Rahmen einer von diesen beauftragten Gesundheitskontrolle durchgeführt.

### **3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien**

Zur Ermittlung der Referenzintervalle für Kleinpferde wurden ausschließlich gesunde Stuten und Wallache bis zu einem Widerriststockmaß von 148 cm und ab einem Alter von drei Jahren eingeschlossen. Die Stuten durften weder tragend noch laktierend sein. Einbezogen wurden Kleinpferde, die in der klinischen Untersuchung keine Auffälligkeiten zeigten. Es schieden Tiere aus, die in den letzten sechs Monaten an einer Gefäßerkrankung litten und/oder bis 14 Tage vor der Untersuchung Medikamente erhielten. Es wurden keine adipösen oder mageren Pferde in die Studie aufgenommen. Zur semiquantitativen Bestimmung des Ernährungszustands wurde der Body Condition Score (BCS) nach Carroll and Huntington (1988) mit maximal fünf Punkten (siehe nächster Abschnitt) bestimmt. Probanden, die einen BCS von fünf oder eins aufwiesen, wurden folglich nicht für die Studie verwendet.

Zur weiteren Überprüfung des Gesundheitsstatus wurden die Leukozytenzahl, Globulinkonzentration und das Fibrinogen bestimmt. Kleinpferde, die bei zwei oder mehr dieser Entzündungsparameter Abweichungen vom Referenzintervall zeigten, wurden aus der Studie ausgeschlossen.

### **3.1.2 Klinische Untersuchung**

Die klinische Untersuchung erfolgte nach Erfragung des Vorberichts bei allen Kleinpferden durch die Autorin entweder in den Heimatställen oder in der Klinik für Pferde, Innere Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen. Es wurde eine allgemeine, eine zusätzliche allgemeine und eine spezielle Untersuchung der einzelnen Organsysteme nach den üblichen Regeln der Propädeutik durchgeführt. Besonders auf Anzeichen einer akuten entzündlichen Erkrankung, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, wurde geachtet.

Bei allen Pferden wurde der Body Condition Score (BCS) nach Carroll and Huntington (1988) erfasst (s. S. 147, Tab. A1). Dafür wurden die Körperpartien Hals, Rücken, Rippen und Beckenbereich einzeln beurteilt und mit Punkten von 0-5 bewertet, wobei 0 extrem mager und 5 extrem fett bedeutete. Daraus wurde der Mittelwert ermittelt und dieser entsprach dem BCS. Zusätzlich wurde eine Gewichtsberechnung nach Carroll und Huntington (1988) durchgeführt. Hierfür wurden die Körperlänge vom

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Buggelenk bis zum Sitzbeinhöcker und der Brustumfang mit dem obersten Punkt am Widerrist und dem untersten Punkt an der Gurtlage mit einem Maßband gemessen. Anschließend wurden die Werte in die folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Körpergewicht (kg): } \frac{\text{Brustumfang (cm}^2\text{)} \times \text{Körperlänge (cm)}}{11900 \text{ (kg/cm}^3\text{)}}$$

Die Zahl 11900 im Nenner der Formel definiert die Dichte eines Pferdekörpers und stellt eine Konstante dar (Carroll and Huntington 1988).

### 3.1.3 Blutprobenentnahme

Beide Venae jugulares wurden vor der Punktion adspektorisch und palpatorisch kontrolliert. Die Punktion erfolgte am Übergang des mittleren in das obere Drittel des Halses. Direkt vor der Blutentnahme wurde der Bereich mit Tupfern, die mit 70% Ethanol getränkt waren, desinfiziert. Anschließend wurde eine Vasuflo® (17 G, Dispomed®, Gelnhausen, D) oder bei drei Probanden eine Einmalinjektionskanüle (18 G, WDT, Garbsen, D) kopfwärts in die jeweilige Vene geschoben. Bei Verwendung der Vasuflo® wurde der Mandrin nach korrekter Platzierung in der Vene entfernt. Nun wurde ein Multi-Adapter (Sarstedt, Nümbrecht, D) auf die Vasuflo® bzw. die Punktionskanüle aufgesetzt und die Blutröhrchen befüllt. Bei den Röhrchen handelte es sich um Monovetten® von der Firma Sarstedt, Nümbrecht, D. Die Blutprobenentnahme erfolgte immer in der gleichen Reihenfolge:

- 1 EDTA (2,7 ml)
- 1 Heparin (1,2 ml)
- 2 Zitrat (1,4 ml)
- 2 Hirudin (2,7 ml)

Nach der Blutentnahme wurde die Vasuflo® bzw. die Kanüle aus der Vene entfernt. Um ein Nachbluten zu verhindern, wurde die Jugularvene oberhalb der Punktionsstelle für ungefähr 60 Sekunden komprimiert. Nach wenigen Minuten wurde die ehemalige Punktionsstelle abschließend adspektorisch kontrolliert.

### 3.1.4 Verarbeitung und Lagerung des Probenmaterials

Die Untersuchungen am Multiplate® Analyser wurden spätestens eine Stunde nach Blutentnahme begonnen. Alle weiteren labormedizinischen Untersuchungen wurden bis spätestens zwei Stunden nach Blutentnahme durchgeführt. Der Transport der Blutproben bis zu den Messungen innerhalb des Klinikgebäudes erfolgte in einem Probenständer, in dem die Röhren senkrecht und bei Umgebungstemperatur standen. Die Dauer des Transports betrug nie länger als 30 Minuten. Nach dem Transport und vor Messbeginn wurde darauf geachtet, dass die Hirudinröhren ca. 30 Minuten erschütterungsfrei standen.

Die Probe mit EDTA-Zusatz sowie eine zitratstabilisierte Blutprobe wurden der hämatologischen Untersuchung am ADVIA2120® (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, D) zugeführt. Beide hirudinstabilisierten Blutproben wurden als Vollblut für die Bestimmung der Thrombozytenfunktion am Multiplate® Analyser (Roche Diagnostics, Mannheim, D) eingesetzt. Die Probe mit Heparinzusatz und das zweite Röhren mit Zitratzusatz wurden zur Plasmapherese mit 1542 g für 10 Minuten zentrifugiert (Rotina 35, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D). Das Heparinplasma diente der Proteinbestimmung am ABX pentra (HORIBA, Oberursel, D). Aus dem Zitratplasma erfolgte die Bestimmung des Fibrinogens am STA Compact (STA-FIBRINOGEN ⑤, Stago, Düsseldorf, D). Das restliche Zitratplasma wurde bei minus 80°C asserviert.

### 3.2 Material und Methodik der SIRS-Patientenstudie

In die Patientenstudie sollten ausschließlich Tiere mit einer hochgradigen systemischen Entzündungsreaktion eingeschlossen werden. Es handelte sich um akut schwerkranke Patienten, die in der Klinik für Pferde, Innere Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgestellt wurden.

#### 3.2.1 Ein- und Ausschlusskriterien

In die Patientenstudie wurden Warmblutpferde und Kleinpferde jeden Geschlechts (Stuten, Wallache und Hengste) einbezogen, die älter als drei Jahre waren. Die Kriterien für die Auswahl von systemisch schwer kranken Equiden basieren auf den Symptomen eines „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS). Dieser Symptomkomplex wird in Kapitel 2.4 detailliert geschildert. In der eigenen Arbeitsgruppe wurden vor Studienbeginn die unten genannten Kriterien für die Patienten festgelegt. Alle Pferde mussten für den Einschluss in die Studie bei der tierärztlichen klinischen und labormedizinischen Untersuchung mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllen:

- Körpertemperatur  $\geq 39,0^{\circ}\text{C}$  oder  $\leq 36,0^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz  $> 52/\text{min}$
- Atemfrequenz  $> 24/\text{min}$
- Thrombozytenzahl  $< 90 \text{ G/l}$  im EDTA-Blut und  $< 82 \text{ G/l}$  im Zitratblut
- Thrombozytenzahl  $> 370 \text{ G/l}$  im EDTA-Blut und  $> 345 \text{ G/l}$  im Zitratblut
- Leukozytenzahl  $< 3 \text{ G/l}$  oder  $> 15 \text{ G/l}$
- Plasma-Laktat  $\geq 5 \text{ mmol/l}$
- Plasma-Natriumhydrogenkarbonat  $\leq 20 \text{ mmol/l}$

Ausgeschlossen wurden Pferde, die eine Vorbehandlung mit den Thrombozytenfunktionshemmern Acetylsalicylsäure oder Clopidogrel erhielten. Anderweitige Therapien vor Vorstellung in der Klinik wurden dokumentiert, waren aber nicht entscheidend für einen Ausschluss aus der Studie.

### 3.2.2 Klinische Untersuchung

Die klinische Untersuchung erfolgte bei allen Equiden durch die Autorin oder eine eingewiesene diensthabende Tierärztin. Es wurde eine allgemeine, eine zusätzliche allgemeine und eine spezielle Untersuchung der einzelnen Organsysteme nach den üblichen Regeln der Propädeutik durchgeführt. Der BCS wurde wie unter 3.1.2 beschrieben bei allen Kleinpferden erfasst und das Körpergewicht bei einem Großteil der Patienten mittels einer Waage ermittelt.

### 3.2.3 Blutprobenentnahme

Die meisten Patienten erhielten im Rahmen der Eingangsuntersuchung aufgrund der Schwere der Erkrankung einen venösen Verweilkatheter (Teflon, 14 G, Walter, Baruth/Mark, D). Darüber wurden die Blutentnahmeröhrchen unter Verwendung eines Multi-Adapters (Sarstedt, Nümbrecht, D) befüllt. Da die Blutentnahme bei einem Patienten (Nr. 2) aus dem herzwärts geschobenen Venenverweilkatheter mittels Multi-Adapter nicht möglich war, wurde eine Einmalspritze (20 ml, BD Discardit™ II, Heidelberg, D) zur Aspiration des Blutes verwendet, welches direkt anschließend in die Monovetten® transferiert wurde. Die Reihenfolge der verwendeten Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, D) war folgende:

- 1 Serum (4,5 ml)
- 3 Hirudin (2,7 ml)
- 1 Zitrat (9 ml)
- 1 EDTA (2,7 ml)
- 1 Heparin (4 ml)
- 1 Serum (4,5 ml)

Die erste Monovette® wurde verworfen. Verfügte der Patient nicht über einen Venenverweilkatheter, erfolgte die Blutentnahme aufgrund einer anderen Indikation, wie einer indizierten labordiagnostischen Blutuntersuchung oder vor einer intravenösen Arzneimittelgabe. Dafür wurde dem Patienten eine Vasuflo® (17 G, Dispomed®, Gelnhausen, D) herzwärts oder eine Einmalinjektionskanüle (18 G, WDT, Garbsen, D) kopfwärts geschoben. Nach Auskunft der zuständigen Behörde bedurfte die Blutprobenentnahme unter den geschilderten Umständen zu wissenschaftlichen

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Zwecken keiner gesonderten Anzeige bzw. Genehmigung. Die Besitzer wurden mündlich über den Zweck der Probenahme aufgeklärt und stimmten mündlich zu.

### **3.2.4 Verarbeitung und Lagerung des Probenmaterials**

Bis zur labormedizinischen Untersuchung wurden die Proben der Patienten in einem Probenständer senkrecht stehend bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Messungen mit dem Multiplate® Analyzer begannen spätestens eine Stunde nach der Blutprobenentnahme. Die restlichen Messungen wurden spätestens nach zwei Stunden gestartet.

Die drei mit Hirudin stabilisierten Blutproben wurden zur besseren Handhabung für die Untersuchung am Multiplate® Analyzer in ein 9 ml Serumröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, D) umgefüllt. Das EDTA-Blut sowie die mit Zitrat stabilisierte Blutprobe wurden unverändert als Vollblut der weiteren hämatologischen Analytik am ADVIA2120® zugeführt.

Nach den klinisch chemischen Untersuchungen wurden zweimal je 1 ml Heparin- und Zitratplasma sowie das Serum, welches durch Zentrifugieren des Vollbluts gewonnen wurde, in ein Mikroröhrchen (2 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D) pipettiert und bei minus 20°C für gegebenenfalls zu wiederholende Messungen aufbewahrt.

### 3.3 Labormedizinische Analytik

#### 3.3.1 Klinische Chemie

Die Bestimmung klinisch chemischer Parameter am ABX pentra und des Fibrinogens am STA Compact erfolgte durch routiniertes Fachpersonal des Zentrallabors der Klinik für Kleintiere der JLU Gießen. Die Analyse des Laktats und des Natriumhydrogenkarbonats am cobas b 221 Blutgassystem (Roche, Mannheim, D) wurde ebenfalls durch eingewiesenes Personal vorgenommen.

#### 3.3.2 ADVIA2120®

Die Analysen am Hämatologie-System ADVIA2120® wurden durch die Autorin durchgeführt. Für die hämatologische Untersuchung wurde die Blutprobe mit EDTA-Zusatz sowie eine Blutprobe mit Zitratzusatz verwendet. Bei Equiden kann es in mit EDTA-stabilisierten Blutproben zum Auftreten einer sogenannten Pseudothrombozytopenie kommen. Dies kann *in vitro* zu einer erniedrigten Anzahl der Blutplättchen führen (Sellon und Wise 2010). Aus diesem Grund wurde die Thrombozytenzahl bei allen Pferden zusätzlich in zitratstabilisiertem Blut bestimmt.

##### 3.3.2.1 Messtechnik

Das ADVIA2120® Hämatologie-System ist ein vollautomatisiertes Durchflusszytometer. Der Messtechnik liegt das optoelektronische Messprinzip zugrunde. Es basiert auf der Umwandlung von Lichtemissionen in elektronische Daten (Moritz et al. 2014). Das System bietet mehrere Anforderungsprofile, die Vollblut analysieren (Siemens 2005). Für die eigene Studie wurden ein sogenanntes vollständiges Blutbild und ein Leukozyten-Differentialblutbild erstellt. Die Parameter der beiden Profile werden im Folgenden aufgezählt:

- Vollständiges Blutbild (complete blood count, CBC):
  - Leukozytenzahl (LEUKO)
  - Erythrozytenzahl (ERY), Hämatokrit (HKT), mittleres korpuskuläres Erythrozytenvolumen (mean corpuscular volume, MCV), Erythrozyten-Volumenverteilungsbreite (erythrocyte distribution width, EDW)

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

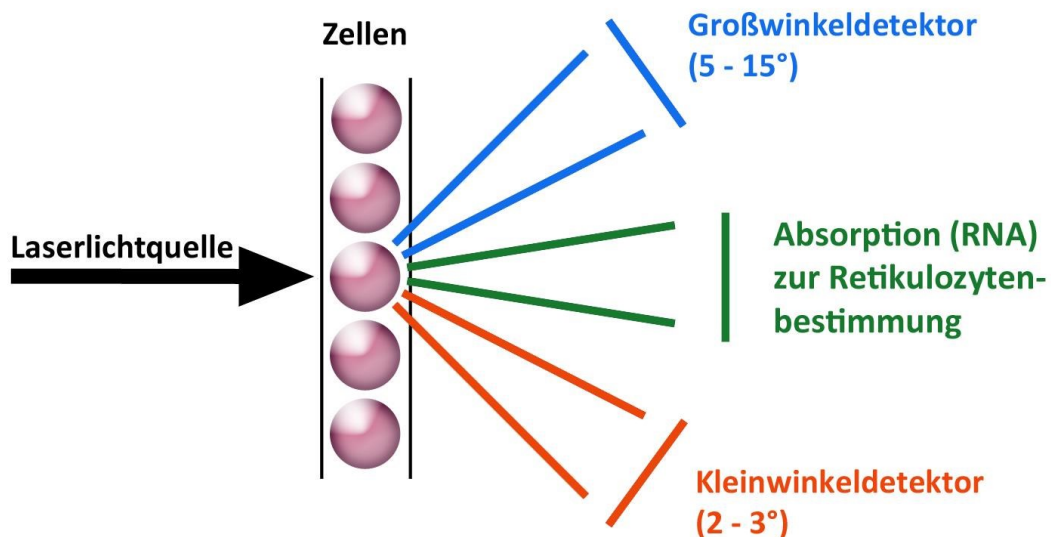
- Hämoglobin (HB), mittleres korpuskuläres Hämoglobin (mean corpuscular hemoglobin, MCH), zellulärer Hämoglobingehalt (cellular hemoglobin, CH), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC bzw. corpuscular hemoglobin concentration mean, CHCM), Hämoglobin-Konzentrationsverteilungsbreite (hemoglobin distribution width, HDW)
- Thrombozytenzahl (THROMBO), mittleres Thrombozytenvolumen (MTV), Thrombozytenverteilungsbreite (platelet distribution width, PDW), Thrombokrit (Plateletcrit, PCT)
- Leukozyten-Differenzialblutbild (DIFF), absolut und prozentual:
  - Neutrophile (NEUT),
  - Lymphozyten (LYMPH),
  - Monozyten (MONO),
  - Eosinophile (EOS),
  - Basophile (BASO),
  - große ungefärbte Zellen (large unstained cells, LUC)

Die Analytik ist für Equiden validiert (Moritz 2001). Die Elektronik, Pneumatik, Hydraulik, Probennehmermechanismen sowie das Abfallsystem sind im Gerät integriert. Über die Software wird mit dem Analysator kommuniziert. Eine Messung dauert wenige Minuten, das Messergebnis wird grafisch und numerisch am Bildschirm veranschaulicht (Siemens 2005).

Die Analyse erfolgt aus EDTA- und zitratstabilisiertem Vollblut, welches vor Messbeginn mehrfach vorsichtig geschwenkt wird. Der ADVIA 2120® saugt 175 µl der Probe ein. Mithilfe eines Scherventils wird die Probe aufgeteilt und in die jeweiligen Reaktionskammern verbracht.

Die Untersuchung der Blutzellen besteht aus zwei Schritten. Zunächst erfolgt eine zytochemische Reaktion, welche die Zellen für das eigentliche Messverfahren vorbereitet und je nach Zelltyp unterschiedlich ist. Im Anschluss werden die Zellen, abhängig vom gewählten Anforderungsprofil, in speziellen Flusszellen mittels

Durchflusszytometrie gemessen. Dabei wird jede einzelne Blutzelle durch einen Licht- oder Laserstrahl beleuchtet. Es wird zum einen die Absorption der Zelle erfasst und zum anderen das entstehende Streulicht durch einen Großwinkel- und einen Kleinwinkeldetektor gemessen (Siemens 2005). Das optoelektronische Messprinzip ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.



**Abb. 1: Optoelektronisches Messprinzip des ADVIA2120®**

### 3.3.2.2 Erythrozyten und Thrombozyten

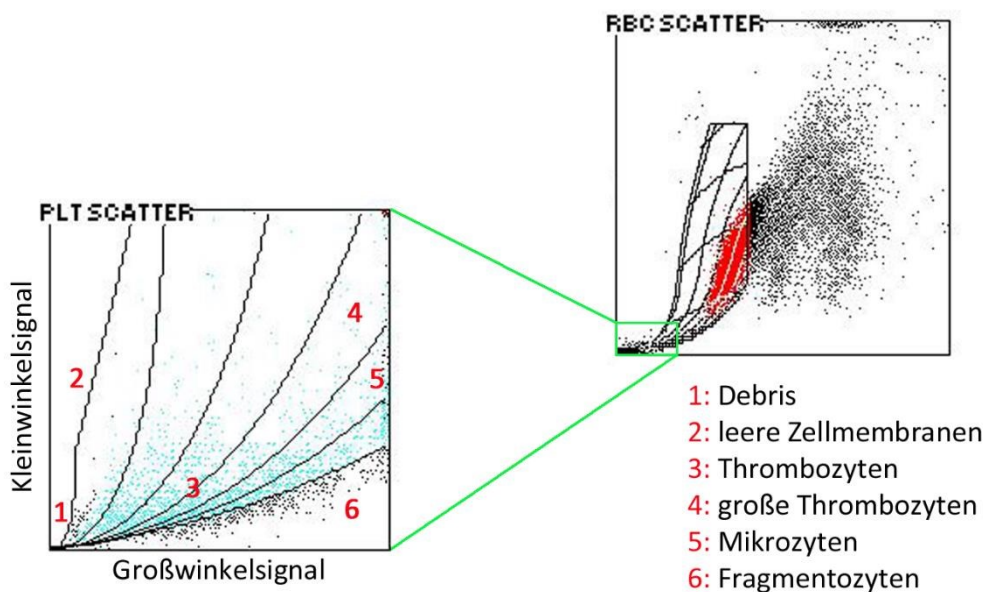
Ein Teil der Probe gelangt mithilfe des Scherventils in die ERY-Reaktionskammer. Zunächst werden die Erythrozyten und Thrombozyten mit Laurylsulfat isovolumetrisch aufgekugelt und in einem weiteren Schritt durch Zugabe von Glutaraldehyd fixiert.

Nach Abschluss der zytochemischen Reaktionen gelangt die Probe in die Flusszelle. Diese ist in eine Optikeinheit integriert, welche einen Illuminator und die Detektoren beinhaltet. Die Streuungssignale, die durch das Auftreffen der Lichtstrahlen auf die Erythrozyten und Thrombozyten resultieren, werden von den Detektoren in einem Kleinwinkel- (2-3°) und einem Großwinkel- (5-15°) Bereich erfasst. Zur speziellen Analytik der Thrombozyten wird das Kleinwinkelstreulicht um das 30-fache und das Großwinkelstreulicht um das 12-fache verstärkt. Die Signale der Erythrozyten werden hingegen unverändert detektiert. Eine Aussage über die Zellgröße liefert das

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Kleinwinkelstreulicht, während das Großwinkelstreulicht über die intrazelluläre Beschaffenheit informiert.

Werden diese beiden Messgrößen gemeinsam betrachtet (Abb. 2), spricht man von Doppelwinkelsignalen der Zellen. Die Doppelwinkelsignale der Blutplättchen werden mithilfe der Mie-Theorie, benannt nach dem deutschen Physiker Gustav Mie, über die Lichtstreuung an homogenen Kugelkörpern in das Zellvolumen und den Brechungsindex umgerechnet. Der Brechungsindex für Thrombozyten liegt zwischen 1,35 und 1,40 (Siemens 2005). Zellvolumen und Brechungsindex werden durch eine im Gerät integrierte Software zur Einteilung in Thrombozyten, große Thrombozyten, Erythrozyten, Erythrozyten-Fragmente und Erythrozyten-Ghosts (leere Zellmembranen) genutzt. Thrombozyten über 20 fl sind als „groß“ definiert. Erythrozyten-Fragmente besitzen ein Volumen unter 30 fl und einen Brechungsindex über 1,40. Bei den leeren Zellmembranen liegt der Brechungsindex unter 1,35 (Siemens 2005). Die Doppelwinkelsignale der Zellen werden zur Veranschaulichung in einem Scattergramm (Streulicht-Zytogramm) dargestellt (Abb. 2).



**Abb. 2: RBC Scatter und PLT Scatter eines Probanden;** y-Achse = Signalstärke des Kleinwinkelstreulichts (Zellvolumen), x-Achse = Signalstärke des Großwinkelstreulichts (RBC Scatter: Hämoglobingehalt, PLT Scatter: Brechungsindex), Thrombozyten befinden sich in dem RBC Scatter links unten

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Durch die beschriebenen Messverfahren werden die Anzahl, die Größe und die Größenverteilung der Thrombozyten und Erythrozyten im Blut bestimmt. Die folgenden Indizes zur vollständigen Charakterisierung der Thrombozyten werden zudem rechnerisch ermittelt (Siemens 2005):

- Mittleres Thrombozytenvolumen (mean platelet volume, MPV)
- Thrombokrit (plateletcrit, PCT)
- große Thrombozyten ab einem Volumen von 20 fl (large platelets, large PLT)
- Thrombozytenverteilungsbreite (platelet distribution width, PDW)
- mittlere Konzentration der Thrombozytenbestandteile (mean platelet component concentration, MPC)
- Verteilungsbreite der MPC (platelet component distribution width, PCDW)
- mittlere Thrombozytenmasse (mean platelet mass, MPM)
- Verteilungsbreite der Thrombozytenmasse (platelet mass distribution width, PMDW)
- Anzahl der Thrombozytenagglutinate (PLT Clumps Count).

Das MPV und die MPC werden in den späteren Kapiteln der Dissertationsarbeit erwähnt, die restlichen thrombozytären Indizes werden nicht näher besprochen. Für die detaillierte Analyse der Erythrozyten werden ebenfalls Indizes berechnet, auf welche in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher eingegangen wird.

### **3.3.2.3 Leukozyten**

Zur Analyse der Leukozyten wird jeweils eine Doppelmessung zum einen im Basophilenkanal und zum anderen im Peroxidasekanal des ADVIA2120® durchgeführt. Die Doppelbestimmung in jedem Kanal dient einer internen Qualitätskontrolle. Beide Ergebnisse werden miteinander verglichen. Überschreitet die Differenz der beiden Messungen pro Kanal einen definierten Wert, wird eine Fehlermeldung unter Kennzeichnung der dafür verantwortlichen Werte angezeigt (Siemens 2005).

Zunächst werden bei der Basophilen-Methode durch eine zytochemische Reaktion die Erythrozyten und Thrombozyten mittels Säure und Surfactant lysiert. Anschließend erfolgt das zytoplasmatische „Stripping“ der Leukozyten mittels Phthal- und Salzsäure,

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

welches zu einer Separierung des Zellkerns führt. Eine Ausnahme stellen die basophilen Granulozyten dar, die aufgrund ihrer deutlich stabileren Zellmembran intakt bleiben. Somit können sie leicht von den verbliebenen kleineren Zellkernen der anderen Leukozyten unterschieden werden. Bei dem optoelektronischen Messprinzip werden die Zellkerne anhand ihrer Größe und der Dichte ihres Kernchromatins unterschieden (Moritz et al. 2014). Dies erlaubt eine Unterteilung der Leukozyten in mononukleäre (Monozyten, Lymphozyten) und polymorphkernige (neutrophile und eosinophile Granulozyten) Zellen sowie basophile Granulozyten.

Der erste Schritt der zytochemischen Reaktion der Perox-Methode beginnt mit der Lyse von Erythrozyten durch Hinzugabe von Surfactant und einer Erhitzung in der Reaktionskammer. Anschließend werden die Leukozyten durch Formaldehyd fixiert. Durch Zugabe von zwei weiteren Reagenzien kommt es zu einer zytochemischen Anfärbung der endogenen Peroxidase. Die Farbtintensivität hängt von der jeweiligen Peroxidaseaktivität ab. Granulozyten besitzen einen höheren Peroxidasegehalt als mononukleäre Zellen. Basophile und LUC lassen sich aufgrund ihrer fehlenden Peroxidase nicht anfärben. Der endogene Peroxidasegehalt wird anhand einer Messung im Halogenlicht ermittelt (Siemens 2005).

### **3.3.3 Multiplate® Analyzer**

#### **3.3.3.1 Messprinzip**

Der Multiplate® Analyzer dient der Analyse der Thrombozytenfunktion (Calatzis et al. 2007). Das Messprinzip beruht auf der Impedanzaggregometrie nach Cardinal und Flower (1980). In der Humanmedizin wird das Gerät routinemäßig eingesetzt, um unter anderem die Wirkung der Thrombozytenhemmer Acetylsalicylsäure, Clopidogrel, Glykoprotein IIb-IIIa-Antagonisten und direkter ADP-Rezeptor-Antagonisten zu überprüfen (Roche 2013).

Dabei wird es als Point-of-Care Gerät (Görlinger et al. 2008; Fries und Streif 2015) verwendet. Der Analyzer kann patientennah genutzt werden und liefert rasch Ergebnisse, dadurch können klinische Entscheidungsprozesse beschleunigt werden.

Der Begriff „Multiplate“ leitet sich von „multiple platelet function analyzer“ ab und bedeutet, dass gleichzeitig bis zu fünf Testprozeduren durchführbar sind (Calatzis et al.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

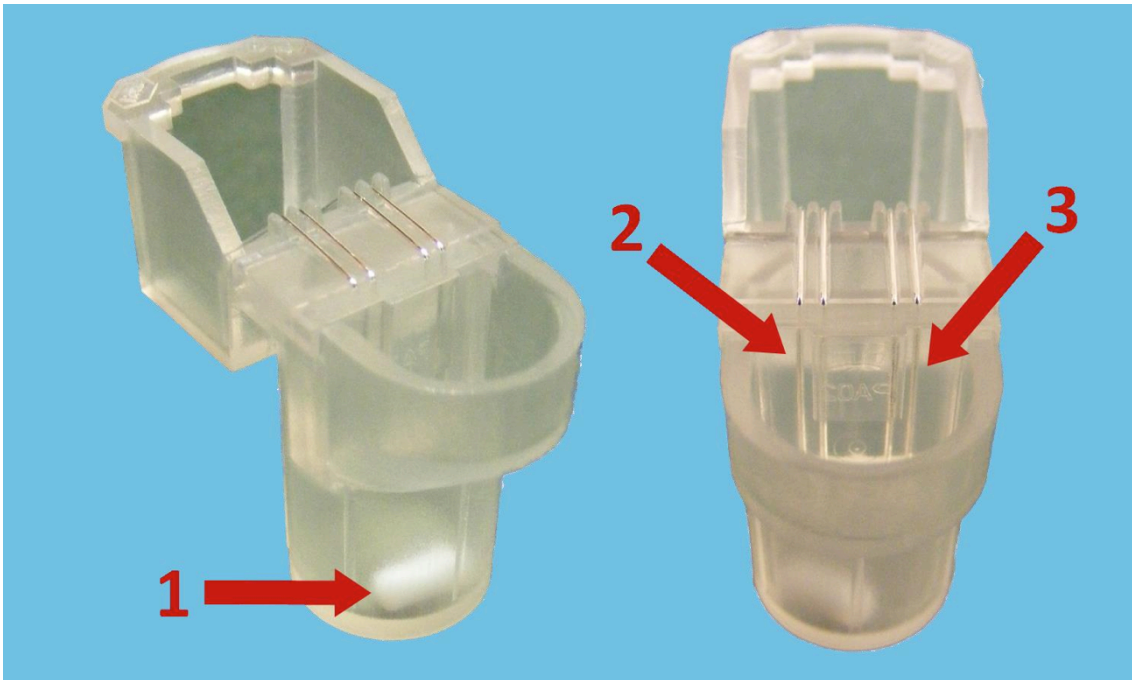
2007). Vier Elektroden befinden sich in einer Messzelle, dabei bilden je zwei einen Sensor. Dies erlaubt eine Doppelmessung im gleichen Material zur gleichen Zeit. Es sind fünf beheizbare Plätze für je eine Messzelle im Multiplate® Analyzer vorhanden. Sind die Messzellen in ihren Platz eingefügt, müssen die jeweiligen Elektroden manuell mit einem Kabel verbunden werden, das in das Gerät integriert ist. Das Gerät ist mit einem Monitor und einer elektrischen Pipette ausgestattet. Der Wärmeblock, in den die Messzellen und die zur Probenverdünnung verwendete Kochsalzlösung eingebracht werden, befindet sich in der Mitte. Die Aktivatoren werden ganz vorne in die vorgesehenen Halterungen eingesetzt (Abb. 3).



**Abb. 3: Multiplate® Analyzer**

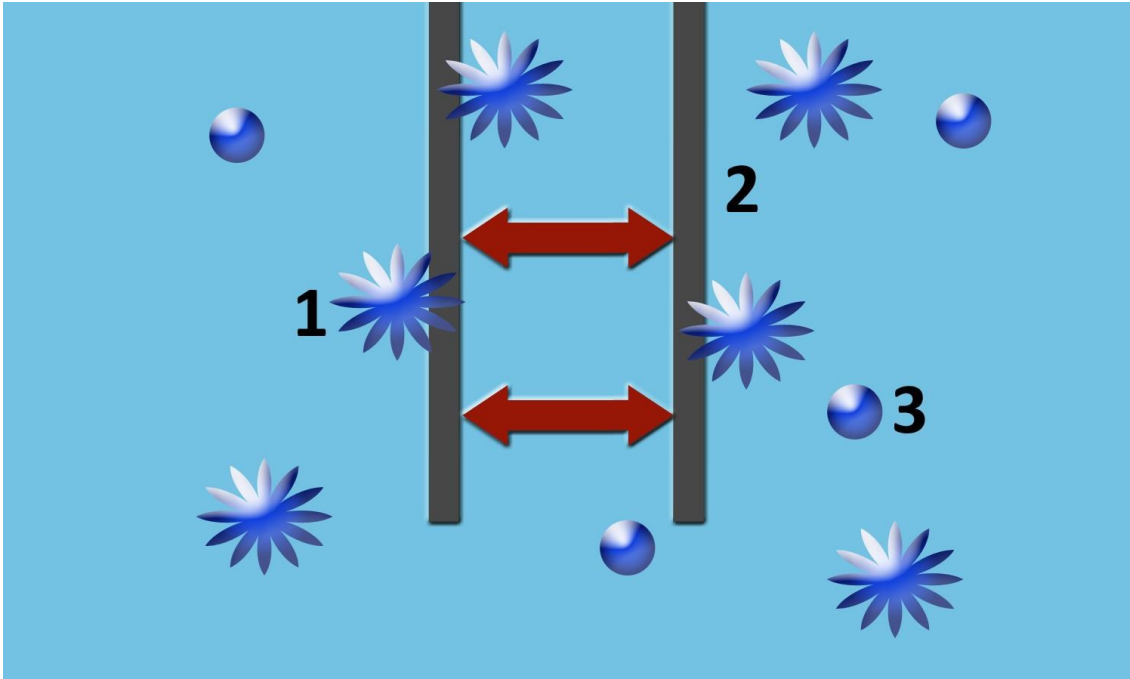
Da das System fünf Möglichkeiten um Messzellen einzusetzen enthält, kann eine Blutprobe gleichzeitig unter maximal fünf verschiedenen Bedingungen getestet werden. Dafür werden unterschiedliche Thrombozytenaktivatoren zugefügt. Die Einwegmesszellen enthalten zwei unabhängige Sensoren, die aus je zwei silberbeschichteten Kupferelektroden bestehen (Abb. 4). In jeder Messzelle befindet

sich zudem ein aus Polytetrafluorethylen beschichteter Magnetrührstab. Während der Messung wird die Probe mit einer Frequenz von 800 U/min gerührt. Hinter jeder Messzelle befindet sich ein Sensorkabel, welches die Verbindung zwischen der Messzelle und dem Computer herstellt. Vor den Messzellen wird isotone Kochsalzlösung in Aussparungen des Wärmeblocks auf 37°C erwärmt. Die Kochsalzlösung dient der Verdünnung der Probe. Vor dem Wärmeblock befindet sich ein Reagenzienhalter für die Aktivatoren. Die seitlich angebrachte elektronische Pipette kann entweder automatisiert oder manuell betätigt werden (Calatzis et al. 2007).



**Abb. 4: Messzellen des Multiplate® Analyzers;** zwischen zwei unabhängigen Sensoren (2 und 3), wird der elektrische Widerstand bestimmt. Auf dem Boden befindet sich der Magnetrührstab (1)

Das Prinzip der Thrombozytenfunktionsmessung am Multiplate® Analyzer beruht auf dem Anhaften und Aggregieren von aktivierten Thrombozyten auf körperfremden Oberflächen, welche durch die Elektroden in den Messzellen repräsentiert werden. Der mit steigender Thrombozytenaggregation zunehmende elektrische Widerstand zwischen den beiden Elektroden wird gemessen und aufgezeichnet (Abb. 5).



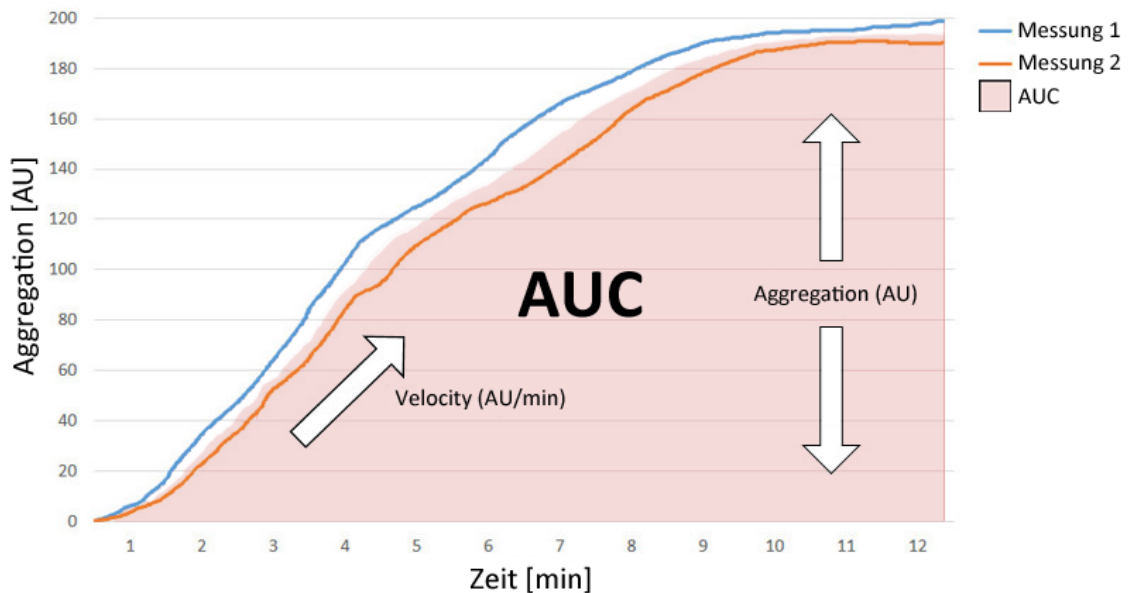
**Abb. 5: Schematische Darstellung des Messprinzips des Multiplate® Analyzers;** Anhaften von aktivierten Thrombozyten (1) an Elektroden (2), dadurch erhöht sich der elektrische Widerstand zwischen den Drähten (rote Pfeile). Einige Thrombozyten sind noch nicht aktiviert (3)

Das Messverfahren bestimmt ausschließlich Thrombozyten, die an die Elektroden der Messzellen anhaften und aggregieren. Die Aktivierung der Blutplättchen erfolgt durch den Zusatz verschiedener Agonisten in die Messzellen. Aus der Messung des elektrischen Widerstands über die Zeit werden drei Parameter berechnet, die „Area under the Curve“ (AUC), die Aggregation und die „Velocity“ (Calatzis et al. 2007). Die AUC ist der klinisch genutzte Parameter und wird von der Aggregationsgeschwindigkeit und der maximal erreichten Aggregation bestimmt. Die Aggregation entspricht der maximalen Höhe der Kurve und die „Velocity“ der maximalen Steigung der Aggregationskurve. Die beiden letzten genannten Parameter werden bisher ausschließlich für Forschungszwecke genutzt (Calatzis et al. 2007).

Grafisch werden die Messungen als Achsendiagramm dargestellt (Abb. 6). Dabei werden auf der x-Achse die Zeit in Minuten und auf der y-Achse die vom Hersteller gewählten Aggregationseinheiten („Aggregation Units“) in AU aufgezeichnet. Die Einheit der AUC entspricht somit AU multipliziert mit Minute: AU\*min. Da sich bei der Ergebnisdarstellung in AU\*min recht hohe Zahlenwerte ergeben, wird diese durch eine

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

vom Hersteller integrierte Software in die für Praktiker einfacher zu erfassende Einheit „Unit“ (U) modifiziert. Dabei werden die Messwerte in AU\*min durch 10 Minuten geteilt, sodass 10 AU\*min 1 U entsprechen (Calatzis et al. 2007).



**Abb. 6: Darstellung der Ergebnisse am Multiplate® Analyzer;** In jeder Messzelle werden zur internen Kontrolle zwei Messungen simultan durchgeführt (blaue und rote Messkurve). Für die Berechnung der AUC wird deren Mittelwert verwendet.

Die Aufzeichnung der Messungen erfolgt für jeden der beiden Sensoren unabhängig voneinander. Der Computer rechnet den Korrelationskoeffizienten zwischen den an beiden Elektroden gemessenen Werten aus. Dies dient der internen Qualitätskontrolle. Sobald der Korrelationskoeffizient unter 0,98 liegt oder die Fläche unter der Aggregationskurve um mehr als 20% vom Mittelwert abweicht, empfiehlt der Hersteller eine Messwiederholung. Dem wurde bei Auftreten der Abweichungen Folge geleistet. Von den insgesamt 324 Messungen der 61 Probanden und 20 Patienten wurden 28 wiederholt.

Ein Beispiel für die vom Gerät ausgegebenen Informationen nach einer Einzelmessung am Multiplate® Analyzer gibt die Abb. 7.

Multiplate® platelet function analysis - V2.03.11

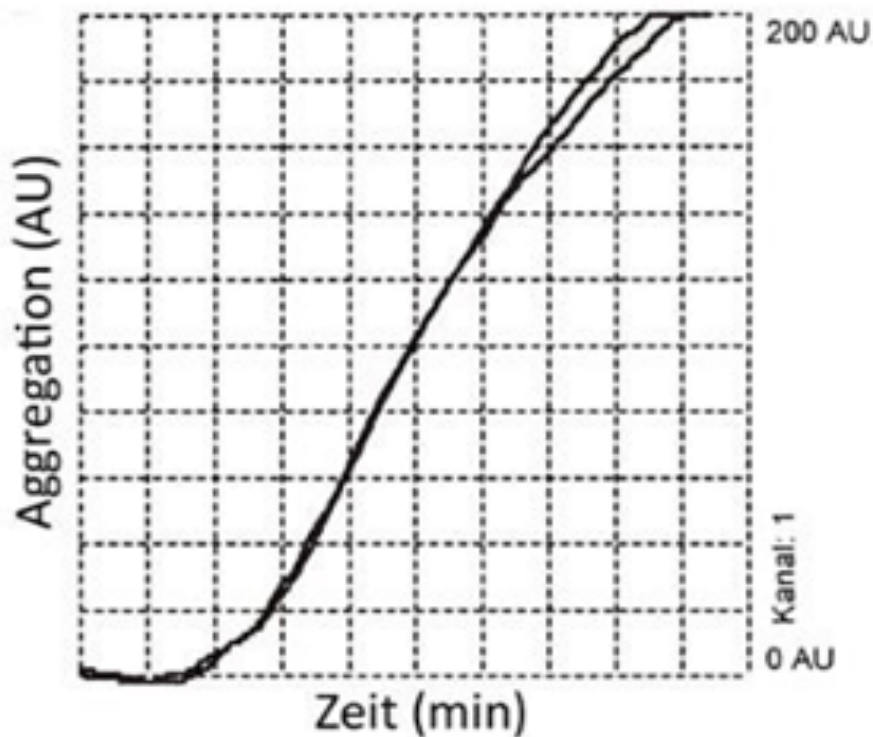
Patienten ID :

Testname :COLtest 1,6µg, V1

Messung gestartet :13. Aug. 2014, 09:51:00

**Area under the Curve :184 U**

Aggregation : RUO: 212.6 AU - Velocity : RUO: 12.5 AU/min.

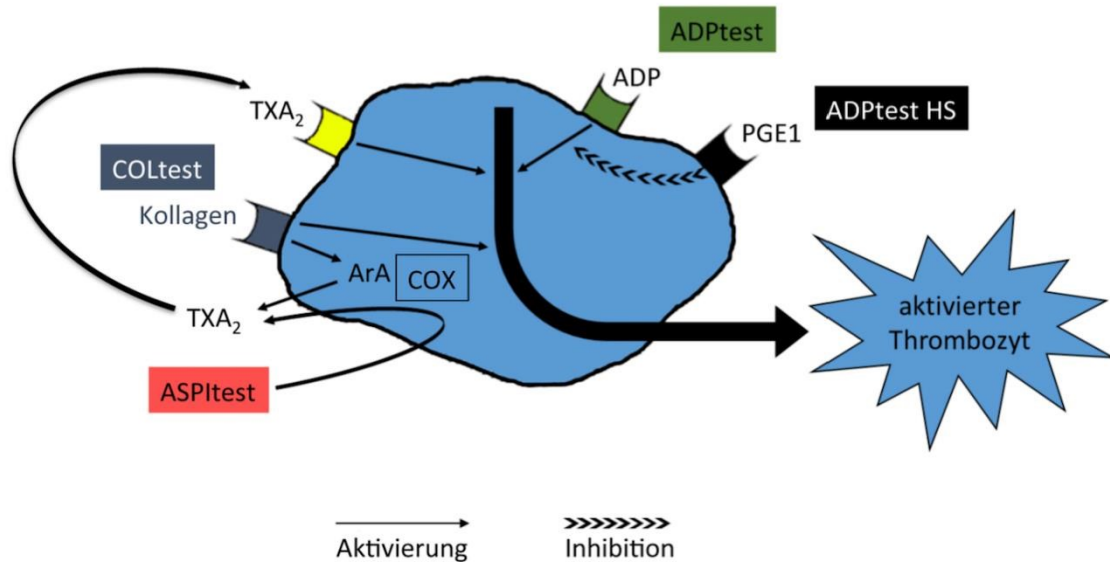


**Abb. 7: Beispielhafte Darstellung des Ergebnisses am Multiplate® Analyzer für den COLtest**

### 3.3.3.2 Messablauf

Für die Analyse am Multiplate® Analyzer wurden hirudinstabilisierte Vollblutproben eingesetzt. Initial erfolgten eine elektronische Kontrolle des Systems sowie die Vorbereitung der Reagenzien. Anschließend wurden die Messzellen in den Wärmeblock eingesetzt, um eine Erwärmung auf 37°C zu gewährleisten. Als Thrombozytenaktivatoren wurden in der eigenen Studie Kollagen (COLtest),

Adenosindiphosphat (ADPtest), ADPtest mit Prostaglandin E<sub>1</sub> (ADPtest HS) und Arachidonsäure (ASPItest) verwendet (Abb. 8). Im Folgendem werden die einzelnen Aktivierungswege geschildert (Calatzis et al. 2007).



**Abb. 8: Schematische Darstellung der Thrombozytenaktivierung durch die eingesetzten Aktivatoren** (modifiziert nach Calatzis et al. 2007)

Kollagen, ein äußerst potenter thrombozytärer Aktivator, bindet an den Kollagenrezeptor der Thrombozyten. Es kommt zu einer Aktivierung der Blutplättchen. Zusätzlich erfolgt die Freisetzung von Arachidonsäure, die über die Cyclooxygenase zunächst zum Zwischenprodukt Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) metabolisiert und anschließend durch die Thromboxansynthase in TXA<sub>2</sub> umgewandelt wird. Dieses Substrat wirkt über spezifische Rezeptoren aggregationsfördernd.

Im ASPItest wird Arachidonsäure eingesetzt. Diese ist selbst kein direkter thrombozytärer Aktivator. Der Wirkmechanismus erfordert intrazelluläre PGH<sub>2</sub> Bildung wie beim COLtest (s.o.) beschrieben.

Adenosindiphosphat aktiviert Thrombozyten über die ADP-Rezeptoren, die sich auf der Thrombozytenoberfläche befinden.

Der ADPtest HS beinhaltet die beiden Substrate Adenosindiphosphat und Prostaglandin E<sub>1</sub>. Der endogene Inhibitor PGE<sub>1</sub> aktiviert die Adenylatcyclase. Dies bewirkt einen intrazellulären Anstieg des cAMP. Das Molekül hemmt die ADP-

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

induzierte Aktivierung durch den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor. Es kommt zu einer schwächeren Aktivierung des Thrombozyten durch das ADP, da nur der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor stimuliert wird (Yang et al. 2010). Die Gabe von PGE<sub>1</sub> in Kombination mit dem ADPtest macht den ADPtest HS sensitiver für den Effekt von speziellen ADP-Rezeptor-Antagonisten wie Clopidogrel.

Die in Pulverform in Glasflaschen vorliegenden Aktivatoren wurden durch Zugabe eines jeweils für den Test definierten Volumens an Aqua dest. gelöst. Laut Hersteller sind die angemischten Aktivatoren mit Ausnahme des COLtests bei einer Lagerung von minus 20°C bis zu vier Wochen stabil. Daher wurden diese für weitere Messungen in diesem Zeitraum aliquotiert. Das Abfüllen der in Lösung befindlichen Aktivatoren in Safe Seal Gefäße (1,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht, D) erfolgte automatisiert durch die Funktion „elektronische Hilfsmittel“ der Multiplate® Analyzer-Software. Dabei wurde für den ADPtest 50 µl, ADPtest HS 30 µl und ASPItest 40 µl pipettiert, da diese Volumina für weitere Einzelmessungen benötigt wurden. Bei Bedarf wurden die bei minus 20°C gelagerten Aliquote kurz vor der Messung bei Zimmertemperatur aufgetaut. Der COLtest wurde, wie vom Hersteller empfohlen, im Originalbehälter für maximal sieben Tage bei einer Temperatur zwischen 2 und 8°C gelagert.

Jede Blutprobe wurde gleichzeitig für Messungen der Thrombozytenfunktion in den fünf Messzellen verwendet. Zunächst wurde in jede Messzelle je 300 µl vorgewärmte isotone Kochsalzlösung pipettiert. Anschließend wurden ebenfalls je 300 µl des vorab vorsichtig sechsmal über Kopf geschwenkten Vollblutes eingefügt. Es folgte eine dreiminütige Inkubationszeit. Bei den vier unten in Tabelle 1 genannten Tests erfolgte nun die Zugabe der entsprechenden Aktivatoren. Die Konzentrationen der eingesetzten Aktivatoren sind ebenfalls in Tab. 1 aufgeführt. In die fünfte Messzelle wurden 20 µl isotone Kochsalzlösung gegeben ohne weitere Aktivatoren. Dies diente der Kontrolle einer Spontanaggregation (Bampalis et al. 2012).

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

**Tab. 1: Übersicht der eingesetzten Aktivatoren**

Test	Substanzen	Aktivierungsweg	Konzentration	Volumen ( $\mu$ l)	Endkonzentration in Probe
COLtest	Kollagen	Kollagenrezeptor	1,6 $\mu$ g/ml	20	0,107 $\mu$ g/ml
ADPtest	ADP	P2Y <sub>1</sub> -und P2Y <sub>12</sub> -Rezeptoren	6,5 $\mu$ M	20	0,4 nmol/ml
ADPtest HS	ADP + PGE <sub>1</sub>	Sensitivität des ADP-Rezeptors erhöht	6,5 $\mu$ M + 9,4 nM	je 20	0,4 nmol + 0,0006 nmol/ml
ASPItest	Arachidonsäure	TXA <sub>2</sub> -Rezeptor	0,75 mM	30	75 nmol/ml

Sobald sich alle Lösungen in den Zellen befanden, wurden die Messungen automatisch gestartet. Nach zwölf Minuten konnten die Ergebnisse auf dem Monitor eingesehen und bei Bedarf ausgedruckt werden. Die Daten wurden durch die Autorin manuell in eine Excel-Tabelle übertragen. Anschließend wurden die Messkanäle für die nächsten Messungen freigeschaltet. Da es sich um Einwegmesszellen handelt, wurden diese nach jeder Messung entsorgt.

### **3.4 Statistische Auswertung**

#### **3.4.1 Ermittlung der Referenzintervalle für Kleinpferde**

Das Erstellen der Referenzintervalle für die klinisch unauffälligen Kleinpferde erfolgte durch die Autorin unter Verwendung des Programms „Reference Value Advisor v2.1“, erhältlich als Freeware auf <http://www.biostat.envt.fr/reference-value-advisor/> (letzter Zugriff Dezember 2019). Dieses Programm ist für Microsoft® Excel konfiguriert und basiert auf den Richtlinien der „International Federation of Clinical Chemistry“ (IFCC) und des „Clinical and Laboratory Standards Institute“ (CLSI) (Geffré et al. 2011). Für die deskriptive Statistik wurden Stichprobenumfang, Mittelwert, Standardabweichung bzw. Median sowie Minimum und Maximum eingesetzt. Die Normalverteilung der Datensätze wurden durch den Anderson-Darling Test überprüft und grafisch als Histogramme dargestellt. Als Test auf Ausreißer wurden die Dixon-Reed und Tukey’s Tests angewandt.

Da die Daten nicht normalverteilt waren und der Stichprobenumfang zwischen 40 und 120 betrug, kamen die robuste oder die nichtparametrische Methode zum Einsatz. Bei Verwendung der robusten Methode erfolgte eine Box-Cox-Transformation damit die Daten symmetrischer verteilt sind (Geffré et al. 2011). Zur Veranschaulichung erstellte die Autorin Streudiagramme der einzelnen Tests unter Zuhilfenahme des Programms GraphPadPrism® 6.

#### **3.4.2 Unterschiede in der Thrombozytenfunktion der Referenzintervall-Population**

Die statistische Untersuchung auf mögliche Unterschiede in der Thrombozytenfunktion zwischen den beiden Gruppen, den gesunden Warmblütern einerseits und den gesunden Kleinpferden andererseits, erfolgte durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen mit dem Programm BMDP3D, Release 8.1. Es wurden der t-Test bei normalverteilten Daten und der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test bei nicht normalverteilten Variablen verwendet. Die grafischen Darstellungen erfolgten als Box-and-Whisker-Diagramme, die mittels des Programms GraphPad Prism® 6 durch die Autorin erstellt wurden. Dabei ist auf der x-Achse die Rasse und auf der y-Achse die

AUC in Units (U) der einzelnen Tests abgebildet. Die Box repräsentiert 50 % der Messergebnisse und die horizontale Linie in der Box den Median. Die untere und obere horizontale Linie am Ende der Box veranschaulichen das erste Quartil und das dritte Quartil. Minimum und Maximum werden von den horizontalen Linien am Ende der Whisker gekennzeichnet.

### **3.4.3 Einfluss ausgewählter hämatologischer Variablen auf die Thrombozytenfunktion**

Zur Überprüfung einer Abhängigkeit der Thrombozytenfunktion von ausgewählten hämatologischen Variablen wurde eine Regressionsanalyse durch das Statistikprogramm BMDP6D, Release 8.1 erstellt. Details sind unter 3.4.6 der Patientenstudie beschrieben.

### **3.4.4 SIRS-Patienten**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Dafür wurde das Statistikprogramm BMDP, Release 8.1 verwendet. Die deskriptive Statistik erfolgte mit dem Programm BMDP1D. Es wurden der Stichprobenumfang, die Mittelwerte, die Standardabweichungen, Median sowie die Minima und Maxima der Messungen am Multiplate® Analyser und ADVIA2120® erhoben. Die grafischen Darstellungen als Streudiagramme wurden durch die Autorin mithilfe des Programms GraphPad Prism® 6 angefertigt. Die horizontale Linie zwischen den einzelnen Punkten repräsentiert den Median.

### **3.4.5 Unterschiede der Thrombozytenfunktion zwischen den Kontrollgruppen und den SIRS-Patienten**

Für die Prüfung auf statistisch signifikante Unterschiede in der thrombozytären Funktion wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Dafür diente das Programm BMDP7D. Es wurden die AUCs des Multiplate® Analyzers als Hauptzielparameter bzw. als abhängige Variable verwendet. Die unabhängigen Faktoren waren Gesundheitsstatus (Kontrolle vs. SIRS) und Rasse (Kleinpferd vs.

Warmblut). Um die zweifaktorielle Varianzanalyse anwenden zu können, wurden Daten mit einer schiefen Verteilung vorab logarithmiert. Wie üblich wurde ein Ergebnis als signifikant eingestuft, wenn der berechnete p-Wert  $< 0,05$  betrug.

Die Ergebnisse der einzelnen Tests wurden grafisch als Box-and-Whisker-Diagramme dargestellt. Auf der x-Achse sind die Rassen (Kleinpferd vs. Warmblut) bzw. die Gruppe (Gesund vs. SIRS) und auf der y-Achse die AUC in Units (U) der jeweiligen Tests verzeichnet.

### **3.4.6 Einfluss ausgewählter hämatologischer Variablen auf die Thrombozytenfunktion bei SIRS-Patienten**

Es wurde eine bivariate Regressionsanalyse zur Untersuchung einer möglichen Abhängigkeit der Thrombozytenfunktion von ausgewählten hämatologischen Variablen (Leukozytenzahl, Erythrozytenzahl, Hämatokrit, Thrombozytenzahl, MPC und MPV) mit dem Programm BMDP6D, Release 8.1 angefertigt. Für die thrombozytäre Funktion wurde die AUC der vier Funktionstest verwendet. Dabei wurden die hämatologischen Variablen in der Berechnung als unabhängige und die AUC als abhängige Variable zugeordnet. Zur Überprüfung einer Signifikanz der Regression wurde der p-Wert ermittelt. Als ein statistisch signifikantes Ergebnis wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  festgelegt.

### **3.5 Ergebnisse zur Ermittlung der Referenzintervalle bei Kleinpferden**

Da pro Funktionstest mit Ausnahme des ADPtest HS mehr als fünf Blutproben der 20 initial beprobten gesunden Kleinpferde am Multiplate® Analyser außerhalb der jeweiligen Referenzintervalle von gesunden Warmblutpferden (Held 2018) lagen, war die Erstellung eigener Referenzintervalle für die kleineren Equiden notwendig (Friedrichs et al. 2012).

#### **3.5.1 Probandendaten**

Für die Erstellung von Referenzintervallen der Thrombozytenfunktion für Kleinpferde am Multiplate® Analyser wurden insgesamt 62 Probanden erfasst. Davon schied ein Equide aufgrund erhöhter Werte der Leukozyten und Globulinkonzentration aus (siehe 3.1.1), sodass 61 Probanden in die Studie eingeschlossen wurden. Es handelte sich um 16 Islandpferde, elf Shetlandponys, neun Haflinger, acht Kleinpferde ohne genaue Rassezugehörigkeit, vier Liebenthaler Wildpferde, vier Norweger, drei deutsche Reitponys, zwei Connemara, zwei Dülmener und zwei Tinker. Von den 61 Kleinpferden waren 32 Wallache und 29 Stuten. Das Alter der Tiere lag bei  $13,3 \pm 6,3$  Jahren (4-26 Jahre). Der BCS betrug  $3,5 \pm 0,5$  (2–4/5). Das berechnete Gewicht der Probanden lag zwischen 156 und 490 kg ( $352,2 \pm 96,8$  kg). Bei zwei Ponys (Nr. 5 und Nr. 21) konnte das genaue Körpergewicht mittels einer Pferdewaage ermittelt werden. Individuelle Angaben zu den 61 Probanden sind im Anhang (S. 148-149, Tab. A2) ersichtlich.

#### **3.5.2 Klinische Untersuchung**

Zum Zeitpunkt der Untersuchung zeigten alle Kleinpferde ein ruhiges und aufmerksames oder vereinzelt ein etwas aufgeregtes Verhalten. Die allgemeine und die zusätzlich allgemeine Untersuchung sowie die speziellen Untersuchungen der einzelnen Organsysteme waren ohne besonderen Befund und kein Proband wies klinisch Hinweise auf eine akute systemische Entzündung auf.

#### **3.5.3 Hämatologie und klinischen Chemie**

Abweichungen von mehr als zwei Entzündungsvariablen vom Referenzintervall wurden im Vorfeld als Ausschlusskriterium festgelegt (siehe 3.1.1). In der unten aufgeführten

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab. 2 sind die Ergebnisse der Entzündungsvariablen, die entscheidend für den Verbleib der Probanden in der Studie gewesen sind, dargestellt.

**Tab. 2: Leukozyten, Globuline und Fibrinogen der 61 gesunden Kleinpferde**

	MW	SD	Median	Min	Max	RI
<b>WBC (10<sup>9</sup>/l)</b>	6,15	1,34	5,85	3,31	11,47	4,37-8,96
<b>Globuline (g/l)</b>	33,9	4,5	33,8	25,9	46,3	23,1-42,1
<b>Fibrinogen (g/l)</b>	1,76	0,34	1,68	1,10	2,78	1,25-3,29

WBC: Leukozytenzahl, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, Min: niedrigster gemessener Wert, Max: höchster gemessener Wert, RI: Referenzintervall

Bei der Erstellung des vollständigen Blutbildes und des Differenzialblutbildes am ADVIA2120® zeigten zwei Probanden, Nr. 28 und 44, eine geringgradige Leukopenie mit 3,31 und 4,32 x 10<sup>9</sup>/l und ein Weiterer, Nr. 6, eine geringgradige Leukozytose mit 11,47 x 10<sup>9</sup>/l (Referenzintervall 4,37-8,96 x 10<sup>9</sup>/l).

Die Bestimmung der klinisch chemischen Variablen am ABX pentra ergab bei zwei Probanden einen geringgradig erhöhten Globulinwert (Referenzintervall 23,07-42,09 g/l), und zwar bei Nr. 18 mit 46,3 g/l und bei Nr. 53 mit 44,3 g/l. Die weiteren klinisch chemischen Variablen und das Fibrinogen lagen bei allen eingeschlossenen Probanden nicht über dem Referenzintervall.

### 3.5.4 Multiplate® Analyzer Resultate bei gesunden Kleinpferden

Die folgende Tab. 3 gibt einen Überblick über die thrombozytäre Funktion der 61 gesunden Kleinpferde, wie sie mit Hilfe des Multiplate® Analyzers ermittelt wurden.

**Tab. 3: Multiplate® Testergebnisse (AUC in U; n = 61)**

	MW	SD	Median	Min	Max
<b>COLtest</b>	261	79	265	44	401
<b>ADPtest</b>	164	101	125	16	367
<b>ADPtest HS</b>	141	105	93	7	355
<b>ASPItest</b>	95	99	41	2	321

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, Min: niedrigster gemessener Wert, Max: höchster gemessener Wert

Die aus diesen Daten ermittelten Referenzintervalle für alle vier Thrombozytentests des Multiplate® Analyzers sind zusammengefasst in Tab. 4 dargestellt. Zum Vergleich wurden die von Held (2018) erstellten Referenzintervalle der klinisch unauffälligen Warmblüter ebenfalls aufgeführt.

**Tab. 4: Referenzintervalle für Multiplate® Analyzer Tests bei klinisch unauffälligen Kleinpferden und Warmblütern (AUC in U)**

	COLtest	ADPtest	ADPtest HS	ASPItest
<b>Kleinpferd</b>	<b>78-398</b> (n = 61)	<b>22-367</b> (n = 61)	<b>10-355</b> (n = 60)	<b>3-319</b> (n = 59)
<b>Warmblut (Held 2018)</b>	<b>135-438</b> (n = 59)	<b>62-413</b> (n = 60)	<b>33-348</b> (n = 60)	<b>42-343</b> (n = 60)

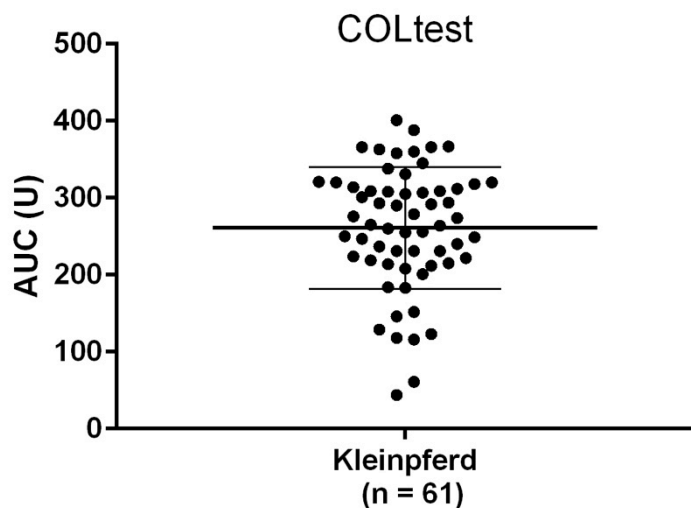
Anhand dieses Vergleichs lässt sich erkennen, dass die unteren Grenzwerte der gesunden Kleinpferde bei allen vier Tests niedriger liegen als bei den Warmblütern. Bis auf den ADPtest HS liegen die oberen Grenzwerte ebenfalls unterhalb der Werte der Großpferde. Auf die detaillierten Ergebnisse der einzelnen Thrombozytentests und zur Berechnung der Referenzbereiche wird in den Folgekapiteln separat eingegangen. Dabei wird jeweils ausschließlich die AUC als relevanter Parameter der Thrombozytenfunktion dargestellt. Für jeden Test findet sich ein Streudiagramm, so dass die individuellen AUCs erkennbar sind. Die mittlere horizontale Linie stellt den Mittelwert dar, während die zwei kürzeren horizontalen Linien die

Standardabweichung repräsentieren. Im Anhang befindet sich eine Übersichtstabelle der Werte aller 61 Probanden (S. 150-151, Tab A3).

### 3.5.4.1 COLtest

Alle 61 AUCs beim COLtest des Multiplate® Analyzers befanden sich innerhalb der geräteeigenen Kontrollbereiche und wurden in die statistischen Berechnungen einbezogen. Der Mittelwert lag bei 261 U, der Median bei 265 U, die Standardabweichung betrug 79 U, der niedrigste Wert lag bei 44 U und der höchste bei 401 U. Die Ergebnisse sind als Streudiagramm in Abb. 9 dargestellt. Bereits aus der Punktwolke ist ersichtlich, dass bei Erstellung einer Häufigkeitsverteilung eine leicht rechtsschiefe Verteilung mit wenigen sehr niedrigen Werten vorliegt. Im COLtest fallen zwei Probanden (Nr. 6 und 8) mit Minima von 44 und 61 U besonders auf.

Aufgrund der nicht symmetrischen Datenverteilung wurde die robuste Box-Cox transformierte Methodik zur Erstellung des Referenzintervalls verwendet. Damit wurde eine symmetrische Verteilung der Messwerte erreicht. Für den COLtest wurde ein Referenzintervall zwischen 78 und 398 U errechnet.

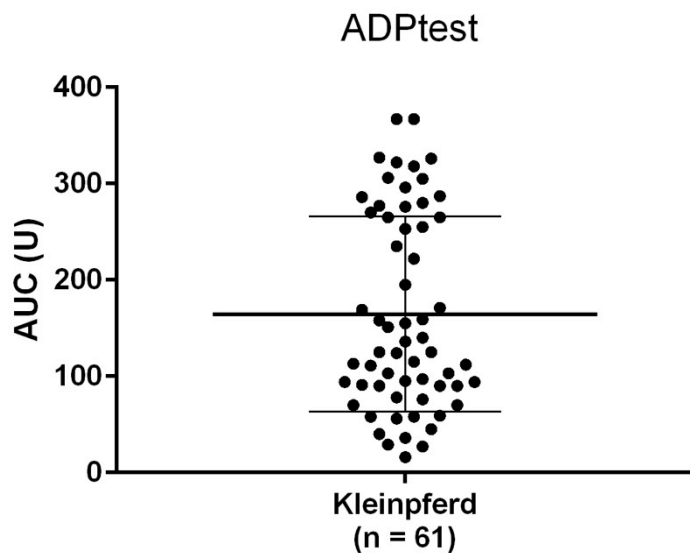


**Abb. 9: COLtest Ergebnisse (AUC in U) am Multiplate® Analyzer bei gesunden Kleinpferden (n = 61)**

### 3.5.4.2 ADPtest

Auch alle Ergebnisse des ADPtests befanden sich innerhalb der internen Bereichskontrolle. Daher gingen alle AUCs in die folgenden Berechnungen ein. Der Mittelwert lag bei 164 U, der Median bei 125 U, die Standardabweichung betrug 101 U, der niedrigste gemessene Wert lag bei 16 U, der höchste Wert bei 367 U. Die Ergebnisse sind in Abb. 10 dargestellt. Die Grafik zeigt, dass sich die AUC-Werte des ADPtests in zwei Subpopulationen aufzuteilen scheinen.

Da die Messwerte trotz einer Box-Cox-Transformation nicht symmetrisch verteilt waren, wurde die nichtparametrische Methodik zur Berechnung des Referenzintervalls angewandt: es beträgt für den ADPtest bei Kleinpferden 22 bis 367 U.

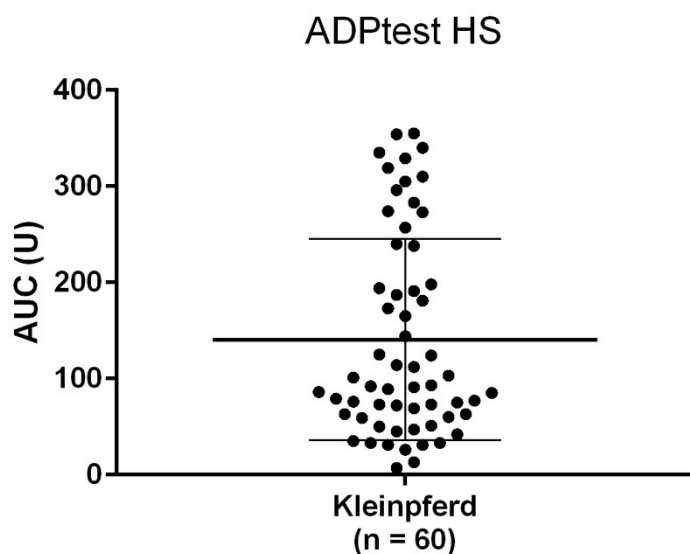


**Abb. 10: ADPtest Ergebnisse (AUC in U) am Multiplate® Analyser bei gesunden Kleinpferden (n = 61)**

**3.5.4.3 ADPtest HS**

Für diesen Thrombozytentest wurden die Werte der AUC von insgesamt 60 Probanden in die Berechnungen einbezogen. Die Ergebnisse von Proband Nr. 56 mussten ausgeschlossen werden, da die an den beiden unabhängigen Sensoren in einer Messzelle bestimmten Werte zu stark voneinander abwichen sowie die berechnete AUC auch bei der Messwiederholung um mehr als 20% vom Mittelwert abwich. Der ADPtest HS Mittelwert lag bei 141 U, der Median bei 93 U, die Standardabweichung betrug 105 U, der niedrigste gemessene Wert lag bei 7 U, der Höchste bei 355 U. Grafisch sind die Ergebnisse in Abb. 11 dargestellt. Die Punktwolke repräsentiert eine eher linksschiefe Häufigkeitsverteilung, wobei auch einige hohe Werte vorkommen. Wie beim ADPtest lässt sich auch bei diesem Test eine zweigeteilte Subpopulation erahnen. Dabei waren dieselben Patienten in beiden Tests hoch bzw. niedrig. Eine statistische Analyse zwischen dem ADPtest und ADPtest HS durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen wurde nicht durchgeführt.

Wegen der nach Box-Cox-Transformation weiterhin nicht symmetrisch verteilten Werte wurde die nichtparametrische Methode zur Erstellung des Referenzintervalls genutzt. Für den ADPtest HS ergab sich ein Referenzintervall von 10 bis 355 U.

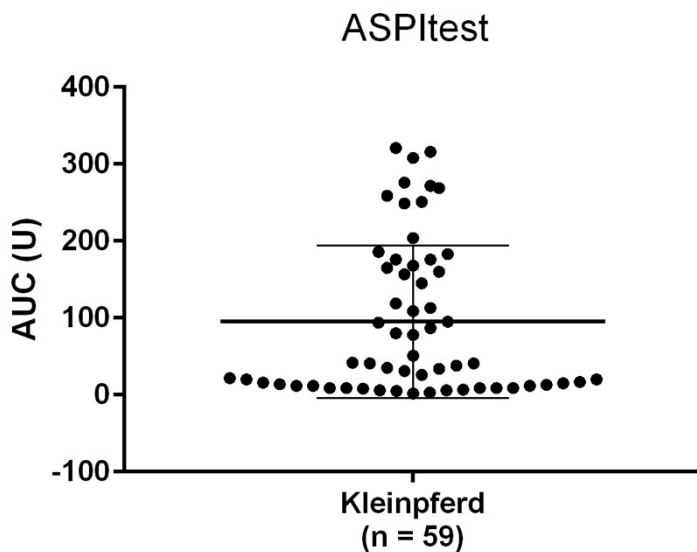


**Abb. 11: ADPtest HS Ergebnisse (AUC in U) am Multiplate® Analyser bei gesunden Kleinpferden (n = 60)**

#### 3.5.4.4 ASPItest

Aufgrund der um mehr als 20% abweichenden Mittelwerte der AUCs wurden die Ergebnisse zweier Probanden (Nr. 9 und 39) nicht in die statistische Analyse eingeschlossen, sodass für den ASPItest 59 Tiere in die Berechnung eingingen. Der Mittelwert lag bei 95 U, der Median bei 41 U, die Standardabweichung betrug 99 U, der niedrigste Wert lag bei 2 U und der Höchste bei 321 U. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 dargestellt. Es zeigt sich eine stark linksschiefe Verteilung, wobei sich 37 von den insgesamt 59 Messungen unter einem Wert von 100 U befinden.

Für die Ermittlung des Referenzintervalls für den ASPItest wurde wegen der nicht normalverteilten Ergebnisse die nichtparametrische Methodik genutzt. Es ergab sich ein Referenzintervall für den ASPItest von 3 bis 319 U, was fast die gesamte Spannweite der Ergebnisse umfasst.



**Abb. 12: ASPItest Ergebnisse (AUC in U) am Multiplate® Analyzer bei gesunden Kleinpferden (n = 59)**

**3.5.5 Vergleich der Thrombozytenfunktion bei Kleinpferden und Warmblutpferden**

Es wurden die AUCs aller vier Multiplate® Tests zwischen gesunden Warmblütern (Held 2018) und gesunden Kleinpferden (eigene Untersuchungen) verglichen (s. Tab. 5).

**Tab. 5: Thrombozytenfunktionstests am Multiplate® Analyzer bei gesunden Kleinpferden und gesunden Warmblütern (AUC in U)**

		<b>COLtest</b> <b>p = 0,046</b>	<b>ADPtest</b> <b>p = 0,018</b>	<b>ADPtest HS</b> <b>p = 0,057</b>	<b>ASPItest</b> <b>p &lt; 0,0001</b>
<b>Kleinpferd</b>		<b>n = 61</b>	<b>n = 61</b>	<b>n = 60</b>	<b>n = 59</b>
	<b>MW ± SD</b>	261 ± 79	164 ± 101	141 ± 105 (Median 93)	95 ± 99 (Median 41)
	<b>Min - Max</b>	44 - 401	16 - 367	7 - 355	2 - 321
<b>Warmblut (Held 2018)</b>		<b>n = 59</b>	<b>n = 60</b>	<b>n = 60</b>	<b>n = 60</b>
	<b>MW ± SD</b>	289 ± 73	199 ± 79	160 ± 80	191 ± 73
	<b>Min - Max</b>	132 - 440	49 - 422	26 - 388	25 - 361

MW: Mittelwert; SD: Standardabweichung; Min: Minimum; Max: Maximum

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, dass Kleinpferde im Vergleich zu den Warmblütern in allen vier verwendeten Tests niedrigere Werte aufweisen. Im statistischen Vergleich erwies sich lediglich der ADPtest HS der Kleinpferde als nicht signifikant unterschiedlich zu den Werten der Warmblüter. Im COLtest wurde eine knappe statistische Signifikanz von 0,046 ermittelt. Der ADPtest der Kleinpferde zeigt eine deutliche statistische Signifikanz von  $p = 0,018$ . Den größten Unterschied mit einem hochsignifikanten Wert von  $p < 0,0001$  ist allerdings im ASPItest erkenntlich. Auf die einzelnen Tests wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen.

### 3.5.5.1 COLtest

Für den COLtest wurden die Ergebnisse der eigenen 61 gesunden Kleinpferde mit jenen von 59 gesunden Warmblutpferden aus der Dissertation von Held 2018 verglichen. Da die Daten normalverteilt waren wurde der t-Test verwendet.

Es ergab sich ein schwach signifikanter Unterschied ( $p = 0,046$ ). Der Mittelwert der AUC lag bei den Kleinpferden mit  $261 \pm 79$  U leicht unter dem der Warmblüter mit  $289 \pm 73$  U. Bei den Kleinpferden war die Spanne (357 U) der AUC mit einem Minimum von 44 U und Maximum von 401 U etwas größer als bei den Warmblütern (308 U) mit den Grenzwerten 132 U und 440 U. Grafisch ist der Vergleich zwischen Kleinpferd und Warmblut in der unten aufgeführten Abb. 13 zu sehen.

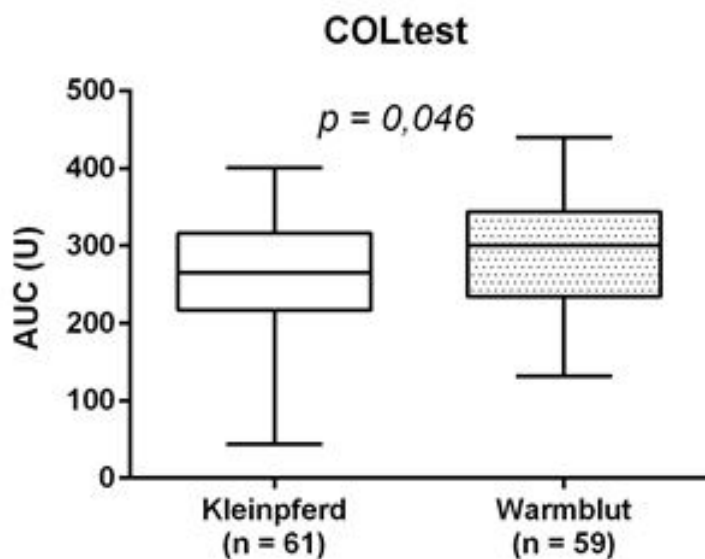


Abb. 13: COLtest bei gesunden Kleinpferden (n = 61) und gesunden Warmblutpferden (n = 59; nach Held 2018)

### 3.5.5.2 ADPtest

Für die statistischen Auswertungen des ADPtests wurde aufgrund nicht normalverteilter Daten der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Dafür wurden Ergebnisse der eigenen 61 gesunden Kleinpferde und 60 gesunden Warmblutpferde (Held 2018) genutzt.

Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,018$ ). Der Mittelwert lag bei den Kleinpferden mit  $164 \pm 101$  U auch hier unter dem der Warmblüter von  $199 \pm 79$  U. Anders als der statistisch signifikante Unterschied suggeriert, erwiesen sich die Werte von lediglich 6 Kleinpferden unter dem Minimum der Warmblüter. Demgegenüber lagen lediglich 3 Warmblüter über dem Maximum der Kleinpferde. In Abb. 14 ist der Vergleich der beiden Rassengruppen dargestellt.

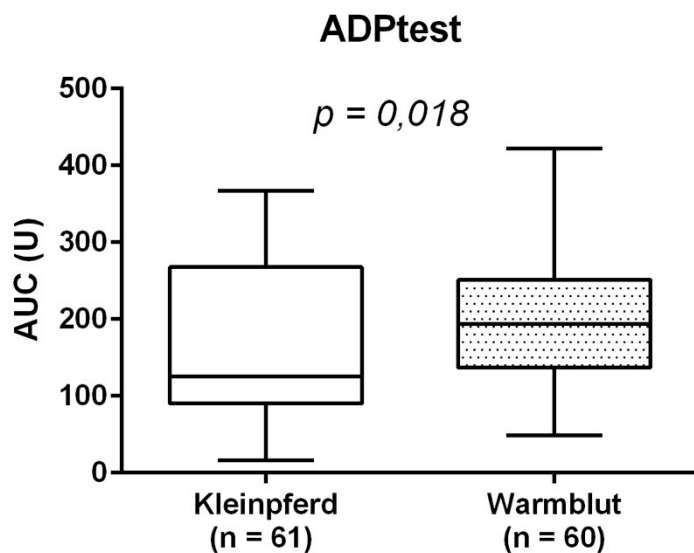
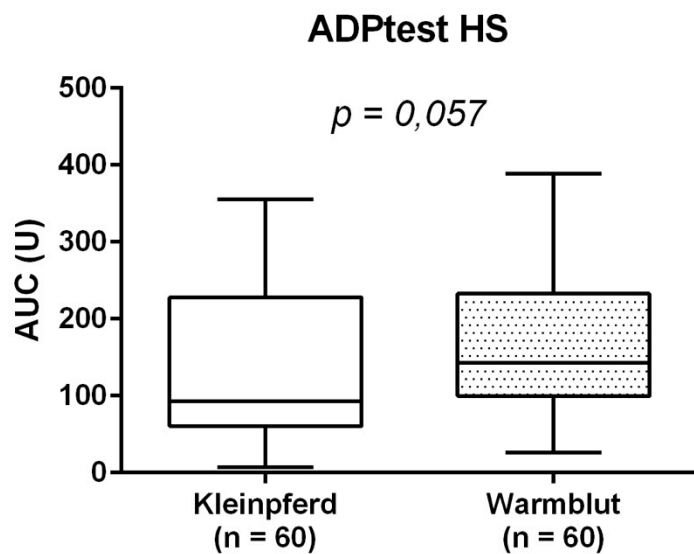


Abb. 14: ADPtest bei gesunden Kleinpferden (n = 61) und gesunden Warmblutpferden (n = 60; nach Held 2018)

### 3.5.5.3 ADPtest HS

Für diesen Thrombozytentest wurden die Ergebnisse von 60 gesunden Kleinpferden der eigenen Untersuchungen mit jenen der 60 gesunden Warmblutpferde aus den Untersuchungen von Held (2018) verglichen. Dafür wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet, da die Daten nicht normalverteilt waren.

Es wurde knapp kein signifikanter Unterschied zwischen den Groß- und Kleinpferden festgestellt ( $p = 0,057$ ). Der Mittelwert der AUC lag bei den Kleinpferden mit  $141 \pm 105$  U (Median 93) tendenziell unter dem der Warmblüter von  $160 \pm 80$  U (Abb. 15).

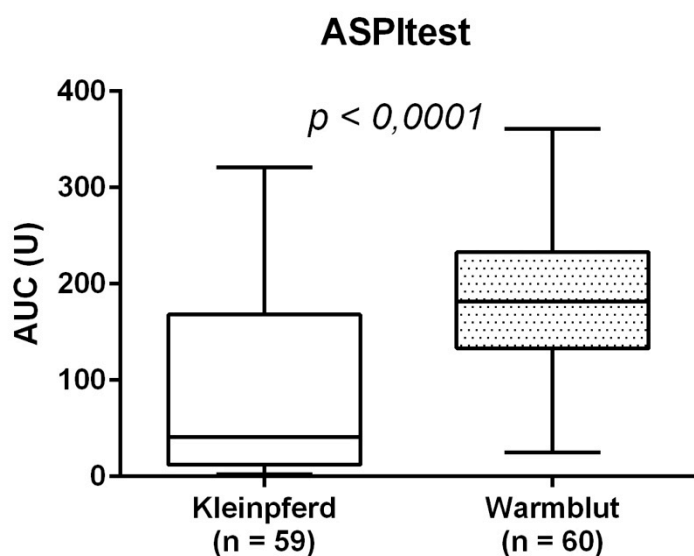


**Abb. 15: ADPtest HS bei gesunden Kleinpferden (n = 60) und gesunden Warmblutpferden (n = 60; nach Held 2018)**

#### 3.5.5.4 ASPItest

Die Ergebnisse der ASPItests von 59 gesunden Kleinpferden aus der eigenen Arbeit sowie die der 60 gesunden Warmblüter (Held 2018) wurden statistisch verglichen. Aufgrund der nicht normalverteilten Daten wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test eingesetzt.

Es ergab sich ein hoch signifikanter Unterschied von  $p < 0,0001$ . Der Mittelwert der AUC lag bei den Kleinpferden mit  $95 \pm 99$  U (Median 41) deutlich unter dem der Warmblüter von  $191 \pm 73$  U. Allerdings sind bei den Kleinpferden eine große Streuung und schiefe Verteilung der Messwerte zu verzeichnen. Die Spanne bei den Kleinpferden war mit 319 U (Min. 2 U, Max. 321 U) ähnlich weit wie bei den Warmblütern mit 336 U (Min. 25 U, Max. 361 U). Bei den Kleinpferden zeigte sich im Gegensatz zu den Warmblütern eine deutliche Anhäufung der Messergebnisse in der unteren Hälfte der Spanne (Abb. 16).



**Abb. 16: ASPItest bei gesunden Kleinpferden (n = 59) und gesunden Warmblutpferden (n = 60; nach Held 2018)**

### **3.5.6 Korrelationen zwischen ausgewählten hämatologischen Variablen und der Thrombozytenfunktion**

Die Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, MPC, MPV sowie Erythrozytenzahl und Hämatokrit wurden im Hinblick auf ihren möglichen Einfluss auf thrombozytäre Funktionen ausgewertet, da in der Human- und Veterinärmedizin ähnliche Studien publiziert wurden (Lüthje 1989, Moritz et al. 2005, Tóth et al. 2006, Segura et al. 2007, Kim et al. 2014). Außerdem ist anhand der eigenen Studie die Fragestellung, ob allein eine veränderte Thrombozytenzahl die mittels Multiplate® Analyser feststellbaren thrombozytären Funktionen beeinflusst, zu klären. In der eigenen Arbeitsgruppe wurden bereits Korrelationen zwischen hämatologischen Parametern und Multiplate® Ergebnissen bei 60 gesunden Warmblütern berechnet. Dabei konnten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den oben genannten Variablen und den AUCs der vier Multiplate® Tests nachgewiesen werden (Held 2018). Detaillierte Ergebnisse der eigenen gesunden Kleinpferde sind im Anhang, S. 152, Tab. A4 dargestellt.

#### **3.5.6.1 Leukozytenzahl**

Anhand der Regressionsanalyse wurde für die Leukozytenzahl und alle vier Thrombozytentests ein statistisch signifikanter Zusammenhang ermittelt. Die p-Werte waren 0,004 (COLtest), 0,02 (ADPtest), 0,04 (ADPtest HS) und 0,03 (ASPItest). Die jeweiligen Korrelationskoeffizienten lagen für den COLtest bei 0,37, ADPtest bei 0,30, ADPtest HS bei 0,27 und den ASPItest bei 0,29. Trotz der Signifikanzen waren die Zusammenhänge somit nur schwach ausgeprägt.

#### **3.5.6.2 Thrombozytenzahl und thrombozytäre Variablen**

Die Thrombozytenzahl besaß keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Thrombozytenfunktion.

Es ergaben sich zwischen dem MPC und ADPtest bzw. ADPtest HS statistisch signifikante Zusammenhänge mit  $p = 0,03$  bzw.  $0,04$ . Hier bestand ein negativer Zusammenhang – je niedriger die MPC, umso höher die Aktivierbarkeit der Thrombozyten in den beiden genannten Tests. Mit Korrelationskoeffizienten von  $-0,28$  bzw.  $-0,26$  waren die Zusammenhänge aber nur sehr schwach ausgeprägt.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Für den ADPtest und den ADPtest HS und die thrombozytäre Variable MPV wurde ebenfalls ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit je  $p = 0,007$  berechnet. Es ergaben sich Korrelationskoeffizienten von je 0,34. Auch damit ergaben sich nur schwache Zusammenhänge.

### **3.5.6.3 Variablen des roten Blutbildes**

Es ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen Erythrozytenzahl und Hämatokrit und den vier Multiplate® Tests.

### **3.6 Ergebnisse der SIRS-Patientenstudie**

#### **3.6.1 Patientendaten**

In die von September 2014 bis März 2016 laufende Patientenstudie wurden 20 systemisch schwer erkrankte Equiden eingeschlossen. Es handelte sich um elf Warmblutpferde, drei Haflinger, zwei Islandpferde, zwei Ponys unbekannter Rasse, ein Connemara und ein Pony-Mix. Die Geschlechterverteilung lag bei acht Stuten und zwölf männlichen Pferden, darunter ein Hengst. Die Pferde und Kleinpferde wiesen ein mittleres Alter von  $14,4 \pm 7,26$  Jahren (4 bis 29 Jahren) auf. Bei 14 der 20 Kranken konnte das Gewicht mittels einer Pferdewaage erfasst werden, dies lag bei  $496,4 \pm 78,4$  kg (393-630 kg). Der BCS wurde bei 18 Patienten erhoben, dieser war bei  $3,3 \pm 0,8$  von 5 (2 bis 4/5). In Tab. 6 sind die Stammdaten aller 20 Patienten zusammengefasst.

Alle Pferde litten unter schwerwiegenden systemischen Erkrankungen, die individuellen Hauptdiagnosen sind ebenfalls in Tab. 6 aufgelistet. Die Dauer der jeweiligen Krankheitssymptome variierte von perakut (seit wenigen Stunden) bis chronisch (länger als sechs Wochen). Von den 20 Patienten mussten 14 aufgrund der Schwere ihrer Erkrankung bzw. aus finanziellen Gründen euthanasiert werden, die anderen sechs Patienten haben die Erkrankung überlebt und sind entlassen worden.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

**Tab. 6: Übersicht der SIRS-Patienten**

Nr.	Rasse	Alter	Geschl.	BCS	Gewicht	Diagnose	Dauer	Verl.
1	Isländer	7	W	3	393	Viraler Infekt	perakut	G
2	Haflinger	10	H	4	538	Magenruptur	perakut	Eu
3	WB	7	W	3	*	Ileitis	perakut	Eu
4	Haflinger	17	S	4	461	Enteritis	akut	G
5	WB	17	W	3	630	Fieber unkl. Gen.	akut	Eu
6	Haflinger	17	W	4	504	Typhlocolitis	perakut	Eu
7	Pony	7	W	4	*	Typhlocolitis	perakut	Eu
8	WB	17	S	4	566	Druse	akut	G
9	Pony-Mix	18	S	4	421	Lipoma pend.	perakut	Eu
10	WB	12	W	2	534	Hepatitis	subakut	Eu
11	Isländer	20	W	2	465	Lymphosarkom	chronisch	Eu
12	WB	5	S	4	552	Fieber unkl. Gen.	perakut	G
13	WB	19	W	4	618	Pneumonie	akut	Eu
14	WB	20	W	3	448	Lungenödem	akut	Eu
15	Pony	29	W	3	*	Lipoma pend.	perakut	Eu
16	WB	10	S	2	421	Lungenfibrose	chronisch	Eu
17	Con.	4	S	3	399	Dysphagie	akut	G
18	WB	5	S	*	*	Typhlocolitis	akut	Eu
19	WB	22	S	4	*	Intraabd. Abszess	chronisch	G
20	WB	26	W	*	*	Lipoma pend.	perakut	Eu

BCS: Body Condition Score (max. 5), Gewicht in kg, Verl.: Verlauf, Con.: Connemara, WB: Warmblut, H: Hengst, S: Stute, W: Wallach, unkl. Gen: unklarer Genese, pend.: pendulans, intraabd.: intraabdominal, perakut: wenige Stunden, akut: 1 Tag bis 4 Tage, chronisch: > 6 Wochen, Eu: Euthanasie, G: Gesund entlassen, \*: nicht bestimmt

### 3.6.2 Klinische Untersuchung

Alle in die Patientenstudie eingeschlossenen Equiden zeigten zum Zeitpunkt der klinischen Untersuchung ein mindestens mittelgradig gestörtes Allgemeinbefinden.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Herz- und Atemfrequenz sowie Körperinnentemperatur sind in Tab. 7 zusammengefasst. Bei 19 von 20 Tieren war die Herzfrequenz erhöht (über 44/min). 16 Patienten wiesen eine gesteigerte Atemfrequenz auf. Bei einem Pferd (Nr. 20) wurde die Atemfrequenz nicht erfasst, da aufgrund des hochgradig gestörten Allgemeinbefindens eine beschleunigte klinische Untersuchung und eine gezielte weiterführende Diagnostik durchgeführt und das Pferd wegen infauster Prognose anschließend direkt euthanasiert wurde. Aus demselben Grund wurde bei Pferd Nr. 18 die Körperinnentemperatur nicht gemessen. Bei 12 Patienten wurden veränderte Schleimhäute bemerkt. Davon zeigten acht gerötete, ein Patient zyanotische und drei blasse Schleimhäute. Ein Kleinpferd, Nr. 6, hatte zusätzlich neben geröteten auch toxisch verwaschene Schleimhäute.

**Tab. 7: Ausgewählte Parameter der klinischen Untersuchung**

Parameter	Einheit	MW	SD	Min	Max
Herzfrequenz	Schläge/min	64,2	17,9	40	108
Atemfrequenz	Züge/min	33,9	20,2	12	80
Temperatur	°C	38,3	1,1	35,8	40,3

MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, Min: niedrigster Wert, Max: höchster Wert

### 3.6.3 ADVIA2120® Ergebnisse bei Patienten

Bei der hämatologischen Untersuchung des Blutes am ADVIA2120® zeigten fünf Patienten eine deutliche Leukopenie < 3 G/l und sechs Equiden wiesen eine Leukozytose > 15 G/l auf. Die Leukozytenzahlen der restlichen neun Tiere lagen im Referenzintervall des ADVIA2120® von 4,37 bis 8,96 G/l oder wichen lediglich ganz geringgradig davon ab (siehe Tab. 8).

Die in mit EDTA-stabilisiertem Vollblut gemessenen Thrombozyten wiesen bei sechs Patienten eine deutliche Erniedrigung von 19 bis 69 G/l auf. Die Anzahl im Zitratblut war ebenfalls erniedrigt, aber lediglich fünf Patienten zeigten ebenfalls eine Thrombozytopenie von 33 bis 73 G/l. Die Thrombozytenzahl bei Patient Nr. 17 betrug im EDTA-Blut 37 G/l, während im Zitratblut 156 G/l gemessen wurden. Dies lässt auf

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

eine EDTA-induzierte Pseudothrombozytopenie schließen. Eine Thrombozytose bestand bei keinem Patienten.

### 3.6.4 Klinische Chemie

Da Abweichungen in den klinisch chemischen Parametern zum Einschluss in die SIRS-Gruppe bei 15 der 20 Patienten führten (siehe 3.2.1), sind sie im Folgenden näher beschrieben und in Tab. 8 aufgeführt.

Bei 15 von 20 Patienten wurde der Laktatwert (Grenzwert < 1,7 mmol/l) bestimmt. Dieser lag zwischen 0,5 und 12,8 mmol/l und bei sieben Patienten über dem für einen Einschluss definierten Wert von 5 mmol/l. Der mittlere Laktatwert betrug  $5,7 \pm 4,7$  mmol/l. Für das Natriumhydrogenkarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) konnten 16 Messungen einbezogen werden. Der mittlere Wert für  $\text{HCO}_3^-$  betrug  $23,9 \pm 3,4$  mmol/l mit einer Spanne von 18,8 bis 29,8 mmol/l, wobei vier Equiden Werte von  $\leq 20$  mmol/l aufwiesen. Bei fünf Patienten (Nr. 11, 12, 16, 17, 19) wurden zusätzlich die Globuline (errechnet am ABX pentra, HORIBA; Oberursel, Deutschland) und das Fibrinogen gemessen. Davon zeigten zwei Tiere eine Erhöhung der Globuline über den oberen Grenzwert von 42,09 g/l und zwar Patient Nr. 11 minimal mit 42,3 g/l, aber Patient Nr. 19 mit 70,0 g/l. Drei Patienten wiesen einen Anstieg des Fibrinogens über das Referenzintervall von 1,25 bis 3,29 g/l auf. Es handelte sich um die Probanden Nr. 12 mit 3,92 g/l, Nr. 16 mit 3,73 g/l und Nr. 19 mit 6,16 g/l. Bei Pferd Nr. 19, das einen intraabdominalen Abszess aufwies, wurde auch der maximale Globulinwert (70 g/l) bestimmt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab. 8: Individuelle Ergebnisse labormedizinischer Parameter der 20 SIRS-Patienten

	WBC G/l	PLT (E) G/l	PLT (Z) G/l	Laktat mmol/l	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mmol/l	Fibrinogen g/l	Globuline g/l
RI/Nr.	<b>4,37- 8,96</b>	<b>90-270</b>	<b>82-245</b>	<b>&lt; 1,7</b>	<b>25,5-30,3</b>	<b>1,25-3,29</b>	<b>23,07- 42,09</b>
1	10,12	128	113	<b>1,9</b>	23,3	*	*
2	<b>1,24</b>	116	139	<b>5,9</b>	26,1	*	*
3	<b>15,23</b>	112	131	*	<b>19,8</b>	*	*
4	<b>2,96</b>	125	119	0,9	24,7	*	*
5	3,94	<b>44</b>	<b>49</b>	0,9	21,3	*	*
6	<b>1,68</b>	133	124	<b>7,3</b>	24,1	*	*
7	<b>1,95</b>	<b>69</b>	<b>73</b>	<b>12,3</b>	<b>19,8</b>	*	*
8	<b>16,87</b>	121	148	1,2	24,9	*	*
9	10,57	156	160	1,7	25,5	*	*
10	6,76	<b>24</b>	<b>38</b>	*	*	*	*
11	8,73	<b>26</b>	<b>33</b>	*	*	1,54	<b>42,3</b>
12	8,95	119	104	0,5	29,1	<b>3,92</b>	31,4
13	<b>2,23</b>	<b>19</b>	<b>69</b>	<b>10,1</b>	<b>19,3</b>	*	*
14	<b>16,11</b>	147	132	<b>12,8</b>	23,8	*	*
15	<b>15,07</b>	139	124	<b>12,8</b>	24,0	*	*
16	<b>17,89</b>	98	92	*	*	<b>3,73</b>	29,2
17	9,44	<b>37</b>	156	<b>9,1</b>	<b>18,8</b>	2,53	30,5
18	5,86	188	172	4,6	29,8	*	*
19	<b>16,41</b>	183	229	*	*	<b>6,16</b>	<b>70,0</b>
20	7,11	114	104	3,0	27,6	*	*

RI: Referenzintervall, E: EDTA, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Natriumhydrogenkarbonat, PLT: Thrombozyten, WBC: Leukozyten, Z: Zitrat, \*: nicht gemessen, fett unterlegt: Werte außerhalb des RI bzw. die zum Einschluss in die Studie führten

### 3.6.5 Multiplate® Analyzer Resultate bei SIRS-Patienten

Da sich die Referenzintervalle der Multiplate® Tests zwischen gesunden Kleinpferden und Warmblütern unterscheiden (siehe 3.5.5), wurde die Rasse bei der Auswertung der Werte der SIRS-Kranken berücksichtigt. Die Ergebnisse der Multiplate® Messungen (AUC in U) der 20 Patienten sind in Tab. 9 dargestellt. Man erkennt, dass alle Kranken (Kleinpferde und Warmblüter) im ASPItest deutlich niedrigere Werte als in den anderen Tests aufweisen. Dabei liegen die Werte der Kleinpferde größtenteils unterhalb jenen der Großpferde. Die Ergebnisse von allen 20 Patienten sind im Anhang S. 154, Tab. A5 dargestellt.

**Tab. 9: Thrombozytenfunktion der SIRS-Patienten je nach Rasse (AUC in U)**

	Alle (n = 20)	Warmblut (n = 11)	Kleinpferd (n = 9)
<b>COLtest</b>	286 ± 141 339 (10-526)	303 ± 141 352 (89-482)	265 ± 192 323 (10-526)
<b>ADPtest</b>	163 ± 133 121 (10-414)	202 ± 126 216 (10-386)	116 ± 133 80 (17-414)
<b>ADPtest HS</b>	153 ± 124 124 (9-376)	199 ± 123 193 (19-376)	96 ± 105 49 (9-306)
<b>ASPItest</b>	38 ± 42 22 (0-171)	48 ± 49 36 (0-171)	26 ± 31 9 (0-90)

MW ± SD: Mittelwert ± Standardabweichung; Median (Minimum-Maximum)

Die folgende Tab. 10 (S. 73) verdeutlicht, bei welchen Tests sich die Ergebnisse der 20 Patienten außerhalb der rassespezifischen Referenzintervalle befinden.

Bei vier der 20 Erkrankten wurde in allen vier Tests ein sich im jeweiligen Referenzintervall befindlicher Wert gemessen. Es handelte sich um das Warmblut Nr. 14 und die Kleinpferde Nr. 4, 15 und 17. Diesen Pferden konnte demnach keine beeinträchtigte Thrombozytenfunktion anhand des Multiplate® Analyzers nachgewiesen werden. Allerdings befanden sich die Werte des ASPItest bei den Patienten Nr. 4, 14 und 15 nur knapp oberhalb des unteren Grenzwertes. Alle anderen 16 Patienten zeigten in mindestens einem Test veränderte Werte. Es handelte sich um

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

27 pathologische Werte bei insgesamt 80 Messungen. Der COLtest und ASPItest waren dabei überwiegend betroffen. Ganz überwiegend (21 von 27; 78%) zeigte sich eine verminderte Aggregation der Thrombozyten bei den Patienten. Lediglich fünf SIRS Kranke wiesen erhöhte Aktivierbarkeiten auf, die bei Vieren im COLtest nachweisbar waren. Die Patienten Nr. 7 (Kleinpferd) und 13 (Warmblut) zeigten in allen vier durchgeführten Tests eine stark verminderte thrombozytäre Aggregation. Die Plättchen ausschließlich dieser beiden Pferde ließen sich im ASPItest gar nicht aktivieren, sodass dieser Test jeweils eine AUC von 0 U ergab. Daraus lässt sich schließen, dass bei diesen beiden Patienten die Thrombozyten deutlich hypofunktional gewesen sind.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tab. 10: Thrombozytäre Funktion bei den 20 SIRS-Patienten

Warmblut		COLtest	ADPtest	ADPtest HS	ASPItest
Nr.	Verlauf	RI 135-438	RI 62-413	RI 33-348	RI 42-343
14	Eu	-	-	-	-
3	Eu	-	-	-	↓
5	Eu	↓	-	-	-
10	Eu	-	-	-	↓
12	G	-	-	↑	-
16	Eu	↑	-	-	-
18	Eu	-	-	-	↓
19	G	-	-	-	↓
8	G	↑	-	-	↓
20	Eu	-	↓	↓	-
13	Eu	↓	↓	↓	↓
Kleinpferd		COLtest	ADPtest	ADPtest HS	ASPItest
Nr.	Verlauf	RI 78-398	RI 22-367	RI 10-355	RI 3-319
4	G	-	-	-	-
15	Eu	-	-	-	-
17	G	-	-	-	-
2	Eu	↓	-	-	-
9	Eu	↑	-	-	-
1	G	↑	↑	-	-
6	Eu	↓	-	-	↓
11	Eu	-	↓	↓	-
7	Eu	↓	↓	↓	↓

Eu: Euthanasie, G: gesund entlassen, RI: Referenzintervall, ↑: oberhalb des RI, ↓: unterhalb des RI, -: innerhalb des RI

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Eine Übersicht der Anzahl von den jeweiligen Referenzintervallen abweichenden Werte gibt Tab. 11.

Nur vereinzelt wurden erhöhte Aggregationen bei den eigenen SIRS-Patienten vorgefunden, am Ehesten ließen sich solche Werte im COLtest nachvollziehen (20 % der Patienten). Immerhin wurden in 25% der Tests erniedrigte Aggregationen nachgewiesen, vorwiegend im ASPItest (40% der Patienten) und COLtest (25% der Probanden). Auf die Ergebnisse der jeweiligen Multiplate® Tests wird in den folgenden Kapiteln detaillierter eingegangen.

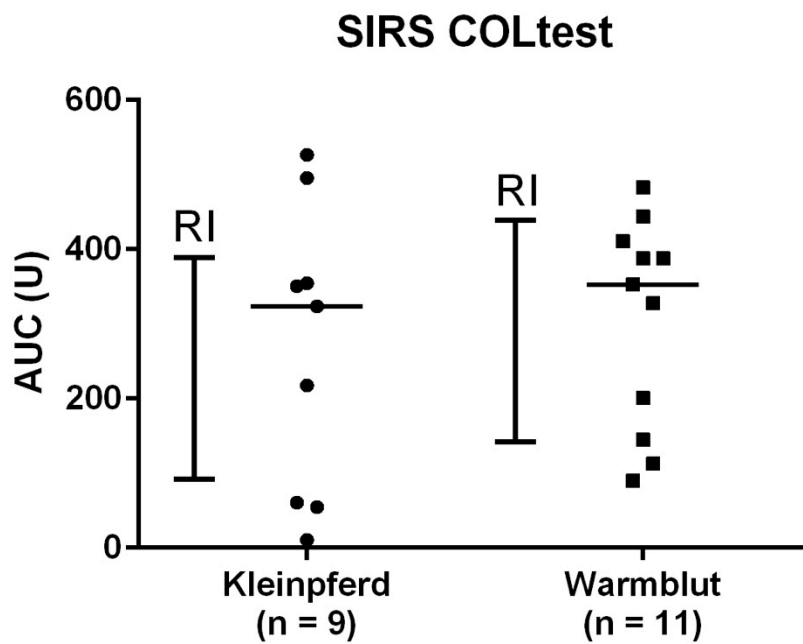
**Tab. 11: Anzahl und Richtung der vom jeweiligen Referenzintervall abweichenden Ergebnisse bei SIRS-Patienten**

		COLtest		ADPtest		ADPtest HS		ASPItest		Summe	
<b>Wblt.</b> <b>n = 11</b>	↑	2/11	18%	0/11	0%	1/11	9%	0/11	0%	3/44	6,8%
	↓	2/11	18%	2/11	18%	2/11	18%	6/11	55%	12/44	27,3%
<b>Klpfd.</b> <b>n = 9</b>	↑	2/9	22%	1/9	11%	0/9	0%	0/9	0%	3/28	10,7%
	↓	3/9	33%	2/9	22%	2/9	22%	2/9	22%	9/28	32,1%
<b>Summe</b> <b>n = 20</b>	↑	4/20	20%	1/20	5%	1/20	5%	0/20	0%	6/80	7,5%
	↓	5/20	25%	4/20	20%	4/20	20%	8/20	40%	20/80	25%

Wblt.: Warmblut, Klpfd.: Kleinpferd, ↑: Werte über dem jeweiligen Referenzintervall, ↓: Werte unter dem jeweiligen Referenzintervall

### 3.6.5.1 COLtest

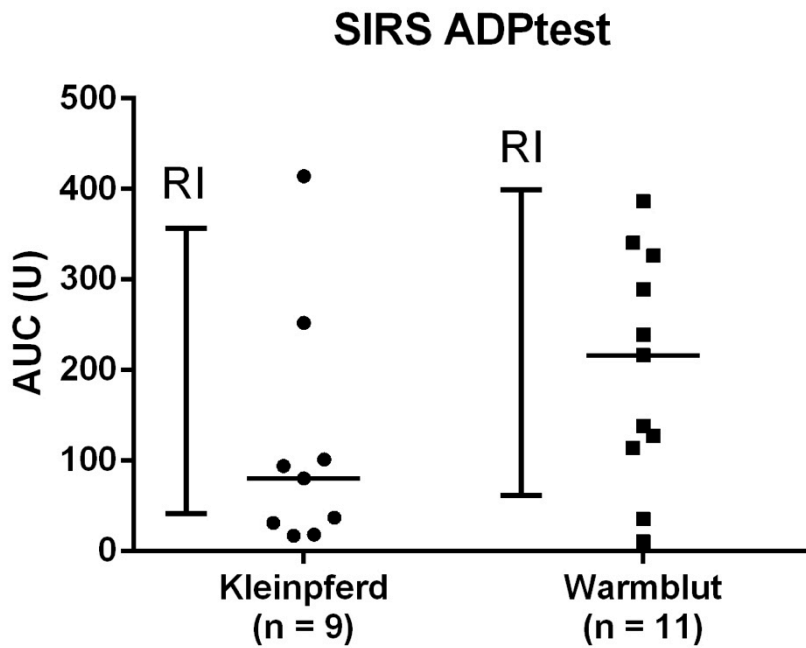
Von den 20 COLtest Ergebnissen lagen neun (45 %), vier bei Warmblütern und fünf bei den Kleinpferden, außerhalb der jeweiligen Referenzintervalle (s. Tab. 4), wobei fünf Werte unterhalb (Nr. 2, 5, 6, 7 und 13) und vier oberhalb (Nr. 1, 8, 9 und 16) der Grenzwerte lagen (Abb. 17). Der Median der Kleinpferde betrug 323 U und der der Großpferde war 352 U.



**Abb. 17: COLtest Ergebnisse bei SIRS-Patienten;** RI: Referenzintervall für die jeweilige Rasse

### 3.6.5.2 ADPtest

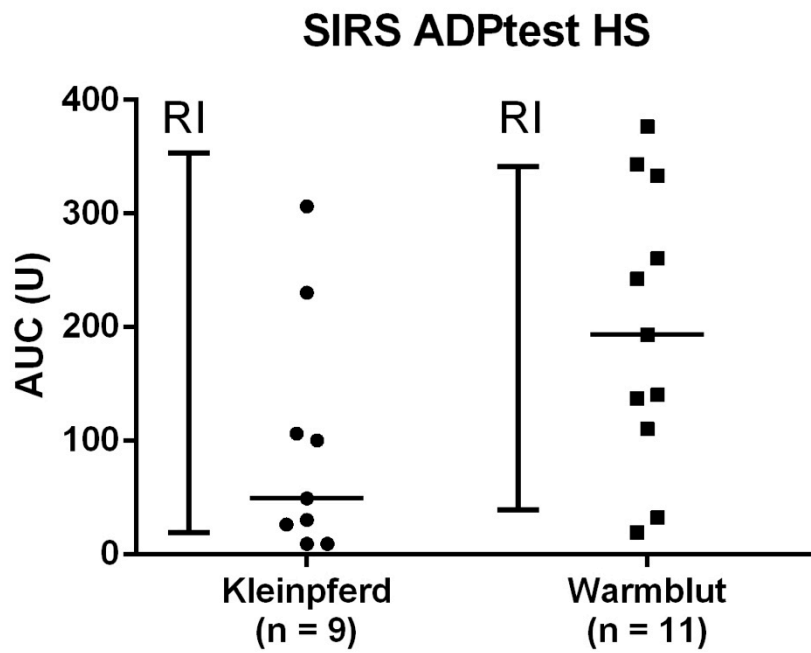
Vier ADPtest Werte (20 %) der SIRS-Patienten (Kleinpferd Nr. 7 und 11 sowie Warmblut Nr. 13 und 20) lagen unterhalb der Referenzintervalle, das Kleinpferd Nr. 1 (5%) zeigte einen Wert oberhalb des Referenzintervalls (s. Abb. 18). Für die Kleinpferde betrug der Median 80 U, mit 216 U lag der Median der Warmblüter deutlich höher.



**Abb. 18: ADPtest Ergebnisse der SIRS-Patienten;** RI: Referenzintervall für die jeweilige Rasse

### 3.6.5.3 ADPtest HS

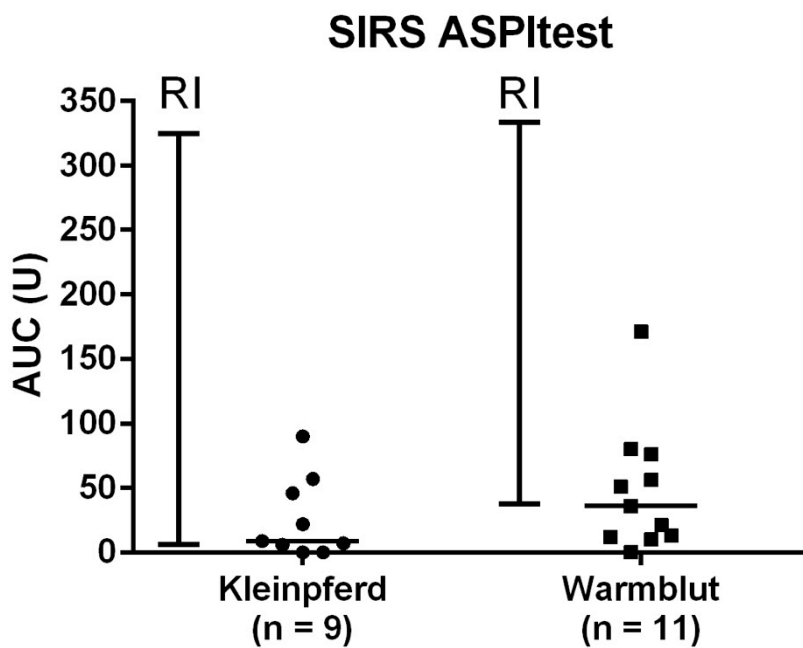
Insgesamt wurden bei fünf Patienten (25 %) ADPtest HS Werte außerhalb des jeweiligen Referenzintervalls verzeichnet (zwei Kleinpferde, Nr. 7 und 11, und drei Warmblutpferde, Nr. 12, 13 und 20), davon lag eine Messung (Nr. 12) oberhalb des oberen Grenzwertes (Abb. 19). Der Median der kranken Kleinpferde lag mit 49 U deutlich unter dem der kranken Warmblutpferde mit 193 U.



**Abb. 19: ADPtest HS Ergebnisse der SIRS-Patienten;** RI: Referenzintervall für die jeweilige Rasse

**3.6.5.4 ASPItest**

Von den 20 SIRS-Patienten wiesen acht Werte im ASPItest unterhalb des Referenzintervalls auf (40 %): es handelte sich um zwei Kleinpferde, Nr. 6 und 7 und sechs Warmblüter, Nr. 3, 8, 10, 13, 18 und 19. Im Vergleich mit den übrigen vier Tests lagen beide Mediane deutlich niedriger mit 9 U für die Kleinpferde und 36 U für die großen Equiden. Die meisten Werte beider Rassen lagen, wie in Abb. 20 ersichtlich, im unteren Drittel des jeweiligen Referenzintervalls. Einzig ein krankes Warmblut zeigte im ASPItest einen verhältnismäßig höheren Wert (Nr. 12) auf.



**Abb. 20: ASPItest Ergebnisse der SIRS-Patienten;** RI: Referenzintervall für die jeweilige Rasse

### 3.6.6 Vergleich der Thrombozytenfunktion zwischen der Kontrollgruppe und den SIRS-Patienten

Die AUCs aller vier verwendeten Multiplate® Tests bei den Gesunden (Kleinpferde und Warmblüter) wurden mit denen der Kranken (Kleinpferde und Warmblüter) verglichen. Zur Berechnung wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse angewandt (siehe 3.4.5). Es sollte überprüft werden ob statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Gesund vs. SIRS) und/oder zwischen den Rassen (Kleinpferd vs. Warmblut) bestehen. Außerdem sollte mit der statistischen Analyse eine mögliche Wechselwirkung zwischen den beiden Faktoren Gruppe und Rasse aufgedeckt werden.

Eine Übersicht der Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse gibt Tab. 12.

**Tab. 12: Einfluss der Faktoren Rasse (Warmblut vs. Kleinpferd) und Gruppe (Gesund vs. SIRS) auf die Thrombozytenfunktion (zweifaktorielle Varianzanalyse)**

	Haupteffekte (p-Wert)		Interaktion (p-Wert) Rasse x Gruppe
	Gruppe	Rasse	
<b>COLtest</b>	0,682	0,149	0,836
<b>ADPtest</b>	0,333	<b>0,012</b>	0,279
<b>ADPtest HS</b>	0,098	<b>0,0006</b>	0,055
<b>ASPItest</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0001</b>	0,361

Fett unterlegt: statistisch signifikant

Zwischen den Gesunden und den SIRS-Patienten (Gruppe) zeigte sich demnach lediglich im ASPItest ein hochsignifikanter Unterschied in der thrombozytären Funktion mit  $p < 0,0001$ .

Zwischen den Kleinpferden und Warmblütern waren die Ergebnisse des ADPtest, ADPtest HS und ASPItest signifikant unterschiedlich, während ein Einfluss der Rasse für die COLtest Ergebnisse nicht mehr nachweisbar war.

Statistisch signifikante Wechselwirkungen wurden nicht nachgewiesen.

### 3.6.6.1 COLtest

In die statistische Auswertung des COLtests wurden die Ergebnisse von 61 gesunden und 9 kranken Kleinpferden einbezogen. Für die Warmblutpferde konnten die Werte von 59 Gesunden und 11 Kranken verwendet werden (s. Abb. 21).

Es konnte weder beim Vergleich zwischen der Gruppe mit  $p = 0,7$  (s. Abb. 21), noch der Rasse mit  $p = 0,2$  ein statistisch signifikanter Unterschied beim COLtest gefunden werden. Auch eine Wechselwirkung zwischen Rasse und Gruppe wurde nicht nachgewiesen ( $p = 0,8$ ).

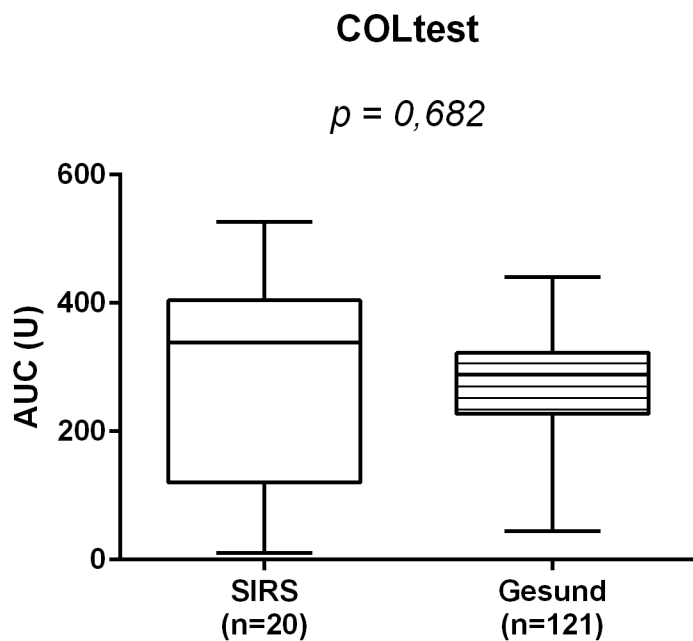
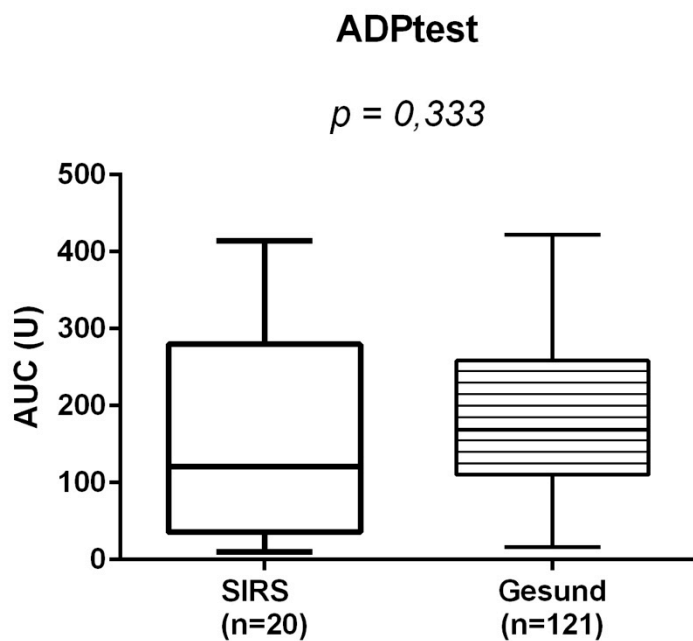


Abb. 21: COLtest bei allen SIRS-Patienten und Gesunden

**3.6.6.2 ADPtest**

Für die statistische Analyse des ADPtests wurden 61 Werte der gesunden und 9 Werte der kranken Kleinpferde sowie 60 Werte der gesunden und 11 Werte der kranken Warmblüter genutzt.

Es bestand ein statistisch signifikanter Unterschied im Rassenvergleich mit  $p = 0,012$ . Im Gruppenvergleich (s. Abb. 22) wurde kein Unterschied registriert ( $p = 0,3$ ). Auch beim ADPtest wurde keine Interaktion zwischen Rasse und Gruppe festgestellt ( $p = 0,3$ ).



**Abb. 22: ADPtest bei allen SIRS-Patienten und Gesunden**

### 3.6.6.3 ADPtest HS

In die Varianzanalyse konnten die Ergebnisse von 60 gesunden und 9 kranken Kleinpferden sowie von 60 gesunden und 11 kranken Warmblutpferden einbezogen werden. Da die Werte eine schiefe Verteilung zeigten, wurden diese vor der statistischen Analyse logarithmiert.

Für die AUC konnte beim Vergleich zwischen den Kranken und Gesunden kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p = 0,1$ ) gefunden werden, wie auch in der Grafik (Abb. 23) erkenntlich ist. Bei dem Vergleich der Rassen wurde ein statistisch hoch signifikanter Unterschied ( $p = 0,0006$ ) festgestellt (Abb. 24). Eine Wechselwirkung zwischen den beiden Faktoren Rasse und Gruppe bestand knapp nicht ( $p = 0,055$ ).

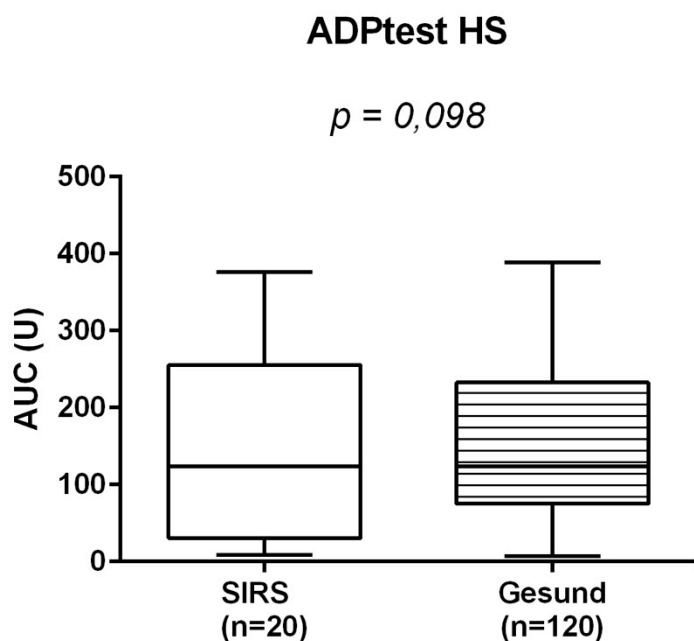


Abb. 23: ADPtest HS bei allen SIRS-Patienten und Gesunden

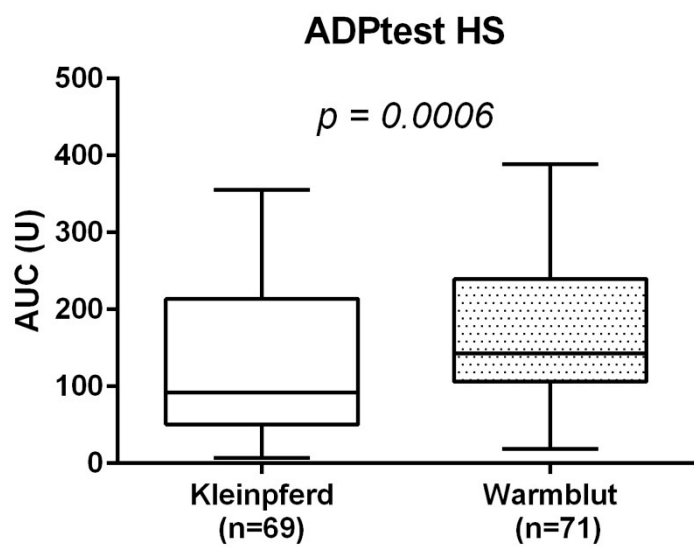


Abb. 24: ADPtest HS bei allen Klein- und Großpferden

### 3.6.6.4 ASPItest

In die statistische Auswertung des ASPItest wurden die Werte von 59 gesunden und 9 kranken Kleinpferden sowie von 60 gesunden und 11 kranken Warmblutpferden einbezogen. Bei dem ASPItest mussten die Werte aufgrund einer schiefen Verteilung ebenfalls logarithmiert werden.

Es fanden sich hoch signifikante Unterschiede zwischen den SIRS-Patienten und den Gesunden ( $p < 0,0001$ ) sowie zwischen den Klein- und Großpferden ( $p = 0,0001$ ). Die Abb. 25 und Abb. 26 geben die Aggregationswerte grafisch wieder. Eine Wechselwirkung zwischen Rasse und Gruppe gab es nicht ( $p = 0,4$ ).

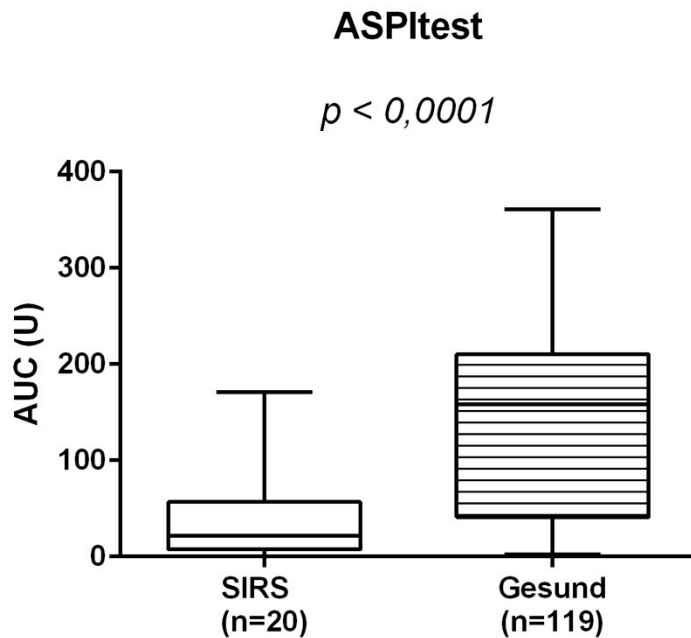


Abb. 25: ASPItest bei allen SIRS-Patienten und Gesunden

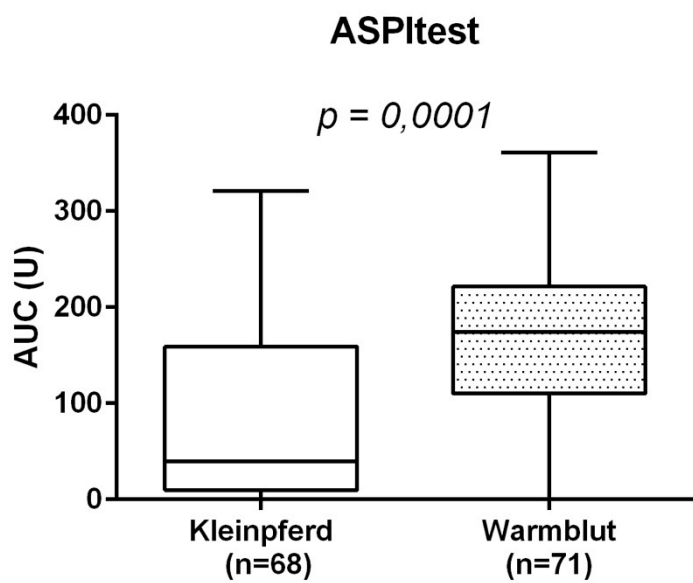


Abb. 26: ASPItest bei allen Klein- und Großpferden

### 3.6.7 Korrelationen zwischen ausgewählten hämatologischen Variablen und der Thrombozytenfunktion

Um einen Einfluss bestimmter Blutparameter auf die Funktion der Plättchen zu untersuchen, wurden Korrelationen zwischen den thrombozytären Funktionstests und denselben hämatologischen Variablen wie in Kapitel 3.5.6 geschildert, berechnet. Tab. 13 gibt einen Überblick der statistisch signifikanten Ergebnisse, unterteilt in Klein- und Großpferde. Auf die einzelnen Blutvariablen wird im folgenden Text weiter eingegangen.

**Tab. 13: Übersicht signifikanter Korrelationen (r) der SIRS-Patienten (n = 20)**

	Test	r Kleinpferd	p-Wert	r Warmblut	p-Wert
<b>WBC</b>	COLtest	0,84	<b>0,005</b>	0,87	<b>0,001</b>
<b>PLT</b>	COLtest	0,14	n.s.	0,67	<b>0,02</b>
	ADPtest	0,34	n.s.	0,61	<b>0,05</b>
<b>MPV</b>	COLtest	-0,21	n.s.	-0,60	<b>0,05</b>

WBC: Leukozytenzahl, PLT: Thrombozytenzahl, MPV: mittleres Thrombozytenvolumen, n.s.: nicht signifikant, fett unterlegt: statistisch signifikant

Die Leukozytenzahl weist den deutlichsten Zusammenhang mit den AUC Messungen des COLtests auf – mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,87 bei den Warmblütern und 0,84 bei den Kleinpferden. Dies legt einen Einfluss der Leukozytenzahl auf die durch Kollagen stimulierte Thrombozytenfunktion bei an SIRS erkrankten Patienten nahe.

Bei den Kleinpferden mit SIRS ergaben sich keine weiteren statistisch signifikanten Zusammenhänge, während sich bei den Warmblütern mit  $r = 0,67$  ( $p = 0,02$ ) ein relativ starker Zusammenhang zwischen der Thrombozytenzahl und dem COLtest gefunden wurde. Bei den Warmblütern ergab sich weiter ein positiver Zusammenhang ( $r = 0,61$ ;  $p = 0,05$ ) zwischen der Thrombozytenzahl und den Ergebnissen im ADPtest. Das MPV war dagegen statistisch schwach signifikant negativ mit den COLtest Ergebnissen bei den kranken Warmblütern assoziiert. Für die MPC konnte bei beiden Rassegruppen kein Einfluss auf die Funktion der Thrombozyten nachgewiesen werden.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Ebenso wurde für keinen der untersuchten Multiplate® Tests eine signifikante Beziehung zwischen der AUC und der Anzahl der Erythrozyten bzw. des Hämatokritwerts berechnet. Alle Ergebnisse der Regressionsanalyse für die kranken Kleinpferde sind im Anhang (S. 155, Tab. A6) und für die kranken Warmblüter im Anhang S. 156, Tab. A7 dargestellt.

### **4 DISKUSSION**

#### **4.1 Diskussion des Materials**

##### **4.1.1 Ermittlung der Referenzintervalle bei Kleinpferden**

###### **4.1.1.1 Probandenauswahl**

Für die Studie zur Ermittlung der Referenzintervalle für thrombozytäre Funktionstests mittels Multiplate® Analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, D) wurden von Juni 2013 bis August 2014 insgesamt 61 klinisch unauffällige Kleinpferde im Rahmen einer Gesundheitskontrolle aus der Umgebung Gießens ausgewählt. Zur Definition des Begriffs der Kleinpferde siehe Kapitel 3.1. Da bereits Referenzintervalle für gesunde Warmblüter existieren (Held 2018), wurde zunächst anhand der Daten von 20 Kleinpferden überprüft, ob sich Unterschiede zeigen. Dieses Vorgehen entspricht den Empfehlungen zur Erstellung von Referenzintervallen des „Clinical and Laboratory Standards Institute“ (CLSI) und des „American Society for Veterinary Clinical Pathology“ (ASVCP). Je 20 Ergebnisse von vier Funktionstests wurden mit denen der gesunden Großpferde verglichen. Da mindestens fünf der Werte der Kleinpferde außerhalb der Referenzintervalle der Warmblüter im COLtest, ADPtest und ASPItest lagen, ergab sich die Notwendigkeit eigene Referenzbereiche für gesunde Kleinpferde zu ermitteln (Friedrichs et al. 2012). Die weiteren Probanden sollten die im Einzugsgebiet der Klinik vor allem im Freizeitbereich genutzten Kleinpferde repräsentieren. Die für die Studie bestehenden Ein- und Ausschlusskriterien (siehe Kapitel 3.1.1) leiten sich von den Kriterien der Studie von Held (2018) zur Erstellung von Referenzintervallen für den Multiplate® Analyzer bei klinisch unauffälligen Warmblutpferden ab. Hierdurch sollte eine besonders gute Vergleichbarkeit gewährleistet werden. Einzig das Widerriststockmaß bis maximal 148 cm wurde an Kleinpferde angeglichen.

Es wurden ausschließlich adulte Tiere mit einem Mindestalter von vier Jahren in die Studie aufgenommen, da in der Human- als auch in der Veterinärmedizin bei Juvenilen eine veränderte Funktion der Thrombozyten nachgewiesen wurde (Clemmons et al. 1984, Dallap Schaer et al. 2009, Halimeh et al. 2010). Bei Fohlen in der ersten Lebenswoche ist neben der erniedrigten Thrombozytenzahl auch die Aktivierung und

## DISKUSSION

Aggregation der Blutplättchen unvollständig ausgebildet (Clemmons et al. 1984, Becht und Semrad 1985).

In einigen humanmedizinischen Studien wurden - abhängig von der Graviditätsdauer - veränderte Plättchenfunktionen detektiert: während des ersten Trimesters lagen signifikant weniger Thrombozytenaggregate als bei nicht Schwangeren vor (Burke et al. 2013, Umazume et al. 2015). Gegen Ende der Schwangerschaft kommt es zu einer erhöhten Reaktivität (Umazume et al. 2015). Daher war in der eigenen Studie das Vorliegen einer Gravidität oder Laktation ein Ausschlusskriterium. Untersuchungen zur thrombozytären Funktion bei stillenden Frauen oder laktierenden Tieren sind der Autorin nicht bekannt.

Der Body Condition Score wurde so gewählt, dass keine besonders mageren bzw. adipösen Tiere in die Studie eingingen. Dies diente zum Ausschluss möglicherweise vorhandener Erkrankungen, die Ursachen für Abmagerung bzw. Folge einer Adipositas sein und damit die thrombozytäre Funktion beeinflussen könnten (Halle et al. 1999, Suagee et al. 2013, Hopster-Iversen 2016).

Equiden, die in den letzten 14 Tagen vor der Blutentnahme Medikamente erhielten, wurden nicht eingeschlossen. Dies bezieht sich auf die CLSI Leitlinien zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion durch Aggregometrie (Christie 2008). Grund ist insbesondere der potentiell hemmende Effekt von NSAIDs auf die thrombozytäre Funktion (Meyers et al. 1979, Johnstone 1983, Moses und Bertone 2002).

Dass tatsächlich alle 61 Probanden anhand der durchgeführten klinischen und labormedizinischen Untersuchungen als ausnahmslos gesund einzustufen sind, birgt das Risiko einer gewissen Fehleinschätzung. Andererseits sind der Autorin auch im Nachhinein keine Anzeichen einer Erkrankung bei den Probanden durch die Besitzer genannt worden. Daher ist mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer auch ansonsten im Feld als „gesund“ zu bezeichnenden Population auszugehen. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass die eingeschlossenen Probanden die ansonsten vorkommende Population von Kleinpferden und Ponys recht gut repräsentieren.

### **4.1.1.2 Präanalytik**

Die Probenentnahme, die Zeit bis zur Messung und der Umgang mit der Probe erfolgte nach einem Standardprotokoll, welches aus der Studie von Held (2018) übernommen wurde. Das gesamte präanalytische Vorgehen richtete sich nach den human- und veterinärmedizinischen Empfehlungen des CLSI (Horowitz et al. 2010) und der ASVCP (Friedrichs et al. 2012) zur Erstellung von Referenzintervallen.

#### **4.1.1.2.1 Blutprobenentnahme**

Die Blutprobenentnahme wurde wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, durchgeführt. Dafür wurden Vausflo® (17 G, Dispomed®, Gelnhausen, D) und Kanülen (18 G, WDT, Garbsen, D) zur Venenpunktion mit einem möglichst großen Durchmesser verwendet. Dies sollte den Einfluss eines Scherstressses vermindern. Hoher Scherstress führt zu einer Thrombozytenaktivierung und Bildung thrombozytärer Mikropartikel (Sakariassen et al. 1998). Bei drei von insgesamt 61 eigenen Probanden wurde statt einer Vasuflo® mit 17 G eine Einmalkanüle (18 G) verwendet, da in diesem Zeitraum keine entsprechenden Venenverweilkatheter vorrätig waren. Die abweichende Methodik zeigte in der vorliegenden Studie keinen wahrnehmbaren Einfluss auf die Messergebnisse, da die Werte dieser drei Kleinpferde denen der anderen Probanden entsprachen. Einen Unterschied in der Verwendung von verschiedenen Durchmessern oder Materialien zur Venenpunktion konnten auch Bauer und Kollegen nicht finden: Die Autoren verglichen vier Blutentnahmeverfahren mit 20 G Kanülen und Kathetern zwischen 18 und 13 G bei Hunden zur Bestimmung der am Multiplate® gemessenen Aggregometrie. Es wurden keine signifikanten Unterschiede aufgedeckt (Bauer et al. 2011).

Die Reihenfolge der Blutröhrchen wurde in der eigenen Arbeitsgruppe festgelegt und wie auch in der Dissertation von Held (2018) genau eingehalten (s. 3.1.3).

Für ein exaktes Mischverhältnis zwischen Antikoagulans und Blutprobe wurde ein Multi-Adapter (Sarstedt, Nümbrecht, D) genutzt, wie ebenfalls von der CLSI zur aggregometrischen Untersuchung empfohlen (Christie 2008).

### 4.1.1.2.2 **Verwendetes Probenmaterial**

Zur Messung am Multiplate® Analyser wird Vollblut verwendet. Dies ist die natürliche Umgebung von Thrombozyten und spiegelt die *in vivo* Situation besser wider als plättchenreiches Plasma (Calatzis et al. 2007). Die Thrombozyten können so mit anderen Blutzellen interagieren. Es entfallen außerdem zeitaufwendige Verfahren zur Bearbeitung der Proben. Dies ist auch vorteilhaft, da eine Manipulation, z.B. durch das Zentrifugieren, entfällt und eine dadurch verursachte *in vitro* Aktivierung vermieden wird (Dyszkiewicz-Korpanty et al. 2005, Calatzis et al. 2007). Des Weiteren erübrigt sich das Einstellen der Probe auf bestimmte Thrombozytenzahlen, wie es in der aggregometrischen Methodik nach Born notwendig ist (Fritsma und McGlasson 2017). Vergleichende Studien mit unterschiedlichen Probenmaterialien zur Messung der Thrombozytenfunktion bei Pferden gibt es nach Wissensstand der Autorin nicht.

### 4.1.1.2.3 **Verwendetes Antikoagulans**

Als Antikoagulans zur Messung der thrombozytären Funktion wurden in der eigenen Studie mit Hirudin befüllte Monovetten® eingesetzt. Die Hersteller des Multiplate® Analyzers empfehlen ein Antikoagulanz, welches den physiologischen Kalziumspiegel in der Probe nicht wesentlich verändert. Dies gewährleistet eine vollständige Thrombozytenaktivierung *in vitro*. Sechs der gesunden Kleinpferde in der eigenen Studie wiesen eine leichte Hypokalzämie mit Werten von 1,38 bis 1,49 mmol/l auf (Referenzbereich 1,51-1,74 mmol/l). Aufgrund der lediglich geringfügigen Erniedrigung des Kalziums im Blut ist eine Beeinträchtigung der thrombozytären Funktion als unwahrscheinlich einzustufen. Kalziumwerte der gesunden Warmblüter in der Arbeit von Held (2018) lagen der Autorin nicht vor.

Geeignete Antikoagulantien sind laut Hersteller Hirudin oder Heparin (Calatzis et al. 2007). In mehreren humanmedizinischen Studien wurde Hirudin als geeignetes Antikoagulans empfohlen. Wallén et al. (1997) untersuchten mittels Chrono-Log®, ob ein Einfluss von drei verschiedenen Antikoagulantien (Zitrat, niedermolekulares Heparin und Hirudin) auf die Thrombozytenaggregation in Vollblut besteht. Da bei der Verwendung der mit Hirudin stabilisierten Blutröhrchen höhere Messwerte erzielt wurden, schlugen die Autoren dieses als am besten geeignetes Antikoagulans für

## DISKUSSION

Thrombozytenfunktionsstudien in Vollblut vor. Die Arbeitsgruppe von Tóth empfahl aus demselben Grund ebenfalls die Verwendung von Hirudin als Antikoagulans bei der Messung am Multiplate® Analyzer (Tóth et al. 2006). Bei der Methodenetablierung des Multiplate® Analyzers bei Hunden (Kalbantner et al. 2010, Marschner et al. 2012) bzw. Schafen (Baumgarten et al. 2010) wurden ebenfalls verschiedene Antikoagulantien getestet. In allen drei Studien zeigte sich, dass Hirudin im Vergleich zu Zitrat eine adäquatere gerinnungshemmende Substanz ist, da signifikant höhere AUC Werte gemessen wurden. Neuere Studien über den Einsatz des Multiplate® Analyzer bei Rhesus Affen und Beagles erbrachten ebenfalls die Empfehlung, mit Hirudin stabilisiertes Vollblut zu verwenden (Defontis et al. 2013, Dugan et al. 2015). Dies wurde in den eigenen Untersuchungen befolgt, ohne dass weitere Vergleiche von Antikoagulantien durchgeführt wurden.

### 4.1.1.2.4 Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Messbeginn

Nach der Probenentnahme wurden die befüllten Hirudin Monovetten® entsprechend der Herstellerangaben für 30 Minuten ruhend bzw. während des Transports möglichst ruhig in senkrechter Position in einem Reagenzienständer stehen gelassen. Größere Erschütterungen während dieser Zeit können zu signifikant niedrigeren Messwerten führen (Behr et al. 2010). Alle Messungen am Multiplate® Analyzer wurden 60 Minuten nach der Probengewinnung begonnen, um zeitlich bedingte Aggregationsschwankungen zu vermeiden (Behr et al. 2010). Gemäß den Herstellervorgaben sollten die Messungen spätestens nach 120 Minuten erfolgen, dies war stets gewährleistet.

### **4.1.2 SIRS-Patienten**

#### **4.1.2.1 Patientenauswahl**

Von September 2014 bis März 2016 wurden für die Patientenstudie 20 Tiere erfasst. Alle Equiden wurden als Notfälle in der Klinik für Pferde, Innere Medizin, der Justus-Liebig-Universität Gießen vorstellig. Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, mussten die Patienten, um in die Studie aufgenommen zu werden, bestimmte klinische bzw. labordiagnostische Kriterien erfüllen. Es sollten möglichst viele Pferde mit Symptomen eines „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS) erfasst werden. Die in der vorliegenden Studie verwendeten Ein- und Ausschlusskriterien wurden im Rahmen der eigenen Arbeitsgruppe vorab festgelegt. Diese orientierten sich zunächst an der ersten humanmedizinischen Definition von Bone et al. (1992) über diesen Erkrankungskomplex. Maßgeblich für die Definition der eigenen Kriterien war die modifizierte S2k Leitlinie zur Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) von 2010. Die klinischen Parameter Körpertemperatur, Herz- und Atemfrequenz als auch die Leukozytenzahl wurden übernommen. Ergänzend kamen die Thrombozytenzahl, das Laktat und das Natriumhydrogenkarbonat hinzu. Diese Parameter dienen der Überprüfung einer möglichen „Organkomplikation“. Funktionsausfälle eines oder mehrerer Organsysteme bedeuten für das Individuum eine lebensbedrohliche Situation. Akute Enzephalopathie, arterielle Hypotension und Schock, relative oder absolute Thrombozytopenie, arterielle Hypoxämie, renale Dysfunktion und metabolische Azidose gehören zu der Definition einer „Organkomplikation“ (Reinhart et al. 2010).

In bisherigen Arbeiten über SIRS bei Pferden wurden ebenfalls die klinischen Parameter Herz- und Atemfrequenz, Körpertemperatur sowie die Leukozytenzahl bzw. die Anwesenheit von stabkernigen Neutrophilen als Kriterien zur Feststellung eines SIRS herangezogen (Epstein et al. 2011, Bonelli et al. 2015, Lambert et al. 2016, Roy et al. 2017, Bertin et al. 2018). Weitere Kriterien, die in der eigenen Arbeit angewandt wurden wie Thrombozytenzahl, Laktatwert und Bikarbonat, fanden in den erwähnten Studien keine Verwendung. Die von den jeweiligen Autoren festgelegten

## DISKUSSION

Grenzwerte waren nicht immer einheitlich gewählt (s. Tab. 14). Allerdings sind die Unterschiede aus klinischer Sicht nicht so stark ausgeprägt, dass ein Vergleich zwischen den Studien nicht möglich wäre. Die in der eigenen Arbeit festgelegten Grenzwerte sind größtenteils mit einem größeren Abstand zu den physiologischen Werten von Pferden zu verzeichnen als es in den bisherigen Publikationen der Fall war. Wahrscheinlich wurden dadurch schwerer erkrankte Equiden in die eigene Studie eingeschlossen.

**Tab. 14: SIRS-Kriterien und Grenzwerte equiner Publikationen im Vergleich**

<b>Autoren</b>	<b>Herzfrequenz (Schläge/min)</b>	<b>Atemfrequenz (Züge/min)</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Leukozytenzahl (x10<sup>9</sup>/l)</b>
Epstein et al. 2011	≥ 60	≥ 30	≥ 38,6	≤ 4,5 oder ≥ 12,5
Bonelli et al. 2015	> 44	> 15	< 37,2 oder > 38,3	< 5,4 oder > 14,3
Lambert et al. 2016	> 50	> 20	< 37,0 oder > 38,5	< 5 oder > 12,5
Roy et al. 2017	> 52	> 20	< 37,0 oder > 38,5	< 5 oder > 12,5
Bertin et al. 2018	> 45	> 24	< 36,1 oder > 38,6	< 5 oder > 12
Eigene Arbeit	> 52	>24	≤ 36,0 oder ≥ 39,0	< 3 oder > 15

### 4.1.2.2 Präanalytik

Der Umgang mit dem Probenmaterial vor der eigentlichen Messung der Thrombozytenfunktion erfolgte nach dem Protokoll der Studie zur Ermittlung von Referenzintervallen (s. Kapitel 4.1.1.2). Einzig die Blutprobenentnahme variierte, sodass im folgenden Abschnitt näher darauf eingegangen wird.

### 4.1.2.2.1 Blutprobenentnahme

Die Reihenfolge der verwendeten Monovetten® bei der Blutprobenentnahme erfolgte nach einem vorab durch die eigene Arbeitsgruppe ausgearbeiteten Schema (s. Kapitel 3.2.3). Diese stimmt nicht mit Reihenfolge der Studie zur Erstellung von Referenzintervallen (3.1.3). überein. Den SIRS-Patienten wurde zunächst ein Serumröhrchen entnommen. Dieses wurde verworfen. Harrison empfiehlt ebenfalls, die ersten drei bis fünf Milliliter der entnommenen Blutprobe zu verwerfen um ein korrektes Ergebnis der thrombozytären Funktionsmessung zu erhalten (Harrison 2009). In der Studie zur Referenzermittlung am Multiplate® Analyser wurden keine Serum Monovetten® genutzt. Anschließend wurden die mit Hirudin und Zitrat stabilisierten Röhrchen befüllt, diese kamen in der Referenzintervallstudie erst nach Befüllen des EDTA- und Heparinröhrchens, also erst ganz zum Schluss dran. Das nicht korrekte Einhalten der Reihenfolge der Blutröhrchen entspricht insofern nicht den Empfehlungen der CLSI (Horowitz et al. 2010) und ASVCP (Friedrichs et al. 2012), denn die Autoren raten zu einer exakten Einhaltung des präanalytischen Vorgehens, wozu auch die gleiche Reihenfolge der Röhrchen bei Blutentnahme gehört. Andererseits sind auch die publizierten Studien zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion mittels Aggregationstest nicht präzise standardisiert (Breddin 2005, Harrison 2009) und es werden in den verschiedenen Arbeiten u.a. unterschiedliche Antikoagulantien, Konzentrationen von Agonisten und Messzeiten angewendet (Baumgartner et al. 2010, Kalbantner et al. 2010, Defontis et al. 2013). In einer Arbeit von Marschner und Ponschab zur Überprüfung der Multiplate® Analysen bei Hunden, Menschen und Pavianen war die Reihenfolge der bei der Blutentnahme befüllten Röhrchen ähnlich der eigenen, da zunächst ein Serumröhrchen und anschließend die zur thrombozytären Funktionsuntersuchung benötigten Röhrchen entnommen wurden (Marschner et al. 2012, Ponschab et al. 2016). Grund dafür ist das Vermeiden fehlerhafter Ergebnisse am Multiplate® Analyser da durch die Blutentnahme selbst eine Aktivierung der Gerinnung entstehen kann (Schwendenwein 2014).

Die Reihenfolge der Blutröhrchen sollte gleichbleiben, um pro Antikoagulanzen die gleiche *in vitro* Aktivierung allein aufgrund der Dauer der Blutentnahme zu

## DISKUSSION

ermöglichen. Dass tatsächlich die Reihenfolge einen methodischen Einfluss beim Pferd besitzt, bei dem ja großlumige Kanülen verwendet werden und die gesamte Blutentnahme in weniger als einer Minute gelingt, erscheint der Autorin eher unwahrscheinlich.

Bei 13 von den 20 Patienten wurden die Blutproben aus einem Venenverweilkatheter entnommen. Von diesen 13 Entnahmen wurde bei 12 ein Multi-Adapter verwendet, nur bei einem Patienten (Nr. 2) wurde das Blut mittels einer Einmalspritze entnommen, da nach Anbringen des Multi-Adapters kein Blut aspiriert werden konnte. Das abweichende Vorgehen erzeugte keine starke Diskrepanz zu den sonstigen Messergebnissen. Bei vier Patienten erfolgte die Blutprobenentnahme mittels einer Vasuflo<sup>®</sup>, kombiniert mit einem Multi-Adapter. Eine Einmalkanüle in Kombination mit Multi-Adapter wurde bei drei Patienten verwendet. Die unterschiedlichen Entnahmetechniken erbrachten keine sichtlich abweichenden Multiplate<sup>®</sup> Ergebnisse im Vergleich mit den Ergebnissen bei den übrigen Probanden. Auch Bauer et al. konnten in einer Studie bei Hunden mit Verwendung von Kathetern oder Kanülen unterschiedlicher Größen keine Unterschiede in der thrombozytären Funktion mittels Impedanzaggregometrie ermitteln (Bauer et al. 2011).

### **4.2 Diskussion der Methodik**

Alle labormedizinischen Untersuchungen, diese beinhalten die Hämatologie, klinische Chemie als auch Messungen am Blutgasgerät, wurden durch die Autorin, das Fachpersonal bzw. eingewiesenes Dienstpersonal durchgeführt. Dabei wurden stets die in den Herstellerangaben empfohlenen Techniken, Messzeiten bzw. Kalibrierungen und Qualitätskontrollen der Geräte eingehalten.

Laut Schwendenwein (2013) sollten hämatologische und klinisch chemische Untersuchungen innerhalb von vier Stunden nach der Blutentnahme durchgeführt werden und auch dies wurde in der vorliegenden Arbeit erfüllt: alle Messungen wurden bis maximal zwei Stunden nach Entnahme begonnen. Bei Benutzung des Blutgasgerätes wurde das Blut unmittelbar nach Entnahme untersucht. Das Messen der Thrombozytenfunktion erfolgte laut Herstellerempfehlung, d.h. spätestens nach einer Stunde wurden die Multiplate® Messungen gestartet. Eine 30-minütige senkrechte Lagerung der Blutprobe vor Messbeginn war stets gewährleistet. Daher sind alle Voraussetzungen eingehalten, um methodisch bedingte Ungenauigkeiten der Messergebnisse in so engen Grenzen wie möglich zu halten.

#### **4.2.1 Multiplate® Analyzer**

##### **4.2.1.1 AUC als Hauptzielparameter**

Der Multiplate® Analyzer misst kontinuierlich den elektrischen Widerstand zwischen den beiden sich in der Küvette befindlichen Sensordrähten. Tóth et al. (2006) untersuchten die Thrombozytenfunktion mittels „multiple electrode aggregometry“ und folgerten, dass diese Methodik einfach, gut reproduzierbar und sensitiv für das Messen der Thrombozytenaggregation ist. Sind aktivierbare Thrombozyten in der Probe vorhanden, so werden diese, sobald wirksame Aktivatoren zugegeben werden, an den Drähten aggregieren. Dies erhöht den elektrischen Wechselstromwiderstand (Impedanz). Diese Impedanzänderung wird aufgezeichnet, durch das Gerät in die frei gewählten „Aggregation Units“ (AU) umgerechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Es werden insgesamt drei Parameter berechnet. Die Aggregation (maximale Höhe der Aggregationskurve in AU), die „Velocity“ (maximale Steigung der Aggregationskurve in

AU/min) und die Fläche unter der Aggregationskurve („Area Under the Curve“, AUC in AU\*min). Die letztgenannte Messgröße ist das Ergebnis der Multiplikation der AU und der Zeit in Minuten. Der Einfachheit halber wird AU\*min in die Einheit „U“ umgewandelt. Dies ist für den Praxisalltag vorteilhaft, da hohe und damit unhandliche Aggregationswerte vermieden werden (Calatzis et al. 2007). Allerdings ist AUC\*min bzw. U nicht die gängige Einheit zur Messung der Impedanz. Dafür wird in der Regel die Einheit „Ohm“ ( $\Omega$ ) angewandt. In den Arbeiten über die Untersuchung der thrombozytären Funktion mittels Vollblutimpedanzaggregometrie ohne den Einsatz des Multiplate® Analyser wurde stets die Einheit Ohm (Wallén et al. 1997, Neubauer et al. 2010, Foreman et al. 2018) angegeben. Den Grund für die Einstellungsänderung der Einheit beim Multiplate® Analyser konnte trotz ausführlicher Literaturrecherche von der Autorin nicht gefunden werden.

Die AUC stellt den wichtigsten Zielparameter für die Quantifizierung der thrombozytären Funktion dar. Bei Nutzung des Multiplate® Analyzers zur Überprüfung von Medikamenteneffekten wird die beste Differenzierung zwischen ungehemmter und gehemmter Aggregation durch Verwendung der AUC erreicht (Calatzis et al. 2007). Sie wird als der Parameter mit der höchsten diagnostischen Power angesehen (Tóth et al. 2006). In den bisherigen Arbeiten zum Multiplate® Analyser wurde stets die AUC zur Messung der thrombozytären Funktion verwendet, während die Aggregation und die „Velocity“ nicht erwähnt worden sind.

### **4.2.1.2 Verwendete Thrombozytenagonisten**

Für die thrombozytäre Analytik am Multiplate® Analyser stehen der Humanmedizin sechs Tests zur Verfügung, die unterschiedliche Aktivierungswege der Blutplättchen repräsentieren. Für die vorliegende Arbeit wurden die Aktivatoren Kollagen (COLtest), Adenosindiphosphat (ADPtest), ADP mit Prostaglandin E<sub>1</sub> (ADPtest HS) und Arachidonsäure (ASPItest) verwendet. Die Konzentrationen der Aktivatoren sind in Tab. 1 ersichtlich. In der Studie von Held (2018) wurden diese Thrombozytenaktivatoren in den gleichen Konzentrationen bei gesunden Warmblutpferden etabliert und Referenzintervalle erstellt. Da im RISTOtest und TRAPtest beim Warmblüter keine aussagekräftigen Aggregationen erzielt wurden, kam

es zum Ausschluss der beiden Tests (Held 2018). Die für die eigene Studie gewählten Kleinpferde sind den Warmblütern nahe Verwandte. Deswegen wurde nicht davon ausgegangen, dass die eigenen Probanden andere Reaktionen in den Messungen des RISTOtest und TRAPtest zeigen. Somit wurde ebenfalls auf die beiden Agonisten verzichtet. Kalbantner et al. (2010) etablierten den Multiplate® Analyser bei Hunden und setzten die Aktivatoren Kollagen, ADP und Arachidonsäure ein. Auch die caninen Thrombozyten konnten mittels RISTOtest und TRAPtest nicht aktiviert werden (Kalbantner et al. 2010). Zur Methodenetablierung bei Schafen haben Baumgarten et al. (2010) den COLtest, ADPtest, RISTOtest, ASPItest und TRAPtest verwendet. Dabei stellten sie fest, dass ovine Thrombozyten - ebenso wie canine und equine - nicht mit dem RISTOtest und TRAPtest aktiviert werden konnten, aber sich erstaunlicherweise zusätzlich nicht durch den ASPItest aggregieren ließen. Diese tierartlich unterschiedlichen Aktivierungswege der Blutplättchen könnten Anlass für künftige Studien über speziesspezifische thrombozytäre Rezeptoren sein.

Da nach Kenntnis der Autorin der Multiplate® Analyser beim Pferd ausschließlich in der eigenen Arbeitsgruppe eingesetzt wurde, erfolgten die Untersuchungen mit den hier etablierten Konzentrationen für die Tests, um möglichst gut vergleichbare Ergebnisse zu erzielen (Held 2018, Roscher et al. 2017).

### **4.2.1.3 Eingestellte Messdauer**

In zahlreichen humanmedizinischen Studien zum Multiplate® Analyser wurde eine Messzeit von sechs Minuten eingestellt (Calatzis et al. 2007, Mueller et al. 2007). Auch in einigen veterinärmedizinischen Arbeiten bei Nagern, Braunbären, Katzen und Affen sind diese sechs Minuten zum Messen eingesetzt worden (Kirkeby et al. 2008, Fröbert et al. 2010, Dugan et al. 2015, Ho et al. 2015). Dagegen wurden bei der Etablierung und Erstellung von Referenzintervallen bei Schafen und Hunden am Multiplate® Analyser zwölf Minuten für die Messung festgelegt (Baumgarten et al. 2010, Kalbantner et al. 2010). Die Autoren erklärten die längere Messdauer für erforderlich, da ein Plateau der Aggregationskurve erst spät im Vergleich zum Menschen erreicht wird. Marschner et al. (2012) führten Multiplate® Messungen mit verschiedenen Messzeiten bei Hunden durch und bestimmten, dass bei einer Analysezeit von über 12

## DISKUSSION

Minuten keine weiteren Erkenntnisse gewonnen werden. Somit erscheinen beim Hund zwölf Minuten für das Ermitteln der korrekten maximalen Aggregation als optimal.

In der Arbeit von Held zur Erstellung von Referenzintervallen bei gesunden Warmblutpferden wurde ein Erreichen des Plateaus der Messkurve ebenfalls erst nach den in der Humanmedizin üblichen sechs Minuten beobachtet und die Messzeit ebenfalls auf zwölf Minuten festgelegt (Held 2018). Sowohl in der eigenen Referenzintervallstudie als auch in der Patientenstudie wurde folglich dieselbe Zeit eingehalten.

### **4.3 Diskussion der Ergebnisse**

#### **4.3.1 Multiplate® Analyzer Referenzintervalle bei Kleinpferden**

##### **4.3.1.1 Auswahl gesunder Probanden**

Wie in den Ein- und Ausschlusskriterien festgelegt, durften die Probanden für die Referenzintervallstudie keine klinischen Abweichungen zeigen, die auf akute entzündliche oder erhebliche Erkrankung hinweisen. Zudem wurden Entzündungsparameter im Blut bestimmt und eine hämatologische Untersuchung durchgeführt, um eventuell vorhandene, subklinische Veränderungen, die die thrombozytäre Funktion beeinflussen könnten, zu detektieren bzw. betroffene Probanden auszuschließen.

##### **4.3.1.1.1 Globuline und Fibrinogenkonzentration**

Alle Fibrinogenkonzentrationen befanden sich im Referenzbereich von 1,25-3,29 g/l. Bei drei Probanden wurden erhöhte Konzentrationen an Globulinen im Blut nachgewiesen. Die Ergebnisse eines Kleinpferdes ohne Rassezugehörigkeit (Nr. 14) wurden aufgrund zusätzlich erhöhter Leukozytenzahl (gemäß der Ausschlusskriterien, s. Kapitel 3.1.1) nicht in die Studie einbezogen. Die beiden weiteren Probanden Nr. 18 und 53 mit erhöhten Globulinen zeigten weder in der klinischen Untersuchung noch im restlichen Blutbild Veränderungen. Da die Globulinwerte nur geringfügig oberhalb des Referenzlimits lagen (Nr. 18: 46,3 g/l und Nr. 53: 44,3 g/l), verblieben ihre Ergebnisse in der Studie.

Ziel der Bestimmung der beiden Entzündungsparameter war es, bei den insgesamt 61 Probanden für die Multiplate®-Referenzintervallstudie sicherzustellen, dass nicht bereits *in vivo* eine entzündlich bedingte Aktivierung der Thrombozyten vorlag. Dies konnte nach Ansicht der Autorin belegt werden.

##### **4.3.1.1.2 ADVIA2120®**

Bei insgesamt vier klinisch unauffälligen Kleinpferden befanden sich die Leukozyten nicht im Referenzintervall, wobei zwei Equiden eine geringgradige Leukopenie (3,31 und  $4,32 \times 10^9/l$ ) und zwei Pferde eine geringgradige Leukozytose (10,42 und  $11,47 \times 10^9/l$ ) zeigten.

## DISKUSSION

10<sup>9</sup>/l) zeigten. Das Kleinpferd Nr. 14 mit den erhöhten Globulinen wies die Leukozytose mit 10,42 x 10<sup>9</sup>/l auf, sodass es von der Studie ausgeschlossen wurde.

Ein Grund für die drei weiteren geringfügigen Abweichungen könnten interindividuelle Variationen sein. Es wurde das laborinterne Referenzintervall von 4,37-8,96 x 10<sup>9</sup>/l verwendet, wobei dies nicht rassespezifisch erstellt wurde. Wie bei jedem Referenzintervall könnte es also sein, dass in der eigenen Untersuchung Probanden einbezogen wurden, die gesund aber gleichwohl nicht innerhalb des Leukozyten-Referenzintervalls lagen. In der pferdemedizinischen Literatur bestehen zum Teil erhebliche Unterschiede in als physiologisch bewerteten Leukozytenzahlen bei gesunden adulten Pferden (s. Tab. 15).

**Tab. 15: Ausgewählte Publikationen zu Referenzintervallen der Leukozytenzahl bei gesunden adulten Pferden**

Autor	RI Leukozytenzahl (x 10 <sup>9</sup> /l)
Lumsden et al. 1980	7,5±1,3
Lassen und Swardson 1995	5,5-12,5
Clark et al. 2002	8,8±1,2
Kraft/Dürr 2013	5-10
Köller et al. 2014	4,4-12
Handbuch Pferdepraxis 2016	3,5-9,4
Zentrallabor Klinik für Kleintiere, JLU Gießen	4,37-8,96

RI: Referenzintervall; Werte angegeben in Mittelwert ± Standardabweichung bzw. unterer bis oberer Grenzwert

Auch eine durch die Blutentnahme stressbedingte geringgradige Leukozytose mit Neutrophilie kann ein Auslöser für den einen Probanden mit dem leicht erhöhten Leukozytenwert sein. Andererseits könnte eine klinisch nicht feststellbare entzündliche Erkrankung Ursache der veränderten Leukozytenzahlen sein. Da jedoch bei keinem der Kleinpferde weitere Abweichungen in der Klinik, Hämatologie und klinischen Chemie bestanden, ist diese Ursache für die drei Probanden als unwahrscheinlich anzusehen. Die 61 Kleinpferde sind somit nach Ansicht der Autorin als geeignete Population für diese Studie anzusehen. Trotz alledem könnte das Einschlusskriterium, dass ein

Entzündungswert abweichend aus dem Referenzintervall sein darf, als Limitation gesehen werden, wenn der Gesundheitszustand damit tatsächlich noch als „gesund“ definiert wird.

### **4.3.1.2 Bestimmung der Referenzintervalle**

Ein Referenzintervall wird als Bezugssystem zwischen einem Messwert eines Patienten und den Messwerten einer gesunden Vergleichspopulation definiert. Das System ist allerdings nur für das jeweils genutzte Analyseverfahren anzuwenden. Das Referenzintervall eines Parameters ist also nur für die jeweilige Population und Untersuchungsmethode gültig. Daher sollte jedes Labor seine Referenzintervalle überprüfen und gegebenenfalls neu erstellen, da diese je nach Analysemethode und Referenzpopulation deutlich variieren können (Schwendenwein 2013). Laut der Leitlinie C28-13c des CLSI ist für jedes Großlabor das Erstellen eigener Referenzintervalle empfehlenswert. Da das Ermitteln von Referenzintervallen aufwendig und kostenintensiv ist, können aber bereits vorhandene Referenzintervalle unter bestimmten Voraussetzungen übernommen werden (Horowitz 2008). Dafür müssen aber die analytischen Methoden möglichst identisch und die eigene Population gut vergleichbar mit der verwendeten Referenzpopulation sein.

Die Referenzintervallerstellung für den Multiplate® Analyser erfolgte prinzipiell nach den Empfehlungen der International „Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine“ (IFCC) und des „Clinical and Laboratory Standards Institute“ (CLSI) sowie der tiermedizinisch basierten Organisation namens „American Society for Veterinary Clinical Pathology“ (ASVCP). In der eigenen Arbeit wurde den von diesen Institutionen vorgegebenen Regeln entsprechend zunächst überprüft, ob sich das bereits durch Held ermittelte Referenzintervall für Warmblutpferde auch für die kleinen Equiden eignet. Dafür wurden initial die Ergebnisse von 20 eigenen Probanden mit denen der Warmblüter verglichen. Da mindestens fünf Messungen jeweils im COLtest, ADPtest oder ASPtest der Kleinpferde außerhalb der jeweiligen Referenzintervalle der Großpferde lagen, war laut IFCC und CLSI das Erstellen eines eigenen Referenzintervalls notwendig. Eine Anzahl von mindestens 120 Probanden ist dafür empfehlenswert. Die überarbeitete CLSI Leitlinie zur Erstellung von Referenzintervallen

erlaubt allerdings eine kleinere Probandenanzahl, die zwischen 40 und 120 liegt. Vorwiegend aus Kostengründen wurden 61 Probanden in die eigene Studie aufgenommen. Laut internationalen Empfehlungen konnte nun davon ausgegangen werden, dass bei geeigneter Auswahl der Probanden valide Referenzintervalle mit dieser Anzahl erstellt werden können.

Für die statistische Analyse wurde die nach CLSI empfohlene robuste Methode nach Horn (1998) angewandt. Diese Methode wird bei nicht normalverteilten Häufigkeitsverteilungen, wie sie in der eigenen Studie überwiegend aufzufinden waren, bevorzugt. Um annähernd normalverteilte Daten zu erhalten, wurden diese mittels einer Box-Cox-Transformation umgewandelt. Erreicht man trotz dieser Transformation keine Normalverteilung, sollte eine nichtparametrische Methode eingesetzt werden, da dann keine symmetrische Verteilung der Messdaten benötigt wird (Geffré et al. 2011).

Mit dem kostenfreien Programm „Reference Value Advisor v2.1“, erhältlich als Freeware auf <http://www.biostat.envt.fr/reference-value-advisor/> (letzter Zugriff Dezember 2019), wurden *de novo* Referenzintervalle anhand der Daten der 61 klinisch unauffälligen Kleinpferde für vier Tests des Multiplate® Analyzers erstellt. Dieses Programm ist in der Veterinärmedizin etabliert (Geffré et al. 2011). Es ließen sich für alle vier Tests Referenzintervalle mit den oben erwähnten statistischen Methoden berechnen, die das Programm anbietet. Dabei wurde für den COLtest die robuste, Box-Cox transformierte Methode gewählt. Bei den Ergebnissen der weiteren drei Thrombozytentests (ADPtest, ADPtest HS und ASPitest) konnte trotz Transformation keine symmetrische Datenverteilung erreicht werden, sodass die nichtparametrische Methode angewandt wurde. Damit wurden die Referenzintervalle nach den aktuellen Leitlinien zur Erstellung von Referenzintervallen erarbeitet.

#### **4.3.1.3 Rasseabhängige Unterschiede der Thrombozytenfunktion**

Die einzelnen Multiplate® Messwerte der eigenen gesunden Kleinpferde wurden im Nachhinein mit denen der gesunden Warmblutpferde aus der Dissertation von Held (2018) verglichen. Es wurden bis auf den ADPtest HS signifikante Unterschiede zwischen den Aggregationswerten der beiden Gruppen berechnet, so dass sich die

## DISKUSSION

Notwendigkeit, zumindest für die drei anderen Aktivierungstests eigene Referenzintervalle bestimmen zu müssen, indirekt nochmals bestätigte. Insbesondere bei dem ASPItest wurde erstmals ein deutlicher Unterschied mit  $p < 0,0001$  mit deutlich niedrigeren Aggregationswerten der Kleinpferd-Thrombozyten gefunden. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich die Blutplättchen der Kleinpferde durch Arachidonsäure deutlich weniger aktivieren lassen als die Warmblut-Thrombozyten. Somit ist zu vermuten, dass Kleinpferde häufiger eine Aspirin® Resistenz aufweisen können als es bereits bei einigen Warmblutpferden nachgewiesen wurde (Roscher et al. 2017). Aufgrund der nicht unerheblichen praktischen Relevanz wären weitere Studien zum gerinnungshemmenden Effekt von ASS bei Kleinpferden und Ponys wünschenswert.

In der humanen Literatur wurden keine Unterschiede in der thrombozytären Funktion zwischen weißer und afroamerikanischer Bevölkerung nachgewiesen (Miller et al. 2014). In einer Hundestudie wurden bei den Rassen Cavalier King Charles Spaniel, Cairn Terrier, Boxer und Labrador Retriever Untersuchungen der thrombozytären Funktion mittels eines Vollblut-Impedanzaggregometers (Chrono-Log®, Havertown, USA) vorgenommen. Dabei konnte eine signifikant höhere ADP-induzierte Aggregation bei den Cavalier King Charles Spaniel gemessen werden (Nielsen et al. 2007).

Erstmals liegen mit dieser Studie Ergebnisse vom Multiplate® Analyser zur Untersuchung der Plättchenfunktion bei zwei Pferdegruppen vor, wobei es die nachgewiesenen Unterschiede in der Arachidonsäure-, ADP- sowie Kollagen-induzierten Aggregation nahelegen, dass weitere Rassespezifizierungen notwendig sein könnten.

### **4.3.1.4 Gruppierung der Werte beim ADPtest und ADPtest HS**

Die Ergebnisse der gesunden Kleinpferde scheinen sowohl beim ADPtest als auch beim ADPtest HS in zwei Subgruppen aufgeteilt zu sein (s. Abb. 10 und Abb. 11). Durch die Autorin wurde mittels Häufigkeitsauszählungen manuell geprüft, ob sich diese Subgruppen hinsichtlich Rasse, Alter oder Geschlecht unterscheiden - dies ließ sich nicht zeigen. Dabei zeigten die gleichen Individuen in den beiden Tests hohe bzw.

niedrige Werte. In einer eigenen Analyse mittels des Excel Kalkulationsprogramms wurde eine positive Korrelation zwischen den Werten beider Tests von 0,94 ermittelt. Untersuchungen bei Menschen am Multiplate® Analyzer ergaben signifikant höhere ADPtest Werte bei Adipösen im Vergleich zu Normalgewichtigen und Schlankeren (Campello et al. 2015). Eine nachträgliche Überprüfung des BCS bei den eigenen Probanden ergab keine entsprechende Beziehung, sodass der Ernährungszustand der Tiere höchstwahrscheinlich nicht ursächlich für die deutlich unterschiedliche Aktivierbarkeit der Kleinpferd-Thrombozyten mittels ADPtest und ADPtest HS ist. Eine weitere Studie mit deutlicheren Unterschieden der Probanden hinsichtlich ihres BCS wäre allerdings erforderlich, um diesen möglichen Einflussfaktor zu prüfen. Anhand der eigenen Ergebnisse lässt sich jedenfalls kein Zusammenhang zwischen BCS und thrombozytärer Funktion darstellen.

#### **4.3.1.5 Einfluss ausgewählter hämatologischer Parameter auf die Thrombozytenfunktion bei gesunden Kleinpferden**

In der eigenen Arbeitsgruppe wurden die Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, MPC, MPV sowie Erythrozytenzahl und Hämatokrit zur Überprüfung ihres Einflusses auf die thrombozytäre Funktion ausgewählt.

##### **4.3.1.5.1 Leukozytenzahl**

Es wurden Regressionsanalysen zur Überprüfung eines Zusammenhangs zwischen der Leukozytenzahl und der Thrombozytenfunktion bei gesunden Kleinpferden durchgeführt. Es ergaben sich statistisch signifikante, schwach positive Korrelationen für alle vier Tests. Dabei lag der Korrelationskoeffizient zwischen 0,27 und 0,37. Aufgrund dieser sehr schwachen Zusammenhänge wurde nicht von einer klinischen Relevanz ausgegangen. Auch Held (2018) konnte bei gesunden Warmblutpferden keine relevant erscheinenden Zusammenhänge zwischen der Leukozytenzahl und der thrombozytären Aggregation ausfindig machen.

Diese Ergebnisse werden durch eine humanmedizinische Arbeit untermauert, in der ebenfalls keine signifikanten Korrelationen zwischen Leukozytenzahl und den am Multiplate® Analyzer gemessenen AUCs bei Verwendung von ADP, Arachidonsäure und

## DISKUSSION

Kollagen bei gesunden Individuen ( $n = 120$ ) festgestellt wurden (Seyfert et al. 2007). Eine weitere humanmedizinische Studie fand allerdings einen signifikanten ( $p < 0,001$ ) positiven Zusammenhang ( $r = 0,61$ ) zwischen ADPtest und Leukozytenzahl (Diehl et al. 2010). Dabei handelte es sich um Patienten ( $n = 32$ ), die unterschiedliche Erkrankungskomplexe wie Hyperlipämie oder Diabetes mellitus aufwiesen, was das Ergebnis der Studie beeinflusst haben könnte.

Insofern ist es erstaunlich, dass sich in der eigenen Studie an gesunden Kleinpferden statistisch signifikante, wenngleich schwache Zusammenhänge ergaben, obgleich darauf geachtet wurde, dass keine Entzündungsreaktionen vorlagen.

### 4.3.1.5.2 Thrombozytenzahl

Die einfaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung eines möglichen Einflusses der absoluten Thrombozytenzahl auf die thrombozytäre Funktion ergab keine statistisch signifikanten Ergebnisse bei allen verwendeten Aktivatoren (COLtest  $r = 0,1$ , ADPtest  $r = 0,11$ , ADPtest HS  $r = 0,04$ , ASPItest  $r = 0,02$ ).

Die meisten humanmedizinischen Studien bei gesunden Probanden kamen zu ähnlichen Resultaten. So untersuchten Tóth et al. (2006), ob die durch Kollagen- und Adenosindiphosphat induzierte Thrombozytenaggregation von der Plättchenanzahl abhängig war – was sich nicht belegen ließ. Auch die Untersuchung der Arbeitsgruppe um Beyan (2006) stellte keinen Einfluss der Plättchenzahl auf die thrombozytäre Funktion bei gesunden Menschen fest. Dafür wurden die Aktivatoren Kollagen, Adenosindiphosphat und Epinephrin genutzt. Es gibt jedoch auch Studien, die die These stützen, dass die Thrombozytenzahl einen Einfluss auf die Aggregation besitzt. Seyfert et al. (2007) untersuchten 120 Menschen und stellten bei der ADP- und Kollagen-induzierten Aggregation einen Zusammenhang fest ( $p = 0,002$  bzw.  $0,0006$ ). Allerdings waren die Korrelationen mit  $0,21$  bzw.  $0,23$  sehr schwach. In einer weiteren Studie wurden 417 Patienten mit einer Koronararterienerkrankung unter ASS und 21 gesunde Individuen ohne Medikation verglichen (Würtz et al. 2011). Es gab einen Einfluss der Plättchenzahl auf die Kollagen-induzierten ( $p < 0,0001$ ) und die Arachidonsäure-induzierte Aggregation ( $p < 0,0001$ ) bei den Kranken, jedoch waren die Korrelationen auch hier recht schwach ausgeprägt ( $r = 0,36$  bzw.  $0,39$ ). Einen

## DISKUSSION

Zusammenhang zwischen der Thrombozytenzahl und der thrombozytären Aggregation durch Arachidonsäure gab es auch bei den gesunden Individuen ( $p = 0,03$ ), wobei mit 0,47 auch hier die Stärke des Zusammenhangs recht schwach ausfiel.

In den humanmedizinischen Studien lagen die Thrombozytenzahlen stets im Referenzbereich. Ebenso lag entsprechend der Einschlusskriterien die Anzahl der Blutplättchen in der eigenen Studie in der Norm. Sowohl in den meisten Studien bei gesunden Menschen als auch in der eigenen Referenzintervallstudie ließen sich zwischen den physiologischen Thrombozytenzahlen und der Stärke der induzierten Aggregation durch die im Multiplate® verwendeten Aktivatoren keine stärkeren Zusammenhänge erkennen. Dies ist insofern von Vorteil, dass bei der Interpretation der Multiplate®-Ergebnisse zumindest bei Gesunden die absolute Anzahl der Thrombozyten nicht berücksichtigt werden muss. Ob zu niedrige bzw. zu hohe Thrombozytenzahlen einen Zusammenhang mit der mittels Multiplate® festzustellenden Funktion der Blutplättchen aufweisen wäre durch entsprechende Untersuchungen bei kranken Equiden noch zu prüfen.

### 4.3.1.5.3 Thrombozytäre Variablen

Die mittlere Konzentration der Thrombozytenbestandteile („Mean Platelet Concentration“: MPC) erfasst die Plättchengranularität (Goddard et al. 2015). Sie gilt als Maß für die Aktivierung der Thrombozyten und wird mittels des ADVIA2120® routinemäßig bestimmt. Eine Aktivierung der Thrombozyten sorgt neben ihrer Formänderung auch für eine Degranulation. Aufgrund der Degranulation verringert sich die thrombozytäre Granularität und das Laborgerät ermittelt eine verminderte MPC (Boos et al. 2007).

Patienten mit einer tiefen Venenthrombose wiesen signifikant niedrigere MPC-Werte auf ( $p < 0,001$ ) als die Kontrollgruppe ohne sonografisch nachweisbare Veränderungen an den unteren Extremitäten (Cay et al. 2012). Die Arbeitsgruppe von Moritz (2005) bestimmte die MPC bei 20 Hunden mit septischen und nichtseptischen inflammatorischen Erkrankungen. Bei 16 der 20 Kranken (elf nichtseptische und fünf septische Hunde) lag die MPC unterhalb des Referenzbereichs (Moritz et al. 2005). Einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) gab es zwischen der Gruppe der elf

## DISKUSSION

nichtseptisch erkrankten und den 20 gesunden Hunden. Im Pferdebereich wiesen insbesondere Neonaten ( $n = 11$ ;  $p < 0,002$ ) mit einer disseminierten intravasalen Gerinnungsstörung (DIG) und adulte Pferde mit einem SIRS ( $n = 84$ ;  $p < 0,001$ ) bzw. einer Thrombozytopenie ( $n = 44$ ;  $p < 0,001$ ) signifikant erniedrigte MPCs auf, die mit den Werten altersgemäß angepasster Kontrollgruppen (22 Fohlen bzw. 45 Adulte) verglichen wurden (Segura et al. 2007).

Die menschlichen bzw. tierischen Patienten in den oben genannten Studien litten an schwerwiegenden kardiovaskulären und bzw. entzündlichen Erkrankungen. In der eigenen Studie zur Referenzintervallerstellung fand sich kein relevanter Zusammenhang zwischen der Thrombozytenfunktion und der MPC bei den 61 klinisch unauffälligen Kleinpferden. Zwar wurde ein statistisch signifikanter negativer Zusammenhang zwischen der MPC und dem ADPtest ( $p = 0,03$ ) bzw. dem ADPtest HS ( $p = 0,042$ ) errechnet, allerdings lagen die Korrelationskoeffizienten mit  $-0,28$  bzw.  $-0,26$  in derart niedrigen Bereichen, dass dies als klinisch nicht relevant einzuschätzen ist. In der Arbeit von Held (2018) wurden bei gesunden Warmblütern keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen der Plättchenfunktion und der MPC gefunden (Held 2018).

Neben der MPC gilt das „Mean Platelet Volume“ (MPV) als wichtiger Marker für eine Thrombozytenaktivierung (Boos et al. 2007). In der Humanmedizin werden erhöhte MPV Werte in Zusammenhang mit kardiovaskulären Krankheiten wie Schlaganfall (Greisenegger et al. 2004) und Myokardinfarkt (Endler et al. 2002) gebracht. Dabei zeigten große Blutplättchen mit entsprechend hohem MPV eine stärkere Aktivierung als die kleineren Thrombozyten (Mangalpally et al. 2010). Die Freisetzung der  $\alpha$ -Granula, der Gehalt an dense Bodies, die Aktivierung von Oberflächenproteinen und die Thromboxansynthese war im Vergleich mit den kleinen Thrombozyten signifikant erhöht. Somit wiesen die Autoren einen direkten Zusammenhang zwischen dem MPV und der thrombozytären Aktivierbarkeit nach. Allerdings konnte bei gesunden Menschen kein Zusammenhang des MPV mit der Thrombozytenfunktion (gemessen mittels turbidometrischer Methode) erkannt werden (Beyan et al. 2006). Dieses Ergebnis stimmt mit den eigenen Untersuchungen überein. Es besteht zwar ein

statistisch signifikanter Zusammenhang (p-Wert jeweils 0,007) zwischen dem MPV und der Aktivierbarkeit der equinen Thrombozyten mittels ADPtest und ADPtest HS, allerdings sind die Korrelationskoeffizienten mit je 0,34 wiederum recht klein. Daher lässt sich bei gesunden Kleinpferden auch vom MPV nicht auf deren thombozyäre Aktivierbarkeit schließen. Zu dem gleichen Ergebnis kam Held (2018) in ihrer Arbeit bei gesunden Großpferden.

#### 4.3.1.5.4 Variablen des roten Blutbildes

Anhand der statistischen Analyse sollte eine potentiell mögliche Korrelation zwischen der Anzahl der roten Blutkörperchen sowie des Hämatokritwerts und der thrombozytären Aggregationsfähigkeit geprüft werden.

Aus humanmedizinischen Untersuchungen ist bekannt, dass Erythrozyten einen proaggregatorischen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion besitzen. So können die roten Blutzellen u.a. bei Deformation den potenten Aktivator ADP freisetzen (Lüthje 1989). Zudem sind Erythrozyten in der Lage über ihre Nukleosidtransporter extrazelluläres Adenosin aufzunehmen. Das Nukleosid wird entweder direkt aus verschiedenen Geweben freigesetzt, oder es entsteht als Endprodukt aus dem extrazellulären Adenin-Nukleotid-Metabolismus. Dieses Substrat kann dann nicht mehr als Inhibitor der Thrombozytenfunktion fungieren (Lüthje 1989). In humanmedizinischen Studien wurden positive Zusammenhänge zwischen dem Hämatokritwert und der Thrombozytenfunktion am VerifyNow® festgestellt (Kakouros et al. 2013, Kim et al. 2014). Das VerifyNow® System ist ein vollautomatisiertes Point-of-Care Gerät, das das Prinzip der Lichttransmissionsaggregometrie nutzt. Es misst eine Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation bei Verwendung von P2Y<sub>12</sub> Inhibitoren, ASS und GPIIb-IIIa Inhibitoren.

Dagegen entdeckten Würtz et al. (2012) eine negative Korrelation zwischen beiden Blutvariablen (Erythrozytenzahl und Hämatokrit) und der Kollagen-induzierten Aggregation am Multiplate® Analyzer (Würtz et al. 2012). Die Autoren begründeten dies folgendermaßen: eine hohe Anzahl an Erythrozyten nahe der Elektroden sorgt für die erschwerte Adhäsion der Thrombozyten; eine These, die zunächst von Muller et al. 1995 vertreten wurde. Außerdem wird der potente Plättchenmediator ADP in großer

## DISKUSSION

Menge in die roten Blutkörperchen aufgenommen. Bei hohem Hämatokrit reicht vermutlich die vorhandene Menge an ADP für eine ausreichende Plättchenaggregation nicht aus (Mackie et al. 1984). Die Arbeitsgruppe von Rubak hat dagegen keinen Einfluss des Hämatokrits auf die Stärke der Aggregation mittels Multiplate® Analyser feststellen können (Rubak et al. 2012). Dieses Ergebnis wurde in der eigenen Untersuchung bei gesunden Kleinpferden und in der Arbeit von Held bei gesunden Warmblutpferden (Held 2018) bestätigt.

### 4.3.2 SIRS-Patienten

#### 4.3.2.1 Vergleich der Thrombozytenfunktion von gesunden Kleinpferden und Warmblütern mit SIRS-Patienten

Mittels der zweifaktoriellen Varianzanalyse wurde geprüft, ob signifikante Unterschiede in der Thrombozytenfunktion bestehen, die durch die Faktoren Rasse (Kleinpferd vs. Warmblut) oder Gruppe (gesund vs. SIRS) verursacht sind.

Ausschließlich beim ASPItest wurden signifikant niedrigere Aggregationswerte bei den SIRS-Patienten im Vergleich mit den Gesunden mit  $p < 0,0001$  ermittelt (s. Abb. 25). Anders als bei den weiteren Multiplate® Tests (s. Abb. 21, Abb. 22, Abb. 23) lassen sich kaum Überschneidungen der Werte zwischen den SIRS-Patienten und Kontrolltieren erkennen. Eine Studie aus der Humanmedizin lieferte vergleichbare Ergebnisse: bei 47 septischen Patienten wurde eine im Vergleich mit 15 gesunden Kontrollen um bis zu 50% verringerte Arachidonsäure-induzierte Aggregation gemessen (Yaguchi et al. 2004). Auch bei 25 an schweren entzündlichen Erkrankungen leidenden Hunden wurde, verglichen mit 65 klinisch gesunden Kontrolltieren, eine signifikant niedrigere Arachidonsäure-induzierte Aggregation der Thrombozyten ermittelt (Abid et al. 2015). Eine Erklärung hierfür könnte Folgende sein: Arachidonsäure wird über die COX-1 unter anderem in Prostaglandin  $H_2$  ( $PGH_2$ ) umgewandelt. Ist die  $PGH_2$  Konzentration erhöht, so hat dies einen inhibitorischen Effekt auf die Plättchenfunktion (Quinn 2005). Zu einer gesteigerten Arachidonsäurefreisetzung und folgend erhöhter Prostaglandinproduktion kommt es *in vivo* unter anderem bei entzündlichen Erkrankungen. Wird dann bei einer aggregometrischen Untersuchung weitere Arachidonsäure hinzugegeben, könnte letztlich eine so hohe  $PGH_2$  Konzentration entstehen, dass die Thrombozytenfunktion *in vitro* gehemmt wird. Dies wird dann an der verminderten Arachidonsäure-induzierten Aggregation erkenntlich.

Ein weiterer Erklärungsansatz für eine verminderte Aggregation im ASPItest bei den eigenen Patienten könnte die Verabreichung von NSAIDs sein. Ausschlusskriterium in der eigenen SIRS-Studie war lediglich die Vorbehandlung mit Gerinnungshemmern. Insbesondere Flunixin Meglumine und Phenylbutazon als nicht selektive COX-Hemmer finden in der Pferdemedizin regelmäßig Verwendung. Auch der Großteil der Equiden in

## DISKUSSION

der eigenen Patientenstudie wurde mit diesen NSAIDs vorbehandelt. Die Wirkstoffe sorgen für eine signifikante Abnahme der Thromboxan B<sub>2</sub> Konzentration. Dies ist vermutlich auf eine Hemmung der thrombozytären COX zurückzuführen (Burkett et al. 2016). Daraus wird eine verminderte Aggregation im ASPItest resultieren. Da jedoch bei den eigenen, mit NSAIDs vorbehandelten SIRS-Patienten, auch einige ASPItest AUCs in der Referenz lagen, scheint diese Erklärung nicht für alle Fälle zu gelten.

Insgesamt zeigten 16 der eigenen 20 SIRS Erkrankten abweichende Ergebnisse am Multiplate® Analyzer. Dabei lagen bei mindestens einem Test die Resultate außerhalb des rassespezifischen Referenzintervalls (siehe Tab. 10). Die abweichenden Werte waren hauptsächlich beim COLtest und beim ASPItest zu verzeichnen. Bei neun der 20 SIRS Patienten wurden veränderte COLtest Werte gemessen. Vier der neun abweichenden Messungen lagen oberhalb und somit die verbleibenden fünf unterhalb des rassespezifischen Referenzintervalls. Vergleichbare Ergebnisse wurden in einer humanmedizinischen Untersuchung festgestellt. Bei 62 Patienten mit SIRS bzw. unkomplizierter Sepsis wurden im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (n = 42) signifikant höhere Aggregationswerte (p = 0,01) anhand des Multiplate® Analyzers im COLtest gemessen. Patienten mit schwerer Sepsis oder septischen Schock (n = 43) hingegen wiesen signifikant niedrigere Werte (p = 0,001) bei diesem Test auf (Davies et al. 2014). Daraus wurde gefolgert, dass Patienten mit einer weniger schwerwiegenden entzündlichen Erkrankung eher höhere Werte aufweisen, während die lebensbedrohlich erkrankten Menschen (schwere Sepsis, septischer Schock, DIG) deutlich niedrigere Ergebnisse zeigen. In der eigenen Untersuchung wurden die Probanden nicht in SIRS Schweregrade aufgeteilt. Bei künftigen Untersuchungen sollte dies berücksichtigt werden, da sich eventuell mittels des COLtests prognostische Aussagen auch beim Pferd ableiten lassen.

Da in der eigenen Untersuchung die Mittelwerte der Kranken und Gesunden statistisch verglichen wurden, wird die große Streuung der COLtest Werte bei den Patienten sowohl in erhöhte als auch in erniedrigte Bereiche die fehlende statistische Signifikanz zu den Gesunden bedingt haben (s. Abb. 21). Da bei neun der 20 Patienten abweichende Ergebnisse im COLtest detektiert wurden, ist dieser Test gleichwohl bei

## DISKUSSION

der Ermittlung von thrombozytären Dysfunktionen bei Equiden als klinisch relevant einzuschätzen. Sein potentiell prognostischer Wert hinsichtlich des Schweregrades bzw. der Überlebensrate bei systemischen Entzündungen beim Pferd sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Anhand der eigenen Studienergebnisse konnte erstmals gezeigt werden, dass der Multiplate® Analyzer für eine Untersuchung der Thrombozytenfunktion bei Equiden mit SIRS geeignet ist. Eine mittels Multiplate® Analyzer detektierte Thrombozytendysfunktion, erkenntlich durch eine verminderte Aggregation, wurde bei Vorliegen eines SIRS oder einer Sepsis bereits in humanmedizinischen Arbeiten erkannt (Adamzik et al. 2012, Brenner et al. 2012). Dabei wurden die Aktivatoren Kollagen (COLtest), Arachidonsäure (ASPItest), ADP (ADPtest) und Thrombin Rezeptor Aktivierungspeptid 6 (TRAPtest) angewandt. Die Thrombozytenaggregation im ASPItest ( $p = 0,02$ ) und COLtest (mit  $p = 0,001$ ) war bei 16 Patienten zudem in der 28-Tage-Mortalitätsgruppe signifikant verringert - im Vergleich zur Gruppe der Überlebenden mit 89 Menschen (Davies et al. 2014). Die Autoren erklärten die verminderte Aggregation folgendermaßen: durch systemische Entzündungen bereits *in vivo* aktivierte Thrombozyten lassen sich durch die zugesetzten Aktivatoren nicht mehr oder nur noch kaum stimulieren. Hierdurch kommt es zu einem deutlich geringeren Anhaften und Aggregieren an den Elektroden. Der elektrische Widerstand zwischen den Elektroden bleibt somit niedriger, daraus folgt ein entsprechend erniedrigter Aggregationswert. In einer veterinärmedizinischen Studie zur Detektion aktivierter Thrombozyten bei Hunden mit inflammatorischen Erkrankungen wurden ähnliche Ergebnisse gefunden. Dabei sollten die Thrombozyten im präparierten plättchenreichen Plasma durch Zugabe von Phorbol-Myristat-Acetat aktiviert werden. Bei sechs der 20 kranken Tiere kam es zu keiner Stimulation der Blutplättchen. Das Vorhandensein einer entzündlichen Erkrankung führt wahrscheinlich zu einem refraktären Zustand der Thrombozyten, sodass trotz Hinzugabe von Aktivatoren die Blutplättchen *in vitro* nicht mehr oder in deutlich geringerem Ausmaß aggregieren können (Moritz et al. 2005).

## DISKUSSION

Bei zwei der eigenen Patienten (Nr. 7 und 13) waren in allen vier Multiplate® Tests deutlich verminderte Aggregationen zu verzeichnen (s. Tab. 10). Im ASPItest lag der Wert sogar bei null, sodass die Thrombozyten durch diesen Agonisten überhaupt nicht mehr zu aktivieren waren. Folglich waren die Thrombozyten der Beiden mutmaßlich aufgrund der schweren systemischen Entzündung hypofunktional. Die Patienten litten an einer hochgradig ulzerativ-nekrotisierenden Typhlocolitis bzw. einer hochgradig hämorrhagisch-nekrotisierenden Aspirationspneumonie. Beide befanden sich im Schock bzw. in einer DIG und wurden aufgrund der Schwere der Erkrankung und der äußerst schlechten Prognose kurze Zeit nach Vorstellung euthanasiert. Daraus ergibt sich die Annahme, dass die Prognose bei entzündlich erkrankten Patienten als ungünstig einzuschätzen ist, wenn mehrere Multiplate® Tests pathologische Ergebnisse aufweisen.

Auch Pferde können als Folge einer schwerwiegenden systemischen Entzündung thrombotische Zustände bzw. eine DIG entwickeln. Um dem vorzubeugen wird den Intensivpatienten üblicherweise Dalteparin oder Heparin verabreicht. Acetylsalicylsäure als alternativer Wirkstoff sollte in Betracht kommen, wenn sichergestellt ist, dass sich die Thrombozyten der Patienten noch über den Cyclooxygenase-Weg aktivieren lassen. Der Einsatz des ASPItest ist potentiell hilfreich bei der Entscheidung, ob bzw. welche Thrombozytenfunktionshemmer angewandt werden sollten. Auch der COLtest sollte bei dieser Fragestellung berücksichtigt werden, da über die Stimulation des Kollagenrezeptors Arachidonsäure aus der Lipidmembran der Thrombozyten freigesetzt wird. Dieses Substrat wird ebenfalls über die Cyclooxygenase zum potenten Plättchenaktivator TXA<sub>2</sub> umgewandelt. Besteht bei beiden Tests eine stark verminderte Aggregation, ist dies ein Hinweis auf einen bereits fortgeschrittenen Schockzustand bzw. eine DIG. In solchen Fällen ist von dem Einsatz gerinnungshemmender Medikamente abzusehen.

### **4.3.2.2 Einfluss ausgewählter hämatologischer Parameter auf die Thrombozytenfunktion bei SIRS-Patienten**

#### **4.3.2.2.1 Leukozytenzahl**

Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass bei entzündlichen Ereignissen aktivierte Thrombozyten mit Leukozyten interagieren. Dabei entsteht der Kontakt über Adhäsionsmoleküle. Das thrombozytäre P-Selektin bindet an den P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 der Leukozyten. Ein weiterer Mechanismus besteht in der thrombozytären Sekretion von Chemokinen wie PF4, ADP oder ATP. Diese Substanzen sorgen für ein Anlocken und Aktivieren der Leukozyten (Evangelista und Smith 2013). Aktivierte neutrophile Granulozyten können wiederum die thrombozytäre Funktion beeinflussen. Es werden Substanzen die sich hemmend auswirken (Stickstoffmonoxid) oder die aggregationsfördernd sind (Myeloperoxidase, Cathepsin G) freigesetzt (Renesto und Chignard 1993, Evangelista und Smith 2013).

Bei den erkrankten Klein- und Großpferden der eigenen Studie wurde ein statistisch hochsignifikanter linearer Zusammenhang ( $p = 0,005$  bei den Kleinpferden und  $p = 0,001$  bei den Warmblütern) zwischen dem COLtest und der Leukozytenzahl mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,84 (Kleinpferd) und 0,87 (Warmblut) errechnet. Eine veränderte Leukozytenzahl wurde bei insgesamt elf von 20 Patienten detektiert, wobei fünf eine Leukopenie und sechs eine Leukozytose im Blut erkennen ließen.

Erstmals konnte durch diese Arbeit ein Zusammenhang bei an SIRS erkrankten Pferden zwischen der thrombozytären Aktivierbarkeit durch den COLtest und der Leukozytenzahl gezeigt werden. Ob von einer Kausalität auszugehen ist, müsste anhand weiterer Studien geprüft werden.

#### **4.3.2.2.2 Thrombozytenzahl**

Bei den neun erkrankten Kleinpferden konnte kein Zusammenhang zwischen der Thrombozytenzahl und der Funktion der Blutplättchen detektiert werden. Für die elf kranken Warmblüter wurden zwar statistisch schwach positive Zusammenhänge zwischen der Plättchenzahl und dem COLtest ( $p = 0,024$ ,  $r = 0,67$ ) bzw. ASPItest ( $p =$

## DISKUSSION

0,045,  $r = 0,61$ ) berechnet, allerdings sind diese aufgrund der relativ niedrigen Korrelationskoeffizienten nicht als klinisch relevant anzusehen.

Bei lediglich fünf (zwei Kleinpferde, drei Warmblüter) der 20 eigenen Patienten wurde eine Thrombopenie diagnostiziert, wobei drei der Warmblüter und ein Kleinpferd zudem eine verminderte Thrombozytenfunktion im COLtest oder ASPItest aufwiesen. Zwei der Patienten (Kleinpferd Nr. 7 und Warmblut Nr. 13) waren besonders schwer erkrankt, befanden sich bereits in einer DIG und mussten innerhalb kurzer Zeit aufgrund infauster Prognose euthanasiert werden. Andererseits war bei zwei Patienten (Nr. 5 und 10) nur der Wert jeweils eines Tests und bei einem Pferd (Nr. 11) in zwei Tests unterhalb der jeweiligen Referenzbereiche.

Somit wurde erstmals bei SIRS-kranken Equiden gezeigt, dass anhand der Thrombozytenzahl nicht auf deren Funktion geschlossen werden kann, sondern hierfür individuelle Bestimmungen notwendig sind.

Eine humanmedizinische Studie bei an systemisch entzündlichen Erkrankungen leidenden Patienten lieferte vergleichbare Ergebnisse. Allerdings wurden Patienten mit Thrombozytopenie ausgeschlossen und 97 Proben mit normaler Thrombozytenzahl untersucht. Die thrombozytäre Aggregation war signifikant ( $p < 0,005$  für COLtest, ADPtest, ASPItest) verringert bei schwerer Sepsis bzw. septischem Schock verglichen mit SIRS bzw. unkomplizierter Sepsis (Davies et al. 2014).

### 4.3.2.2.3 MPC und MPV

In den eigenen Untersuchungen wurden keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen der MPC und der thrombozytären Funktion ermittelt. Somit stellt die in der Routinehämatologie bestimmbare, thrombozytäre Variable MPC keinen geeigneten Indikator für eine Plättchenaktivierung bei an SIRS erkrankten Pferden dar. Dies steht im Widerspruch zu anderen veterinärmedizinischen Studien. Bei elf Hunden mit nicht septischen inflammatorischen Erkrankungen war die MPC signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ) als bei 20 gesunden Tieren (Moritz et al. 2005). Allerdings wurden keine Korrelationsberechnungen zur Prüfung eines Zusammenhangs der MPC mit den thrombozytären Funktionen angegeben. Dies gilt ebenfalls für eine Pferdestudie, in der thrombozytäre Variablen bei Equiden unterschiedlichen Alters und

## DISKUSSION

mit verschiedenen Erkrankungen bzw. Symptomen wie Thrombozytopenie, SIRS und Kolik (Obstruktionen, Enteritis, Ischämie) bestimmt und mit einer Kontrollgruppe verglichen wurden. Die adulten Equiden mit SIRS und Thrombozytopenie ( $n = 128$ ) wiesen hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) niedrigere MPC Werte, jene mit intestinalen Obstruktionen oder Enteritis ( $n = 97$ ) signifikant ( $p < 0,05$ ) niedrigere Werte auf als 45 gesunde Kontrollpferde (Segura et al. 2007). Da die Autoren keine thrombozytäre Funktionen bestimmten, stellt sich im Zusammenhang mit den eigenen Ergebnissen die Frage, ob für das Pferd die These, dass eine erniedrigte MPC mit erhöhter Aktivität der Blutplättchen einhergeht, aufrechterhalten werden kann.

Die MPV als weitere thrombozytäre Variable verzeichnete in den eigenen Untersuchungen beim erkrankten Warmblut einen negativen Zusammenhang ( $r = -0,6$ ;  $p = 0,05$ ) mit dem COLtest. Da nur eine schwache Korrelation und lediglich beim COLtest bestand, ist nicht von einer klinischen Relevanz des MPV bei an SIRS erkrankten Equiden auszugehen. Ein vergleichbares Ergebnis fand sich bei Pferden mit unterschiedlichen entzündlichen Erkrankungen (Segura et al. 2007). Zwar wurde in dieser Arbeit keine Korrelation zwischen der Plättchenfunktion und dem MPV errechnet, aber die Untersuchungen wiesen auch keinen statistischen Unterschied im MPV zwischen den Erkrankten und den Gesunden nach. Somit ist auch diese Thrombozytenvariable in der Pferdemedizin nicht als geeignet anzusehen, um den thrombozytären Aktivierungsstatus zu überprüfen.

### 4.3.2.2.4 Variablen des roten Blutbildes

In der eigenen Patientengruppe zeigten fünf Equiden eine Hämokonzentration und zwei eine Anämie. Dabei besaß statistisch weder die Erythrozytenzahl noch der Hämatokrit einen Einfluss auf die thrombozytäre Funktion bei an SIRS erkrankten Klein- und Großpferden. Ein vergleichbares Ergebnis lieferte eine Untersuchung bei anämischen Menschen (Kim et al. 2014). Bei 152 Patienten wurde mittels Impedanzaggregometrie die thrombozytäre Funktion gemessen und auf einen Zusammenhang mit dem Hämatokrit überprüft. Es wurde keine statistisch signifikante Korrelation festgestellt. Schlussfolgernd ist sowohl bei Menschen als auch bei Pferden

## DISKUSSION

mit SIRS kein Zusammenhang zwischen der Erythrozytenzahl bzw. des Hämatokrits und der Thrombozytenfunktion zu erwarten.

### 5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, unter Verwendung des Multiplate® Analyzers (Roche Diagnostics, Mannheim, D) die induzierte thrombozytäre Funktion bei Equiden mit systemisch relevanten, entzündlichen Erkrankungen (SIRS) zu ermitteln. Da mehr als fünf Messungen bei 20 gesunden Kleinpferden außerhalb der bereits in der eigenen Arbeitsgruppe erstellten Referenzbereiche von gesunden Warmblütern (Held 2018) lagen, wurde es notwendig, eigene Referenzintervalle für die kleineren Equiden zu bestimmen. Als Aktivatoren der Thrombozyten dienten Kollagen (COLtest), Adenosindiphosphat (ADPtest), ADP in Kombination mit Prostaglandin E<sub>1</sub> (ADPtest High Sensitivity: HS) sowie Arachidonsäure (ASPItest). Aus den Resultaten von 61 gesunden Probanden ergaben sich folgende Referenzbereiche: COLtest 78-398 U, ADPtest 22-367 U, ADPtest HS 10-355 U und ASPItest 3-319 U. In allen vier Tests wiesen die Kleinpferde im Vergleich zu den Warmblütern niedrigere Werte auf. Im ASPItest zeigten die Thrombozyten der Kleinpferde sogar eine hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) geringere Aggregation. Dies könnte mit einem noch geringeren Ansprechen bzw. einer höheren Resistenz gegen Acetylsalicylsäure bei den kleinen Equiden einhergehen, als es bereits bei Warmblutpferden gezeigt wurde (Roscher et al. 2017). Bei den weiteren drei Tests fanden sich zwischen den Rassen signifikante (ADPtest  $p=0,02$ , COLtest  $p=0,05$ ) bzw. knapp nicht signifikante Unterschiede (ADPtest HS  $p=0,06$ ). Ebenso wie bei den Warmblütern (Held 2018) wurden keine als relevant bewerteten Korrelationen zwischen den AUCs der vier Tests und Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, MPC, MPV, Erythrozytenzahl, Hämatokrit errechnet.

Innerhalb von 1,5 Jahren konnten 20 SIRS Patienten für die Studie rekrutiert werden. Bei 16 (80%) der 20 erkrankten Equiden fand sich in mindestens einem Multiplate® Test eine Abweichung vom rassespezifischen Referenzintervall. Bei zwei schwerstkranken Patienten wurden in allen vier Tests deutlich verminderte Aggregationen ermittelt. Die Thrombozyten bei diesen beiden nicht Überlebenden ließen sich im ASPItest gar nicht aktivieren. Ausschließlich für den ASPItest ( $p < 0,0001$ )

## ZUSAMMENFASSUNG

wurde mittels Varianzanalyse ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den SIRS Patienten und den gesunden Pferden errechnet.

Bei den SIRS-Patienten ergaben sich signifikante und aufgrund der Stärke des Zusammenhangs erwähnenswerte Korrelationen zwischen dem COLtest und der Leukozytenzahl sowohl bei den Kleinpferden ( $r=0,84$ ;  $p=0,005$ ) als auch bei den Warmblütern ( $r=0,87$ ;  $p=0,001$ ). Erstmals konnte damit eine signifikante Interaktion zwischen Thrombozytenfunktion und Leukozytenzahl bei Equiden mit SIRS detektiert werden.

In dieser Dissertation wurde erstmals gezeigt, dass Thrombozyten von Kleinpferden zumindest *in vitro*, induziert durch Arachidonsäure, ADP oder Kollagen, signifikant niedrigere Aggregationen zeigen als jene von Warmblutpferden. Dies erforderte die Erstellung eigener Referenzintervalle für die Kleinpferde, die hier beschrieben und künftig bei Messungen mit dem Multiplate® Analyser verwendet werden sollten. Erstmals wurden zudem Abweichungen in der thrombozytären Funktion bei an SIRS erkrankten Equiden von den rassespezifischen Referenzbereichen nachgewiesen. Insbesondere der ASPItest des Multiplate® Analyzers, aber auch der COLtest erwiesen sich als geeignet, im klinischen Zusammenhang die thrombozytäre Funktion zu überprüfen. Mit Hilfe dieser Analytik können bei Equiden mit systemisch entzündlichen Erkrankungen therapeutische Entscheidungen hinsichtlich des Einsatzes von Hemmern der Thrombozytenfunktion begründeter gefällt werden. In weiteren Studien bei an SIRS erkrankten Pferden sollten die prognostische Aussagekraft insbesondere des ASPItests und des COLtests weiter evaluiert sowie die Effekte von Funktionshemmern der Thrombozyten überprüft werden.

## 6 SUMMARY

The aim of this study was to evaluate platelet function in equines suffering from systemic inflammatory response syndrome (SIRS) with the Multiplate® Analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Because more than five Multiplate® Analyzer measurements out of 20 healthy ponies were outside the already established reference ranges of healthy warmbloods (Held 2018), therefore separate reference intervals for ponies needed to be calculated. The activators used were collagen (COLtest), adenosine diphosphate (ADPtest), ADP in combination with prostaglandin E<sub>1</sub> (ADPtest High sensitivity: HS) and arachidonic acid (ASPItest). The reference limits, established in 61 healthy ponies are: COLtest 78-398 U, ADPtest 22-367 U, ADPtest HS 10-355 U and ASPItest 3-319 U. In ponies, arachidonic acid induced highly significant ( $p < 0.0001$ ) less platelet aggregation than in warmbloods. This could be associated with an even lower response or higher occurrence of resistance to acetylsalicylic acid in the ponies than warmbloods, as shown by Roscher et al. 2017. In the other tests, pony results were either statistically significantly lower too (ADPtest  $p = 0.02$ , COLtest  $p = 0.05$ ) or just not statistically different (ADPtest HS  $p = 0.06$ ) compared with warmbloods. No relevant correlations were calculated between the strength of platelet aggregation in the four tests and white blood cell count (WBC), platelet count, MPC, MPV, erythrocyte count and hematocrit.

In 1.5 years, 20 SIRS affected horses and ponies were recruited. By using the breed specific reference intervals, sixteen (80%) equines showed a deviation in at least one Multiplate® test. Markedly decreased values in all four tests were found in two critically ill non-survivors. In the ASPItest, their platelets were not activated at all. ANOVA analyzes revealed statistically significant differences between healthy individuals and SIRS-affected equines exclusively for the ASPItest ( $p < 0.0001$ ).

In SIRS patients, statistically significant, positive correlations of considerable strength were found between COLtest results and the WBC in ponies ( $r = 0.84$ ;  $p = 0.005$ ) and warmbloods ( $r = 0.87$ ;  $p = 0.001$ ), which may suggest an interaction between platelets and leucocytes in equines with SIRS.

## SUMMARY

This study revealed for the first time, that pony platelets aggregate at least *in vitro* significantly less than those of warmbloods, if stimulated by arachidonic acid, ADP or collagen. Multiplate® Analyzer reference intervals for ponies needed to be determined and are presented within this dissertation. Differences in platelet function of SIRS-affected versus healthy equines were detected for the first time. In particular, the ASPItest of the Multiplate® Analyzer, but also the COLtest, seem to be suitable to determine the platelet function in a clinical context. Therapeutic decisions regarding the use of inhibitors of platelet function can reasonably be based on Multiplate® results. Furthermore, especially the ASPItest and the COLtest might be of considerable prognostic value in critically ill equines and this should be evaluated in further studies.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abid M**, Kalbantner K, Mischke R 2015. Platelet function in dogs with bacterial infections and leishmaniasis. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 128, 289-296.
- Adamzik M**, Görlinger K, Peters J, Hartmann M 2012. Whole blood impedance aggregometry as a biomarker for the diagnosis and prognosis of severe sepsis. *Crit Care* 16, R204.
- Aiolfi R**, Sitia G 2015. Chronic hepatitis B: role of anti-platelet therapy in inflammation control. *Cell Mol Immunol* 12, 264-268.
- Akira S**, Uematsu S, Takeuchi O 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Alevriadou BR**, Moake JL, Turner NA, Ruggeri ZM, Folie BJ, Phillips MD, Schreiber AB, Hrinda ME, McIntire LV 1993. Real-time analysis of shear-dependent thrombus formation and its blockade by inhibitors of von willebrand factor binding to platelets. *Blood* 81, 1263-1276.
- Anand SX**, Viles-Gonzalez JF, Badimon JJ, Cavusoglu E, Marmur JD 2003. Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease. *Thromb Haemost* 90, 377-384.
- Andonegui G**, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KV, Patel KD, Kubes P 2005. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* 106, 417-423.
- Antoniades C**, Bakogiannis C, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadis C 2009. The CD40/CD40 ligand system: linking inflammation with atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol* 54, 669-677.
- Armengou L**, Monreal L, Tarancón I, Navarro M, Ríos J, Segura D 2008. Plasma d-dimer concentration in sick newborn foals. *J Vet Intern Med* 22, 411-417.
- Aslam R**, Speck ER, Kim M, Crow AR, Bang KW, Nestel FP, Ni H, Lazarus AH, Freedman J, Semple JW 2006. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood* 107, 637-641.
- Aslam R**, Speck ER, Kim M, Freedman J, Semple JW 2008. Transfusion-related immunomodulation by platelets is dependent on their expression of MHC Class I molecules and is independent of white cells. *Transfusion* 48, 1778-1786.
- Assinger A** 2014. Platelets and infection-an emerging role of platelets in viral infection. *Front Immunol* 18, 649.
- Bailey SR**, Adair HS, Reinemeyer CR, Morgan SJ, Brooks AC, Longhofer SL, Elliott J 2009. Plasma concentrations of endotoxin and platelet activation in the developmental stage of oligofructose-induced laminitis. *Vet Immunol Immunopathol* 129, 167-173.

- Bampalis** VG, Brantl SA, Siess W 2012. Why and how to eliminate spontaneous platelet aggregation in blood measured by multiple electrode aggregometry. *J Thromb Haemost* 10, 1710-1714.
- Bauer** NB, Er E, Moritz A 2011. Influence of blood collection technique on platelet function and coagulation variables in dogs. *Am J Vet Res* 72, 64-72.
- Bauer** N, Keresztes M 2016. 2. Labordiagnostische Untersuchung. In: *Handbuch Pferdepraxis*, 4. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 25-33.
- Baumgarten** A, Wilhelmi M, Kalbantner K, Ganter M, Mischke R 2010. Measurement of platelet aggregation in ovine blood using a new impedance aggregometer. *Vet Clin Pathol* 39, 149–156.
- Beard** MJ, Jeewa Z, Bashir S, Cardigan R, Thomas S 2011. Comparison of platelet activation in platelet concentrates measured by flow cytometry or ADVIA 2120. *Vox Sang* 101, 122-130.
- Becht** JL, Semrad SD 1985. Hematology, blood typing, and immunology of the neonatal foal. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1, 91-116.
- Behr** T, Behr W., von Scheidt W 2010. Überwachung der Clopidogrel-Therapie mit Hilfe der Mehrfach-Elektroden Plättchen-Aggregometrie / Monitoring of clopidogrel treatment by multiple electrode platelet aggregometry. *J Lab Med* 34, 99-107.
- Belknap** JK, Moore JN, Crouser EC 2009. Sepsis-from human organ failure to lamellar failure. *Vet Immunol Immunopathol* 129, 155-157.
- Belknap** JK, Black SJ 2012. Sepsis-related laminitis. *Equine Vet J* 44, 738-740.
- Bertin** FR, Ruffin-Taylor D, Stewart AJ 2018. Insulin dysregulation in horses with systemic inflammatory response syndrome. *J Vet Intern Med* 32, 1420-1427.
- Bessman** JD, Gilmer PR, Gardner FH 1985. Use of mean platelet volume improves detection of platelet disorders. *Blood Cells* 11, 127-135.
- Beyan** C, Kaptan K, Ifran A 2006. Platelet count, mean platelet volume, platelet distribution width, and plateletcrit do not correlate with optical platelet aggregation responses in healthy volunteers. *J Thromb Thrombolysis* 22, 161-164.
- Blair** P, Flaumenhaft R 2009. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 23, 177-189.
- Bledzka** K, Pesho MM, Ma YQ, Plow EF 2013. Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . In *Platelets* AD Michelson, Ed. Amsterdam, 233-248.
- Boos** CJ, Beevers GD, Lip GYH 2007. Assessment of platelet activation indices using the ADVIATM 120 amongst 'high-risk' patients with hypertension. *Ann Med* 39, 72-78.
- Bone** RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101, 1644-1655.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Bone** RC 1992. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *JAMA* 268, 3452-5.
- Bonelli** F, Meucci V, Divers TJ, Jose-Cunilleras E, Corazza M, Tognetti R, Guidi G, Intorre L, Sgorbini M 2015. Plasma Procalcitonin Concentration in Healthy Horses and Horses Affected by Systemic Inflammatory Response Syndrome. *J Vet Intern Med* 29, 1689-91.
- Born** G 1962. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194, 927-929.
- Bos** CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH 2004. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1187-1205.
- Bosmann** M, Ward PA 2013. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol* 34, 129-136.
- Brass** LF, Newman DK, Wannermacher KM, Zhu L, Stalker TJ 2013. Signal transduction during platelet plug formation. In *Platelets*, AD Michelson, Ed. Amsterdam, 367-398.
- Breddin** HK 2005. Can platelet aggregometry be standardized? *Platelets* 16, 151-158.
- Brenner** T, Schmidt K, Delang M, Mehrabi A, Bruckner T, Lichtenstern C, Martin E, Weigand MA, Hofer S 2012. Viscoelastic and aggregometric point-of-care testing in patients with septic shock-cross-links between inflammation and haemostasis. *Acta Anaesthesiol Scand* 56, 1277-1290.
- Brooks** MB 2008. Equine coagulopathies. *Vet Clin North Am Equine Pract* 24, 335-355.
- Brooks** MB, Divers TJ, Watts AE, Ness SL, Frye AH, Stokol T, Fubini SL 2013. Effects of clopidogrel on the platelet activation response in horses. *Am J Vet Res* 74, 1212-1222.
- Brown** GT, McIntyre TM 2011. Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1 $\beta$ -rich microparticles. *J Immunol* 186, 5489-5496.
- Burke** N, Flood K, Murray A, Cotter B, Dempsey M, Fay L, Dicker P, Geary MP, Kenny D, Malone FD. 2013. Platelet reactivity changes significantly throughout all trimesters of pregnancy compared with the nonpregnant state: a prospective study. *BJOG* 120 1599-1604.
- Burkett** BN, Thomason JM, Hurdle HM, Wills RW, Fontenot RL 2016. Effects of Firocoxib, Flunixin Meglumine, and Phenylbutazone on platelet function and Thromboxane synthesis in healthy horses. *Vet Surg* 45, 1087-1094.
- Calatzis** A, Spannagl M, Loreth R 2007. Thrombozytenfunktionsanalyse mit dem Multiplate<sup>®</sup> System: Anwendung und Interpretation. *Dynabite Medical*, München.
- Campello** E, Spiezia L, Zabeo E, Maggiolo S, Vettor R, Simioni P 2015. Hypercoagulability detected by whole blood thromboelastometry (ROTEM<sup>®</sup>) and impedance aggregometry (MULTIPLATE<sup>®</sup>) in obese patients. *Thromb Res* 135, 548-553.
- Cardinal** DC, Flower RJ 1980. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods* 2, 135-158.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Carter** EI, Valli VE, McSherry BJ, Milne FJ, Robinson GA, Lumsden JH 1974. The kinetics of hematopoiesis in the light horse I. The lifespan of peripheral blood cells in the normal horse. *Can J Comp Med* 38, 303-313.
- Cavaillon** JM, Annane D 2006. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res* 12, 151-1570.
- Cay** N, Ipek A, Gumus M, Birkan Z, Ozmen E 2012. Platelet activity indices in patients with deep vein thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost* 18, 206-210.
- Chapman** LM, Aggrey AA, Field DJ, Srivastava K, Ture S, Yui K, Topham DJ, Baldwin WM 3<sup>rd</sup>, Morrell CN 2012. Platelets present antigen in the context of MHC class I. *J Immunol* 189, 916-923.
- Christie** DJ 2008. Platelet function testing by aggregometry. Approved guideline. *Clinical and Laboratory Standards Institute* v. 28 no. 31. CLSI, Wayne, PA.
- Clancy** L, Freedman JE 2014. New paradigms in thrombosis: novel mediators and biomarkers platelet RNA transfer. *J Thromb Thrombolysis* 37, 12-16.
- Clark** P, Mogg TD, Tvedten HW, Korcal D 2002. Artifactual changes in equine blood following storage, detected using the Advia 120 hematology analyzer. *Vet Clin Pathol* 31, 90-94.
- Clark** SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P 2007. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 13, 463-469.
- Clemetson** KJ, Clemetson JM 2013. Platelet receptors. In *Platelets*, AD Michelson, Elsevier, Amsterdam, 169-194.
- Clemmons** RM, Dorsey-Lee MR, Gorman NT, Sturtevant FC 1984. Haemostatic mechanisms of the newborn foal: reduced platelet responsiveness. *Equine Vet J* 16, 353-356.
- Cognasse** F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O 2005. Evidence of toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol Cell Biol* 83, 196-198.
- Cotovio** M, Monreal L, Navarro M, Segura D, Prada J, Alves A 2007. Detection of fibrin deposits in tissues from horses with severe gastrointestinal disorders. *J Vet Intern Med* 21, 308-313.
- Crisman** MV, Scarratt WK, Zimmerman KL 2008. Blood proteins and inflammation in the horse. *Vet Clin North Am Equine Pract* 24, 285-297.
- Dallap Schaer** BL, Wilkins PA, Boston R, Palmer J 2009. Preliminary evaluation of hemostasis in neonatal foals using a viscoelastic coagulation and platelet function analyzer. *J Vet Emerg Crit Care* 19, 81-87.
- Daniel** JL, Dangelmaier C, Jin J, Ashby B, Smith JB, Kunapuli SP 1998. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J Biol Chem* 273, 2024-2029.

- Dasgupta** SK, Abdel-Monem H, Niravath P, Le A, Bellera RV, Langlois K, Nagata S, Rumbaut RE, Thiagarajan P 2009. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood* 113, 1332-1339.
- Dasgupta** SK, Le A, Chavakis T, Rumbaut RE, Thiagarajan P 2012. Developmental endothelial locus-1 (Del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium. *Circulation* 125, 1664-1672.
- Davi** G, Patrono C 2007. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 357, 2482-2494.
- Davies** GR, Mills GM, Lawrence M, Battle C, Morris K, Hawkins K, Williams PR, Davidson S, Thomas D, Evans PA 2014. The role of whole blood impedance aggregometry and its utilisation in the diagnosis and prognosis of patients with systemic inflammatory response syndrome and sepsis in acute critical illness. *PLoS One* 9, e108589.
- de Candia** E, Hall SW, Rutella S, Landolfil R, Andrews RK, de Cristafora R 2001. Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets. *J Biol Chem* 276, 4692-4698.
- de Jong** HK, van der Poll T, Wiersinga WJ 2010. The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *J Innate Immun* 2, 422-430.
- de Stoppelaar** SF, van 't Veer C, van der Poll T 2014. The role of platelets in sepsis. *Thromb Haemost* 112, 666-677.
- Defontis** M, Côté S, Stirn M, Ledieu D 2013. Optimization of Multiplate® whole blood platelet aggregometry in the beagle dog and wistar rat for ex vivo drug toxicity testing. *Exp Toxicol Pathol* 65, 637-644.
- Denk** S, Perl M, Huber-Lang M 2012. Damage-and pathogen-associated molecular patterns and alarmins: keys to sepsis? *Eur Surg Res* 48, 171-179.
- Diehl** P, Olivier C, Halscheid C, Helbing T, Bode C, Moser M 2010. Clopidogrel affects leukocyte dependent platelet aggregation by P2Y12 expressing leukocytes. *Basic Res Cardiol* 105, 379-387.
- Dugan** G, O'Donnell L, Hanbury DB, Cline JM, Caudell DL 2015. Assessment of Multiplate® platelet aggregometry using citrate, heparin or hirudin in rhesus macaques. *Platelets* 26, 730-735.
- Duke** WW 1910. The relation of blood platelets to hemorrhagic disease. *JAMA* 250, 1201-1209.
- Dunkel** B, Rickards KJ, Page CP, Cunningham FM 2007. Platelet activation in ponies with airway inflammation. *Equine Vet J* 39, 557-561.
- Dunkel** B, Rickards KJ, Werling D, Page CP, Cunningham FM 2009. Neutrophil and platelet activation in equine recurrent airway obstruction is associated with increased neutrophil CD13 expression, but not platelet CD41/61 and CD62P or neutrophil-platelet aggregate formation. *Vet Immunol Immunopathol* 131, 25-32.
- Dunkel** B, Rickards KJ, Werling D, Page CP, Cunningham FM 2010. Evaluation of the effect of phosphodiesterase on equine platelet activation and the effect of antigen

## LITERATURVERZEICHNIS

- challenge on platelet phosphodiesterase activity in horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res* 71, 534-540.
- Duvernay M**, Young S, Gailani D, Schoenecker J, Hamm HE 2013. Protease-activated receptor (PAR) 1 and PAR4 differentially regulate factor V expression from human platelets. *Mol Pharmacol* 83, 781-792.
- Dyszkiewicz-Korpanty AM**, Frenkel EP, Sarode R 2005. Approach to the assessment of platelet function: comparison between optical-based platelet-rich plasma and impedance-based whole blood platelet aggregation methods. *Clin Appl Thromb Hemost* 11, 25-35.
- Eisen DP**, Reid D, McBryde ES 2012. Acetyl salicylic acid usage and mortality in critically ill patients with the systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Crit Care Med* 40, 1761-1767.
- Elzey BD**, Schmidt NW, Crist SA, Kresowik TP, Harty JT, Nieswandt B, Ratliff TL 2008. Platelet-derived CD154 enables T-cell priming and protection against *Listeria monocytogenes* challenge. *Blood* 111, 3684-3691.
- Endler G**, Klimesch A, Sunder-Plassmann H, Schillinger M, Exner M, Mannhalter C, Jordanova N, Christ G, Thalhammer R, Huber K, Sunder-Plassmann R 2002. Mean platelet volume is an independent risk factor for myocardial infarction but not for coronary artery disease. *Br J Haematol* 117, 399-404.
- Epstein KL**, Brainard BM, Gomez-Ibanez SE, Lopes MA, Barton MH, Moore JN 2011. Thrombelastography in horses with acute gastrointestinal disease. *J Vet Intern Med* 25, 307-314.
- Epstein KL** 2014. Coagulopathies in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 30, 437-452.
- Esmon CT** 1987. The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science* 235, 1348-1352.
- Esmon CT** 2003. Coagulation and inflammation. *J Endotoxin Res* 9, 192-198.
- Evangelista V**, Manarini S, Dell'Elba G, Martelli N, Napoleone E, Di Santo A, Lorenzet PS 2005. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte adhesion and platelet-dependent leukocyte activation. *Thromb Haemost* 94, 568-577.
- Evangelista V**, Smith SS 2013. 13. Interactions between platelets, leucocytes and endothelium. In: *Platelets*, 3rd edn., Ed. AD Michelson, Elsevier, Amsterdam, 295-312.
- Feige K**, Kästner SB, Dempfle CE, Balestra E 2003. Changes in coagulation and markers of fibrinolysis in horses undergoing colic surgery. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 50, 30-36.
- Fitzgerald GA** 1991. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. *Am J Cardiol* 68, 11B-15B.
- Flaujac C**, Boukour S, Cramer-Bordé E 2010. Platelets and viruses: an ambivalent relationship. *Cell Mol Life Sci* 67, 545-556.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Foreman** PM, Enriquez-Marulanda A, Mooney JH, Schmalz PGR, Griessenauer CJ, Deveikis JP, Harrigan MR 2018. Whole blood aggregometry prior to Pipeline embolization device treatment of intracranial aneurysms: defining an optimal platelet inhibition cutoff value for clopidogrel. *J Neurosurg* 1, 1-8.
- Fox** S, Behan M, Heptinstall S 2004. Inhibition of ADP-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> responses and platelet aggregation by the P2Y<sub>12</sub> receptor antagonists ARC69931MX and clopidogrel is enhanced by prostaglandin E<sub>1</sub>. *Cell Calcium* 35, 39-46.
- Friedrichs** KR, Harr KE, Freeman KP, Szlodovits B, Walton RM, Barnhart KF, Blanco-Chavez J 2012. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol* 41, 441-453.
- Fries** D, Streif W 2015. Point-of-care testing in critically ill patients. *Semin Thromb Hemost* 41, 75-83.
- Fritsma** GA, McGlasson DL 2017. Whole Blood Platelet Aggregometry. *Methods Mol Biol* 1646, 333-347.
- Fröbert** O, Christensen K, Fahlman A, Brunberg S, Josefsson J, Sarndahl E, Swenson J E, Arnemo JM 2010. Platelet function in brown bear (*Ursus arctos*) compared to man. *Thromb J* 8, 1-5.
- Fry** DE 2012. Sepsis, systemic inflammatory response, and multiple organ dysfunction: the mystery continues. *Am Surg* 78, 1-8.
- Gader** AGMA, Ghumlas AKA, Hussain MF, Haidari, AA, White JG 2008. The ultrastructure of camel blood platelets: a comparative study with human, bovine, and equine cells. *Platelets* 19, 51-58.
- Gawaz** M, Dickfeld T, Bogner C, Fateh-Moghadam S, Neumann FJ 1997. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med* 23, 379-385.
- Gawaz** M 1999. 2. Thrombozyten und primäre Hämostase. In: *Das Blutplättchen*. Thieme, Stuttgart, 2-4.
- Gawaz** M, Langer H, May AE 2005. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 115, 3378-3384.
- Geffré** A, Concordet D, Braun JP, Trumel C 2011. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Vet Clin Pathol* 40, 107-112.
- Gentry** PA 2000. Platelet Lipids and Prostaglandins. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, 5<sup>th</sup> edn, Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. Lippincott Williams & Wilk, Philadelphia, 453-458.
- Gibbins** JM, Okuma M, Farndale RW, Barnes M, Watson SP 1997. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor  $\gamma$ -chain. *FEBS Lett* 413, 255-259.
- Goble** JA, Rocafort PT 2017. Point-of-Care Testing. *J Pharm Pract* 30, 229-237.

- Goddard A**, Leisewitz AL, Kristensen AT, Schoeman JP 2015. Platelet indices in dogs with *Babesia rossi* infection. *Vet Clin Pathol* 44, 493-497.
- Gogos CA**, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A 2000. Pro-versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 181, 176-180.
- Görlinger K**, Jambor C, Dirkmann D, Dusse F, Hanke A, Adamzik M, Hartmann M, Philipp S, Weber AA, Rahe-Meyer N 2008. Messung der Thrombozytenfunktion mit Point-of-Care-Methoden. *Herz* 33, 297-305.
- Greisenegger S**, Endler G, Hsieh K, Tentschert S, Mannhalter C, Lalouschek W 2004. Is elevated mean platelet volume associated with a worse outcome in patients with acute ischemic cerebrovascular events? *Stroke* 35, 1688-1691.
- Grondin TM**, Dewitt SF 2010. Normal hematology of the horse and donkey. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, Weiss DJ, Wardrop KJ, Wiley Blackwell Inc, 821-828.
- Gross AK**, Dunn SP, Feola DJ, Martin CA, Charnigo R, Li Z, Abdel-Latif A, Smyth SS 2013. Clopidogrel treatment and the incidence and severity of community acquired pneumonia in a cohort study and meta-analysis of antiplatelet therapy in pneumonia and critical illness. *J Thromb Thrombolysis* 35, 147-154.
- György B**, Szabó TG, Turiák L, Wright M, Herczeg P, Lédeczi Z, Kittel A, Polgár A, Tóth K, Dérfalvi B, Zelenák G, Böröcz I, Carr B, Nagy G, Vékey K, Gay S, Falus A, Buzás EI 2012. Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases. *PLoS One* 7, e49726.
- Haas T**, Fries D, Holz C, Innerhofer P, Streif W, Klingler A, Hanke A, Velik-Salchner C 2008. Less impairment of hemostasis and reduced blood loss in pigs after resuscitation from hemorrhagic shock using the small-volume concept with hypertonic saline/hydroxyethyl starch as compared to administration of 4% gelatin or 6% hydroxyethyl starch solution. *Anesth Analg* 106, 1078-1086.
- Habib A**, Fitzgerald GA, Maclouf J 1999. Phosphorylation of the thromboxane receptor alpha, the predominant isoform expressed in human platelets. *J Biol Chem* 274, 2645-2265.
- Halimeh S**, Angelis Gd, Sander A, Edelbusch C, Rott H, Thedieck S, Mesters R, Schlegel N, Nowak-Göttl U 2010. Multiplate whole blood impedance point of care aggregometry: preliminary reference values in healthy infants, children and adolescents. *Klin Padiatr* 222, 158-163.
- Halle M**, Berg A, Keul J 1999. Übergewicht als Risikofaktor kardiovaskulärer Erkrankungen und die mögliche Bedeutung als Promotor einer gesteigerten Entzündungsreaktion *Dtsch Med Wschr* 124, 905-909.
- Hammwöhner M**, Ittenson A, Dierkes J, Bukowska A, Klein HU, Lendeckel U, Goette A 2007. Platelet expression of CD40/CD40 ligand and its relation to inflammatory markers and adhesion molecules in patients with atrial fibrillation. *Exp Biol Med (Maywood)* 232, 581-589.

- Harrison P** 2005. Platelet function analysis. *Blood Rev* 19, 111-123.
- Harrison P** 2009. Assessment of platelet function in the laboratory. *Hamostaseologie* 29, 25-31.
- Hayes RA, Foley S, Shekar K, Diab S, Dunster KR, McDonald C, Fraser JF** 2015. Ovine platelet function is unaffected by extracorporeal membrane oxygenation within the first 24 h. *Blood Coagul Fibrinolysis* 26, 816-822.
- Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, Simoons ML** 2003. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 348, 1104-1111.
- Held L** 2018. Ermittlung von Referenzintervallen der Thrombozytenfunktion mittels Multiplate® Analyser beim klinisch unauffälligen Warmblutpferd. Vetmed Diss JLU Gießen, VVB Lauferweiler Verlag.
- Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA** 1998. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391,591-594.
- Hermosilla C, Caro TM, Silva LM, Ruiz A, Taubert A** 2014. The intriguing host innate immune response: novel anti-parasitic defence by neutrophil extracellular traps. *Parasitology* 141, 1489-1498.
- Ho KK, Abrams-Ogg AC, Wood RD, O'Sullivan ML, Kirby GM, Blois SL** 2015. Assessment of platelet function in healthy sedated cats using three whole blood platelet function tests. *J Vet Diagn Invest* 27, 352-360.
- Hobbylexikon Pferde**, Stichwort Kleinpferd, 1976, Luzern, Frankfurt am Main
- Hopster-Iversen C** 2016. Chronische Abmagerung beim Pferd-eine diagnostische Aufarbeitung. *PferdeSpiegel* 19, 119-127.
- Horn PS, Pesce AJ, Copeland BE** 1998. A robust approach to reference interval estimation and evaluation. *Clin Chem* 44, 622-631.
- Horowitz GL** 2008. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory. Approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute EP28-A3c, vol. 28, no. 30. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.*
- Italiano JE Jr., Mairuhu AT, Flaumenhaf, R** 2010. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Curr Opin Hematol* 17, 578-584.
- Iyú D, Jüttner M, Glenn JR, White AE, Johnson AJ, Fox SC, Heptinstall S** 2011. PGE1 and PGE2 modify platelet function through different prostanoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 94, 9-16.
- Jackson SP, Mistry N, Yuan Y** 2000. Platelets and the injured vessel wall-"rolling into action": focus on glycoprotein Ib/V/IX and the platelet cytoskeleton. *Trends Cardiovasc Med* 10, 192-197.
- Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S** 2003. Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost* 1, 1602-1612.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Jarvis** GE, Evans RJ 1994. Endotoxin-induced platelet aggregation in heparinised equine whole blood in vitro. *Res Vet Sci* 57, 317-324.
- Jenne** CN, Wong CH, Zemp FJ, McDonald B, Rahman MM, Forsyth PA, McFadden G, Kubes P 2013. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe* 13, 169-180.
- Jin** J, Daniel JK, Kunapoli SP 1998. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J Biol Chem* 273, 2030-2034.
- Johnson** A, Dovlatova N, Heptinstall S 2008. Multiple electrode aggregometry and P2Y12 antagonists. *Thromb Haemost* 99, 1127-1129.
- Johnstone** IB 1983. Comparative effects of phenylbutazone, naproxen and flunixin meglumine on equine platelet aggregation and platelet factor 3 availability in vitro. *Can J Comp Med* 47, 172-179.
- Kahn** ML, Nakashini-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR 1999. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest* 103, 879-887.
- Kakouros** N, Kickler TS, Laws KM, Rade JJ 2013. Hematocrit alters VerifyNow P2Y12 assay results independently of intrinsic platelet reactivity and clopidogrel responsiveness. *J Thromb Haemost* 11, 1814-1822.
- Kalbantner** K, Baumgarten A, Mischke R 2010. Measurement of platelet function in dogs using a novel impedance aggregometer. *Vet J* 185, 144-151.
- Kao** KJ, Cook DJ, Scornik JC 1986. Quantitative analysis of platelet surface HLA by W6/32 anti-HLA monoclonal antibody. *Blood* 68, 627-632.
- Kasper** B, Brandt E, Brandau S, Petersen F 2007. Platelet factor 4 (CXC chemokine ligand 4) differentially regulates respiratory burst, survival, and cytokine expression of human monocytes by using distinct signaling pathways. *J Immunol* 179, 2584-2591.
- Kauffmanstein** G, Bergmeier W, Eckly A, Ohlmann P, Léon C, Cazenave JP, Nieswandt B, Gachet C 2001. The P2Y12 receptor induces platelet aggregation through weak activation of the  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin-a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS Lett* 505, 281-290.
- Kawai** T, Akira S 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373-384.
- Kawasaki** T, Kawai T 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 5, 461.
- Kerrigan** SW, Cox D 2010. Platelet-bacterial interactions. *Cell Mol Life Sci* 67, 513-523.
- Khan** SY, Kelher MR, Heal JM, Blumberg N, Boshkov LK, Phipps R, Gettings KF, McLaughlin NJ, Silliman CC 2006. Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood* 108, 2455-2462.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Kim YG**, Suh J-W, Park JJ, Oh I-Y, Yoon C-H, Cho Y-S, Youn T-J, Chae I-H, Choi D-J 2014. Different influences of hematocrit on the results of two Point-Of-Care platelet function tests, the VerifyNow assay and multiple electrode platelet aggregometry. *PLoS ONE* 9, 1-16.
- Kirkeby A**, Torup L, Bochsén L, Kjalke M, Abel K, Theilgaard-Monch K, Johansson PI, Bjorn SE, Gerwien J, Leist M 2008. High-dose erythropoietin alters platelet reactivity and bleeding time in rodents in contrast to the neuroprotective variant carbamyl-erythropoietin (CEPO). *Thromb Haemost* 99, 720-728.
- Kissel K**, Berber S, Nockher A, Santoso S, Bein G, Hackstein H. 2006. Human platelets target dendritic cell differentiation and production of proinflammatory cytokines. *Transfusion* 46, 818-827.
- Klages B**, Brandt U, Simon MI, Schultz G, Offermanns S 1999. Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol* 144, 745-754.
- Koda M**, Banno Y, Naganawa T 2005. Effect of neutrophil adhesion on the size of aggregates formed by agonist-activated platelets. *Platelets* 16, 482-491.
- Köller G**, Gieseler T, Schusser GF 2014. Hämatologische und blutchemische Referenzbereiche bei Pferden unterschiedlicher Rasse und Altersgruppen basierend auf neuesten labordiagnostischen Methoden. *Pferdeheilkunde* 30, 381-393.
- Kopp KJ**, Moore JN, Byars TD, Brooks P 1985. Template bleeding time and thromboxane generation in the horse: effects of three non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Equine Vet J* 17, 322-324.
- Kornreich B**, Enyeart M, Jesty SA, Nydam DV, Divers T 2010. The effects of pentoxifylline on equine platelet aggregation. *J Vet Intern Med* 24, 1196-1202.
- Kraemer BF**, Campbell RA, Schwertz H, Franks ZG, Vieira de Abreu A, Grundler K, Kile BT, Dhakal BK, Rondina MT, Kahr WH, Mulvey MA, Blaylock RC, Zimmerman GA, Weyrich AS 2012. Bacteria differentially induce degradation of Bcl-xL, a survival protein, by human platelets. *Blood* 120, 5014-5020.
- Krocze RA**, Graf D, Brugnani D, Giliani S, Korthüer U, Ugazio A, Senger G, Mages HW, Villa A, Notarangelo LD 1994. Defective expression of CD40 ligand on T cells causes "X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (HIGM1)". *Immunol Rev* 138, 39-59.
- Kulkarni S**, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P, Heel KA, Street A, Harper IS, Lanza F, Jackson SP 2000. A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest* 105, 783-791.
- Laffont B**, Corduan A, Plé H, Duchez AC, Cloutier N, Boilard E, Provost P 2013. Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2•microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood* 122, 253-261.
- Lambert JL**, Fernandez NJ, Roy MF 2016. Association of presence of band cells and toxic neutrophils with systemic inflammatory response syndrome and outcome in horses with acute disease. *J Vet Intern Med* 30, 1284-1292.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Landry P**, Plante I, Ouellet DL, Perron MP, Rousseau G, Provost P 2009. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat Struct Mol Biol* 16, 961-966.
- Lassen ED**, Swardson CJ 1995. Hematology and hemostasis in the horse: normal functions and common abnormalities. *Vet Clin North Am Equine Pract* 11, 351-389.
- Lay AJ**, Donahue D, Tsai MJ, Castellino FJ 2007. Acute inflammation is exacerbated in mice genetically predisposed to a severe protein C deficiency. *Blood* 109, 1984-1991.
- Levi M**, ten Cate H, van der Poll T, van Deventer SJ 1993. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA* 270, 975-979.
- Levi M**, ten Cate H 1999. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 341, 586-592.
- Levi M**, Opal SM 2006. Coagulation abnormalities in critically ill patients. *Crit Care* 10, 222.
- Levi M**, van der Poll T, ten Cate H 2006. Tissue factor in infection and severe inflammation. *Semin Thromb Hemost* 32, 33-39.
- Levi M** 2007. Disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med* 35, 2191-2195.
- Levi M**, van der Poll T 2010. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med* 38, 26-34.
- Levi M**, van der Poll T, Schultz M 2012. Systemic versus localized coagulation activation contributing to organ failure in critically ill patients. *Semin Immunopathol* 34, 167-179.
- Levi M**, van der Poll T. 2013. Disseminated intravascular coagulation: a review for the internist. *Intern Emerg Med* 8, 23-32.
- Levy MM**, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2001. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31, 1250-1256.
- Lewis DH**, Chan DL, Pinheiro D, Armitage-Chan E, Garden OA 2012. The immunopathology of sepsis: pathogen recognition, systemic inflammation, the compensatory anti-inflammatory response, and regulatory T cells. *J Vet Intern Med* 26, 457-482.
- Lievens D**, von Hundelshausen P 2011. Platelets in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 106, 827-838.
- Lin Q**, Li M, Fang D, Fang J, Su SB 2011. The essential roles of toll-like receptor signaling pathways in sterile inflammatory diseases. *Int Immunopharmacol* 11, 1422-1432.
- Lindemann S**, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS 2001. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol* 154, 485-490.
- Lippi G**, Pavesi F, Pipitone S 2015. Evaluation of mean platelet volume with four hematological analyzers: harmonization is still an unresolved issue. *Blood Coagul Fibrinolysis* 26, 235-237.

- Liverani E**, Kilpatrick LE, Tsygankov AY, Kunapuli SP 2014. The role of P2Y<sub>12</sub> receptor and activated platelets during inflammation. *Curr Drug Targets* 15, 720-728.
- Livesey L**, Christopherson P, Hammond A, Perkins J, Toivio-Kinnucan M, Insalaco T, Boudreaux MK 2005. Platelet dysfunction (Glanzmann's thrombasthenia) in horses. *J Vet Intern Med* 19, 917-919.
- Lohmann KL**, Barton MH 2014. Systemic Inflammatory Response Syndrome. In: Equine infectious diseases, 2<sup>nd</sup> and, ED. Sellon DC, Long MT, Elsevier Amsterdam, 119-131.
- Lumsden JH**, Rowe R, Mullen K 1980. Hematology and biochemistry reference values for the light horse. *Can J Comp Med* 44, 32-42.
- Lüthje J** 1989. Extracellular adenine compounds, red blood cells and haemostasis: facts and hypotheses. *Blood* 59, 367-374.
- Ma L**, Dorling A 2012. The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation. *Semin Immunopathol* 34, 63-72.
- Ma YQ**, Plow EF, Geng JG 2004. p selectin binding to p-selectin glycoprotein ligand-1 induces an intermediate state of alphaMbeta2 activation and acts cooperatively with extracellular stimuli to support maximal adhesion of human neutrophils. *Blood* 104, 2549-2556.
- Macey MG**, Carty E, Webb L, Chapman ES, Zelmanovic D, Okrongly D, Rampton DS, Newland AC 1999. Use of mean platelet component to measure platelet activation on the ADVIA 120 haematology system. *Cytometry* 38, 250-255.
- Mackie IJ**, Jones R, Machin SJ 1984. Platelet impedance aggregation in whole blood and its inhibition by antiplatelet drugs. *J Clin Pathol* 37, 874-878.
- Macieira S**, Rivard GE, Champagne J, Lavoie JP, Bédard C 2007. Glanzmann thrombasthenia in an Oldenbourg filly. *Vet Clin Pathol* 36, 204-208.
- Mangalpally KKR**, Siqueiros-Garcia A, Vaduganathan M, Dong J-F, Kleiman NS, Guthikonda S 2010. Platelet activation patterns in platelet size subpopulations: differential responses to aspirin in vitro. *J Thromb Thrombolysis* 30, 251-262.
- Mangold A**, Alias S, Scherz T, Hofbauer T, Jakowitsch J, Panzenböck A, Simon D, Laimer D, Bangert C, Kammerlander A, Mascherbauer J, Winter MP, Distelmaier K, Adlbrecht C, Preissner KT, Lang IM 2015. Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size. *Circ Res* 116, 1182-1192.
- Mannu GS**, Macartney A, Lambert JR, Bettencourt-Silva JH, Lawn M, Lyall H, Metcalf AK, Potter JF, Wood J, Clark A, Baglin T, Myint PK, Bowles KM 2015. The clinical utility of Multiplate analyser measurement in platelet function testing following stroke and transient ischaemic attack. *Eur J Haematol* 94, 138-144.
- Marschner CB**, Kristensen AT, Spodsberg EH, Wiinberg B 2012. Evaluation of platelet aggregometry in dogs using the Multiplate platelet analyzer: impact of anticoagulant choice and assay duration. *J Vet Emerg Crit Care* 22, 107-115.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Mateos-Trigos G**, Evans RJ, Heath MF 2002. Effects of P2Y1 and P2Y12 receptor antagonists on ADP-induced shape change of equine platelets: comparison with human platelets. *Platelets* 13, 285-292.
- Maugeri N**, Campana L, Gavina M, Covino C, De Metrio M, Panciroli C, Maiuri L, Maseri A, D'Angelo A, Bianchi ME, Rovere-Querini P, Manfredi AA 2014. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J Thromb Haemost* 12, 2074-2088.
- Mause SF**, von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR, Weber C 2005 Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1512-1518.
- McDonald B**, Kubes P 2012. Neutrophils and intravascular immunity in the liver during infection and sterile inflammation. *Toxicol Pathol* 40, 157-165.
- McDonald B**, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P 2012. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe* 12, 324-333.
- McFadyen JD**, Kaplan ZS 2015. Platelets are not just for clots. *Transfus Med Rev* 29, 110-119.
- Meyers KM**, Lindner C, Katz J, Grant B 1979. Phenylbutazone inhibition of equine platelet function. *Am J Vet Res* 40, 265-270.
- Meyers KM**, Holmsen H, Seachord CL 1982. Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am J Physiol* 243, 454-461.
- Michelson AD**, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL 3<sup>rd</sup>, Furman MI 2000. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods* 21, 259-270.
- Miller CH**, Rice AS, Garrett K, Stein SF 2014. Gender, race and diet affect platelet function tests in normal subjects contributing to a high rate of abnormal results. *Br J Haematol* 165, 842-853.
- Moenen FCJ**, Vries MJA, Nelemans PJ, van Rooy KJM, Vranken JRRA, Verhezen PWM, Wetzels RJH, Ten Cate H, Schouten HC, Beckers EAM, Henskens YMC 2019. Screening for platelet function disorders with Multiplate and platelet function analyzer. *Platelets* 30, 81-87.
- Mohr J**, Ruchholtz S, Hildebrand F, Flohé S, Frink M, Witte I, Weuster M, Fröhlich M, van Griensven M, Keibl C, Mommsen P 2013. Induced hypothermia does not impair coagulation system in a swine multiple trauma model. *J Trauma Acute Care Surg* 74, 1014-1020.
- Molino M**, Bainton DF, Hoxie JA, Coughlin SR, Brass LF 1997. Thrombin receptors on human platelets. Initial localization and subsequent redistribution during platelet activation. *J Biol Chem* 272, 6011-6017.
- Monreal L**, Anglés A, Espada Y, Monasterio J, Monreal M 2000. Hypercoagulation and hypofibrinolysis in horses with colic and DIC. *Equine Vet J Suppl.* 32, 19-25.

**Moore** JN, Vandenplas ML 2014. Is it the systemic inflammatory response syndrome or endotoxemia in horses with colic? *Vet Clin North Am Equine Pract* 30, 337-351.

**Moritz** A, Walcheck BK, Weiss DJ 2005. Evaluation of flow cytometric and automated methods for detection of activated platelets in dogs with inflammatory disease. *Am J Vet Res* 66, 325-329.

**Moses** VS, Bertone AL 2002. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Vet Clin North Am Equine Pract* 18, 21-37.

**Mueller** T, Dieplinger B, Poelz W, Calatzis A, Haltmayer M 2007. Utility of whole blood impedance aggregometry for the assessment of clopidogrel action using the novel Multiplate® analyzer-comparison with two flow cytometric methods. *Thromb Res* 121, 249-258.

**Muller** MR, Salat A, Pulaki S, Stangl P, Ergun E, Schreiner W, Losert U, Wolner E 1995. Influence of hematocrit and platelet count on impedance and reactivity of whole blood for electrical aggregometry. *J Pharmacol Toxicol Methods* 34, 17-22.

**Nakahata** N 2008. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther* 118, 18-35.

**Neubauer** H, Engelhardt A, Krüger JC, Lask S, Börgel J, Mügge A, Endres HG 2010. Pantoprazole does not influence the antiplatelet effect of clopidogrel-a whole blood aggregometry study after coronary stenting. *J Cardiovasc Pharmacol* 56, 91-97.

**Newman** KD, Williams LT, Bishopric NH, Lefkowitz RJ 1978. Identification of alpha-adrenergic receptors in human platelets by 3H dihydroergocryptine binding. *J Clin Invest* 61, 395-402.

**Nielsen** LA, Zois NE, Pedersen HD, Olsen LH, Tarnow I 2007. Platelet function in dogs: breed differences and effect of acetylsalicylic acid administration. *Vet Clin Pathol* 36, 267-273.

**Nieswandt** B, Watson SP 2003. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 102, 449-461.

**Norris** JW, Pratt SM, Auh JH, Wilson SJ, Clutter D, Magdesian KG, Ferraro GL, Tablin F 2006. Investigation of a novel, heritable bleeding diathesis of Thoroughbred horses and development of a screening assay. *J Vet Intern Med* 20, 1450-1456.

**Offermanns** S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G 1994. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 504-508.

**Paul** BZ, Jin J, Kunapuli SP 1999. Molecular mechanism of thromboxane A2-induced platelet aggregation. Essential role for p2tac and alpha2a receptors. *J Biol Chem* 274, 29108-29114.

**Pelagalli** A, Lombardi P, d'Angelo D, Della Morte R, Avallone L, Staiano N 2002. Species variability in platelet aggregation response to different agonists. *J Comp Pathol* 127, 126-132.

- Petricevic M**, Konosic S, Biocina B, Dirkmann D, White A, Mihaljevic MZ, Ivancan V, Konosic L, Svetina L, Görlinger K 2016. Bleeding risk assessment in patients undergoing elective cardiac surgery using ROTEM(®) platelet and Multiplate(®) impedance aggregometry. *Anaesthesia* 71, 636-647.
- Ponschab M**, van Griensven M, Heitmeier S, Laux V, Schlimp CJ, Calatzis A, Bahrami S, Redl H, Schöchl H 2016. Platelet function in baboons and humans-A comparative study of whole blood using impedance platelet aggregometry (Multiplate®). *Thromb Res* 147, 115-121.
- Pratico D**, Iuliano L, Alessandri C, Camastra C, Violi F 1993. Polymorphonuclear leukocyte-derived O<sub>2</sub>-reactive species activate primed platelets in human whole blood. *Am J Physiol* 264, 1582-1587.
- Pugh N**, Simpson AM, Smethurst PA, de Groot PG, Raynal N, Farndale RW 2010. Synergism between platelet collagen receptors defined using receptor-specific collagen-mimetic peptide substrata in flowing blood. *Blood* 115, 5069-5079.
- Quinn M** 2005. Platelet Physiology. In: *Platelet Function: Assessment, Diagnosis and Treatment*, Quinn M, Fitzgerald D, Human Press Inc., New Jersey, 3-14.
- Reid VL**, Webster NR 2012. Role of microparticles in sepsis. *Br J Anaesth* 109, 503-513.
- Reilly M**, Fitzgerald GA 1993. Cellular activation by thromboxane A<sub>2</sub> and other eicosanoids. *European Heart Journal* 14, 88-93.
- Reinhart K**, Brunkhorst FM, Bone H-G, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Gründling M, John S, Kern W, Kreymann G, Krüger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stüber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T 2010. Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. Erste Revision der S2k-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI). *Anaesthesist* 59, 347-370.
- Rendu F**, Brohard-Bohn B 2001. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 12, 261-273.
- Renesto P**, Chignard M 1993. Enhancement of cathepsin G-induced platelet activation by leukocyte elastase: consequence for the neutrophil-mediated platelet activation. *Blood* 82, 139-144.
- Risitano A**, Beaulieu LM, Vitseva O, Freedman JE 2012. Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer. *Blood* 119, 6288-6295.
- Rittirsch D**, Flierl MA, Ward PA 2008. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 8, 776-787.
- Rodriguez-Linares B**, Cano E 1995. In-vitro platelet responses to arachidonic acid in the rat. *J Pharm Pharmacol* 47, 1015-1020.

- Roscher** KA, Failing K, Moritz A 2015. Inhibition of platelet function with clopidogrel, as measured with a novel whole blood impedance aggregometer in horses. *Vet J* 203, 332-336.
- Roscher** KA, Failing K, Schenk I, Moritz A 2017. Suspected aspirin resistance in individual healthy adult warmblood horses. *J Vet Pharmacol Ther*, 1-7.
- Roscher**, KA 2018. Thrombozyten der Equiden – ein unterschätzter Biomarker? DVG Service GmbH Gießen, Habilitationsschrift JLU Gießen.
- Rowley** JW, Oler AJ, Tolley ND, Hunter BN, Low EN, Nix DA, Yost CC, Zimmerman GA, Weyrich AS 2011. Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes. *Blood* 118, 101-111.
- Rowley** JW, Schwertz H, Weyrich AS 2012. Platelet mRNA: the meaning behind the message. *Curr Opin Hematol* 19, 385-393.
- Roy** MF, Kwong GP, Lambert J, Massie S, Lockhart S 2017. Prognostic value and development of a scoring system in horses with systemic inflammatory response syndrome. *J Vet Intern Med* 3, 582-592.
- Rubak** P, Villadsen K, Hvas A-M 2012. Reference intervals for platelet aggregation assessed by multiple electrode platelet aggregometry. *Thromb Res* 130, 420-423.
- Russell** KE, Perkins PC, Hoffman MR, Miller RT, Walker KM, Fuller FJ, Sellon DC 1999. Platelets from thrombocytopenic ponies acutely infected with equine infectious anemia virus are activated in vivo and hypofunctional. *Virology* 259, 7-19.
- Sakariassen** KS, Holme PA, Orvim U, Barstad RM, Solum NO, Brosstad FR 1998. Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation in native human blood. *Thromb Res* 92, 6 Suppl 2, 33-41.
- Savage** B, Cattaneo M, Ruggeri ZM 2001. Mechanisms of platelet aggregation. *Curr Opin Hematol* 8, 270-276.
- Schmidt** DE, Bruzelius M, Majeed A, Odeberg J, Holmström M, Ågren A 2017. Whole blood ristocetin-activated platelet impedance aggregometry (Multiplate) for the rapid detection of Von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 117, 1528-1533.
- Schnabel** CL, Steinig P, Schuberth HJ, Koy M, Wagner B, Wittig B, Juhls C, Willenbrock S, Murua Escobar H, Jaehnig P, Feige K, Cavalleri JM 2015. Influences of age and sex on leukocytes of healthy horses and their ex vivo cytokine release. *Vet Immunol Immunopathol* 165, 64-74.
- Schwendenwein** I 2013. Allgemeine Labortechniken. In: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, 7. Auflage, Herausgeber A. Moritz, Schattauer Verlag, Stuttgart, 21-33.
- Segura** D, Monreal L, Espada Y, Pastor J, Mayós I, Homedes J 2005. Assessment of a platelet function analyser in horses: reference range and influence of a platelet aggregation inhibitor. *Vet J* 170, 108-112.
- Segura** D, Monreal L, Pérez-Pujol S, Pino M, Ordinas A, Brugués R, White JG, Escolar G 2006. Assessment of platelet function in horses: ultrastructure, flow cytometry, and perfusion techniques. *J Vet Intern Med* 20, 581-588.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Segura D**, Monreal L, Armengou L, Tarancón I, Brugués R, Escolar G 2007. Mean platelet component as an indicator of platelet activation in foals and adult horses. *J Vet Intern Med* 21, 1076-1082.
- Segura D**, Monreal L, Pérez-Pujol S, Alonso A, Díaz-Ricart M, Brugués R, Ordinas A, Escolar G 2007b. Effects of etamsylate on equine platelets: in vitro and in vivo studies. *Vet J* 174, 326-329.
- Semple JW**, Italiano JE Jr., Freedman J 2011. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* 11, 264-274.
- Seyfert UT**, Haubelt H, Vogt A, Hellstern P 2007. Variables influencing Multiplate™ whole blood impedance platelet aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy individuals. *Platelets* 18, 199-206.
- Shah U**, Ma AD 2007. Tests of platelet function. *Curr Opin Hematol* 14, 432-437.
- Shapiro MJ**, Weiss EJ, Faruqi TR, Coughlin SR 2000. Protease-activated receptors 1 and 4 are shut off with distinct kinetics after activation by thrombin. *The J Biol Chem* 275, 25216-25221.
- Simon LM**, Edelstein LC, Nagalla S, Woodley AB, Chen ES, Kong X, Ma L, Fortina P, Kunapuli S, Holinstat M, McKenzie SE, Dong JF, Shaw CA, Bray PF 2014. Human platelet microRNA-mRNA networks associated with age and gender revealed by integrated plateletomics. *Blood* 123, 37-45.
- Singer M**, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 801-810.
- Smyth SS**, McEver RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, French PA, Dauerman HL, Becker RC 2009. Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost* 7, 1759-1766.
- Soslau G**, Class R, Morgan DA, Foster C, Lord ST, Marchese P, Z. M. Ruggeri ZM 2001. Unique pathway of thrombin-induced platelet aggregation mediated by glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 276, 21173-21183.
- Suagee JK**, Corl BA, Crisman MV, Pleasant RS, Thatcher CD, Geor RJ 2013. Relationships between body condition score and plasma inflammatory cytokines, insulin, and lipids in a mixed population of light-breed horses. *J Vet Intern Med* 27, 157-163.
- Sun B**, Li J, Okahara K, Kambayashi J 1998. P2X1 purinoceptor in human platelets. Molecular cloning and functional characterization after heterologous expression. *J Biol Chem* 273, 11544-11547.
- Teuber M**, Mischke R 2016. Influence of a low dosage of clopidogrel on platelet function in cats as measured by the platelet function analyser PFA-100 and the multiplate analyser. *Res Vet Sci* 109, 149-156.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Theuerkauf K, Moritz A, Fey K, Roscher K** 2017. Etablierung einer durchflusszytometrischen Methode zur Messung aktivierter Thrombozyten und von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten beim Pferd. 25. Jahrestagung der FG "Innere Medizin und klinische Labordiagnostik" der DVG (InnLab); 03./04.02.17; Göttingen
- Theuerkauf K, Obach-Schröck C, Staszky C, Moritz A, Roscher KA** 2018. Activated platelets and platelet-leukocyte-aggregates in equine systemic inflammatory response syndrome. BEVA Congress 2018; 13.-15.09.18; Birmingham/GB
- Tóth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W** 2006. Multiple electrode aggregometry. A new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 96, 781-788.
- Tsai MJ, Ou SM, Shih CJ, Chao PW, Wang LF, Shih YN, Li SY, Kuo SC, Hsu YT, Chen YT** 2015. Association of prior antiplatelet agents with mortality in sepsis patients: a nationwide population-based cohort study. *Intensive Care Med* 41, 806-813.
- Umazume T, Yamada T, Morikawa M, Ishikawa S, Furuta I, Koyama T, Matsuno K, Minakami H.** 2015. Platelet aggregation in citrated whole blood of the first trimester of pregnancy. *Clin Chim Acta* 448, 60-64.
- Vajen T, Mause SF, Koenen RR** 2015. Microvesicles from platelets: novel drivers of vascular inflammation. *Thromb Haemost* 114, 228-236.
- Valles J, Santos MT, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, Ullman HL, Aznar J** 1993. Downregulation of human platelet reactivity by neutrophils. Participation of lipoxigenase derivatives and adhesive proteins. *J Clin Invest* 92, 1357-1365.
- Vieira de Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA** 2012. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol* 34, 5-30.
- Wallén N, Ladjevardi M, Albert J, Bröijersén A** 1997. Influence of different anticoagulants on platelet aggregation in whole blood; a comparison between citrate, low molecular mass heparin and hirudin. *Thromb Res* 87, 151-157.
- Watson SP, Auger JM, McCarty OJ, Pearce AC** 2005. GPVI and integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  signaling in platelets. *Thromb Haemost* 3, 1752-1762.
- Weiss DJ, Trent AM, Johnston G** 1995. Prothrombotic events in the prodromal stages of acute laminitis in horses. *Am J Vet Res* 56, 986-991.
- Weiss DJ, Evanson OA** 1997. Detection of activated platelets and platelet-leukocyte aggregates in horses. *Am J Vet Res* 58, 823-827.
- Wenzel UO, Fouqueray B, Grandaliano G, Kim YS, Karamitsos C, Valente AJ, Abboud HE** 1995. Thrombin regulates expression of monocyte chemoattractant protein-1 in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 77, 503-509.
- Werners AH, Bryant CE** 2012. Pattern recognition receptors in equine endotoxaemia and sepsis. *Equine Vet J* 44, 490-498.
- White JG** 2013. Platelet Structure. In: *Platelets*, 3rd edn., Ed. AD Michelson, Elsevier, Amsterdam, 117-144.

## LITERATURVERZEICHNIS

**Wilkins PA** 2017. What's in a word? The need for **SIRS** and sepsis definitions in **equine** medicine and surgery, *Equine Vet J*, 50, 7-9.

**Wong CH**, Jenne CN, Petri B, Chrobok NL, Kubes P 2013. Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nat Immunol* 14, 785-792.

**Wong DM**, Wilkins PA 2015. Defining the systemic inflammatory response syndrome in equine neonates. *Vet Clin North Am Equine Pract* 31, 463-481.

**Würtz M**, Hvas AM, Kristensen SD, Grove EL 2012. Platelet aggregation is dependent on platelet count in patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 129, 56-61.

**Yaguchi A**, Lobo FL, Vincent JL, Pradier O 2004. Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost* 2, 2096-2102.

**Yeaman MR** 2010. Platelets in defense against bacterial pathogens. *Cell Mol Life Sci* 67, 525-544.

**Youssefian T**, Drouin A, Massé JM, Guichard J, Cramer EM 2002. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood* 99, 4021-4029.

**Zufferey A**, Schvartz D, Nolli S, Reny JL, Sanchez JC, Fontana P 2014. Characterization of the platelet granule proteome: evidence of the presence of MHC1 in alpha-granules. *J Proteomics* 101, 130-140.

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACCP	American College of Chest Physicians
ADP	Adenosindiphosphat
aPTT	aktivierte Partielle Thromboplastinzeit
ASS	Acetylsalicylsäure
ASVCP	American Society of Veterinary Clinical Pathology
ATP	Adenosintriphosphat
ATS	American Thoracic Society
AU	Aggregation Units
AUC	Area Under the Curve
BCS	Body Condition Score
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
COX-1	Cyclooxygenase-1
DAG	1,2-Diacylglycerol
DAMP's	Damage Associated Molecular Patterns
DIG	disseminierte intravasale Gerinnungsstörung
DIVI	Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSG	Deutsche Sepsis Gesellschaft
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESICM	European Society of Intensive Care Medicine
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes-Protein
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Natriumhydrogenkarbonat
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule-1
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IP3	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
LPS	Lipopolysaccharide
LTE	Lichttransmissionsaggregometrie
LUC	Lage Unstained Cells
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
Max	Maximum
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min	Minimum
MPC	Mean Platelet Component
MPV	Mean Platelet Volume
mRNA	messenger RNA
NETs	neutrophile extrazelluläre Traps
NSAID's	Nicht steroidale Antiphlogistika
OR	Odds ratio
PaCO <sub>2</sub>	arterieller Kohlendioxidpartialdruck

PAF .....	Plättchen Aktivierender Faktor
PAMP's .....	Pathogen Associated Molecular Patterns
PF4.....	Platelet Factor 4
PGE1 .....	Prostaglandin E <sub>1</sub>
PGH <sub>2</sub> .....	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PIP2 .....	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC .....	Proteinkinase C
PLA <sub>2</sub> .....	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC.....	Phospholipase C
POC.....	Point Of Care
PRR's .....	Pattern Recognition Receptors
PSGL-1 .....	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
PT .....	Prothrombinzeit
r .....	Korrelationskoeffizient
RANTES.....	Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted
RAO .....	Recurrent Airway Obstruction
RNA .....	Ribonukleinsäure
SCCM .....	Society of Critical Care Medicine
SIRS.....	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SIS.....	Surgical Infection Society
SOFA .....	Sepsis-related Organ Failure Assessment
TLR's .....	Toll-Like-Rezeptor
TNF- $\alpha$ .....	tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TRALI .....	Transfusion Related Acute Lung Injury
TXA <sub>2</sub> .....	Thromboxan A <sub>2</sub> , Thromboxan A <sub>2</sub>
U .....	Unit
vWF .....	von-Willebrand-Faktor

## 9 ANHANG

### 9.1 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Übersicht der eingesetzten Aktivatoren .....	48
<b>Tab. 2:</b> Leukozyten, Globuline und Fibrinogen der 61 gesunden Kleinpferde .....	53
<b>Tab. 3:</b> Multiplate® Testergebnisse (AUC in U; n=61) .....	54
<b>Tab. 4:</b> Referenzintervalle für Multiplate® Analyzer Tests bei klinisch unauffälligen Kleinpferden und Warmblütern (AUC in U) .....	54
<b>Tab. 5:</b> Thrombozytenfunktionstests am Multiplate® Analyzer bei gesunden Kleinpferden und gesunden Warmblütern (AUC in U) .....	59
<b>Tab. 6:</b> Übersicht der SIRS-Patienten .....	67
<b>Tab. 7:</b> Ausgewählte Parameter der klinischen Untersuchung .....	68
<b>Tab. 8:</b> Individuelle Ergebnisse labormedizinischer Parameter der 20 SIRS-Patienten ..	70
<b>Tab. 9:</b> Thrombozytenfunktion der SIRS-Patienten nach Rasse (AUC in U) .....	71
<b>Tab. 10:</b> Thrombozytäre Funktion bei den 20 SIRS-Patienten .....	73
<b>Tab. 11:</b> Anzahl vom jeweiligen Referenzintervall abweichender thrombozytärer Funktionstestsergebnisse .....	74
<b>Tab. 12:</b> Einfluss der Faktoren Rasse (Warmblut vs. Kleinpferd) und Gruppe (Gesund vs. SIRS) auf die Thrombozytenfunktion (zweifaktorielle Varianzanalyse) .....	79
<b>Tab. 13:</b> Übersicht signifikanter Korrelationen (r) der SIRS-Patienten (n = 20) .....	86
<b>Tab. 14:</b> SIRS-Kriterien und Grenzwerte equiner Publikationen im Vergleich .....	94
<b>Tab. 15:</b> Ausgewählte Publikationen zu Referenzintervallen der Leukozytenzahl bei gesunden adulten Pferden .....	102

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Optoelektronisches Messprinzip des ADVIA2120® .....	37
<b>Abb. 2:</b> RBC Scatter und PLT Scatter eines Probanden .....	38
<b>Abb. 3:</b> Multiplate® Analyser .....	41
<b>Abb. 4:</b> Messzellen des Multiplate® Analyzers .....	42
<b>Abb. 5:</b> Schematische Darstellung des Messprinzips des Multiplate® Analyzers .....	43
<b>Abb. 6:</b> Darstellung der Ergebnisse am Multiplate® Analyser. ....	44
<b>Abb. 7:</b> Beispielhafte Darstellung des Ergebnisses am Multiplate® Analyser für den COLtest .....	45
<b>Abb. 8:</b> Schematische Darstellung der Thrombozytenaktivierung durch die eingesetzten Aktivatoren.....	46
<b>Abb. 9:</b> COLtest Ergebnisse (AUC in U) am Multiplate® Analyser bei gesunden Kleinpferden (n = 61).....	55
<b>Abb. 10:</b> ADPtest Ergebnisse (AUC in U) am Multiplate® Analyser bei gesunden Kleinpferden (n = 61).....	56
<b>Abb. 11:</b> ADPtest HS Ergebnisse (AUC in U) am Multiplate® Analyser bei gesunden Kleinpferden (n = 60).....	57
<b>Abb. 12:</b> ASPItest Ergebnisse (AUC in U) am Multiplate® Analyser bei gesunden Kleinpferden (n = 59).....	58
<b>Abb. 13:</b> COLtest bei gesunden Kleinpferden (n = 61) und gesunden Warmblutpferden (n = 59; nach Held 2018) .....	60
<b>Abb. 14:</b> ADPtest bei gesunden Kleinpferden (n = 61) und gesunden Warmblutpferden (n = 60; nach Held 2018) .....	61
<b>Abb. 15:</b> ADPtest HS bei gesunden Kleinpferden (n = 60) und gesunden Warmblutpferden (n = 60; nach Held 2018) .....	62
<b>Abb. 16:</b> ASPItest bei gesunden Kleinpferden (n = 59) und gesunden Warmblutpferden (n = 60; nach Held 2018) .....	63
<b>Abb. 17:</b> COLtest Ergebnisse bei SIRS-Patienten.....	75
<b>Abb. 18:</b> ADPtest Ergebnisse der SIRS-Patienten.....	76
<b>Abb. 19:</b> ADPtest HS Ergebnisse der SIRS-Patienten.....	77
<b>Abb. 20:</b> ASPItest Ergebnisse der SIRS-Patienten .....	78
<b>Abb. 21:</b> COLtest bei allen SIRS-Patienten und Gesunden .....	80
<b>Abb. 22:</b> ADPtest bei allen SIRS-Patienten und Gesunden.....	81
<b>Abb. 23:</b> ADPtest HS bei allen SIRS-Patienten und Gesunden .....	82
<b>Abb. 24:</b> ADPtest HS bei allen Klein- und Großpferden .....	83
<b>Abb. 25:</b> ASPItest bei allen SIRS-Patienten und Gesunden .....	84
<b>Abb. 26:</b> ASPItest bei allen Klein- und Großpferden .....	85

### 9.3 Datenverzeichnis

Tab. A1: Zusammenfassung der BCS Erfassung (Carroll and Huntington 1988)

BCS	Hals	Rücken und Rippen	Becken
<b>0</b> <b>schlecht</b>	Deutlicher Hirschhals, an der Basis dünn und schlaff	Haut straff über den Rippen, Dornfortsätze scharf und einfach zu sehen	Eckiges Becken-Haut straff, tiefe Höhle unter Schweif und jeder Seite der Kruppe
<b>1</b> <b>mäßig</b>	Hirschhals, an der Basis dünn und schlaff	Rippen einfach zu sehen, Haut auf jeder Seite des Rückgrats eingefallen, Dornfortsätze deutlich definiert	Kruppe eingefallen, aber weiche Haut, Becken und Hüfte gut definiert, tiefe Einziehung unter
<b>2</b> <b>noch gut</b>	Dünn, aber kräftig	Rippen gerade noch zu sehen, Rückgrat gut bedeckt, Dornfortsätze fühlbar	Hüfte auf jeder Seite des Rückgrats flach, Kruppe gut definiert, einiges Fett, leichte
<b>3</b> <b>gut</b>	Kein Kamm (außer bei Hengsten), kräftig	Rippen gerade bedeckt-einfach zu fühlen, keine Rinne entlang des Rückens, Dornfortsätze bedeckt, aber	Von Fett bedeckt und abgerundet, keine Rinne, Becken einfach zu fühlen
<b>4</b> <b>zu gut</b>	Leichter Kamm, breit und kräftig	Rippen gut bedeckt, nur mit starkem Druck fühlbar, Rinn entlang des Rückgrats	Rinne zur Schweifwurzel, Becken durch weiches Fett bedeckt-nur mit starkem Druck fühlbar
<b>5</b> <b>adipös</b>	Deutlicher Kamm, sehr breit und kräftig, Speckfalten	Rippen auch mit starkem Druck nicht fühlbar, tiefe Rinne, Rücken breit und flach	Tiefe Rinne zur Schweifwurzel, Haut gespannt, Becken begraben-nicht fühlbar

**Tab. A2: Übersicht der 61 Probandendaten gesunder Kleinpferde und Ponys**

Nr.	Rasse	Alter (Jahre)	Geschlecht	BCS	Gewicht (kg)
1	Shetlandpony	17	W	4	183
2	Isländer	19	S	3	364
3	Haflinger	7	S	4	450
4	Haflinger	17	S	3	340
5	Isländer	21	W	2	320
6	Connemara	26	W	4	359
7	Shetlandpony	7	W	3	172
8	Haflinger	16	W	4	481
9	Liebenthaler	7	W	4	455
10	Dülmener	19	S	3	337
11	Isländer	5	W	4	443
12	Isländer	8	S	3	435
13	Kleinpferd	16	W	4	313
14	Tinker	12	W	4	466
15	Shetlandpony	21	W	4	218
16	Dt. Reitpony	6	W	4	427
17	Norweger	20	W	4	454
18	Isländer	6	S	3	326
19	Tinker	9	W	4	485
20	Dt. Reitpony	22	S	3	402
21	Shetlandpony	21	W	4	308
22	Liebenthaler	7	W	4	440
23	Liebenthaler	7	S	4	460
24	Kleinpferd	4	W	3	395
25	Kleinpferd	20	S	3	433
26	Isländer	10	W	4	407
27	Isländer	23	W	4	408
28	Dülmener	11	S	4	478
29	Liebenthaler	7	S	4	413
30	Isländer	10	W	4	294
31	Isländer	14	S	3	435
32	Connemara	7	W	3	399
33	Shetlandpony	21	W	4	442
34	Haflinger	14	S	3	280
35	Shetlandpony	8	S	4	170
36	Shetlandpony	15	S	3	228
37	Shetlandpony	11	W	3	156

Nr.	Rasse	Alter (Jahre)	Geschlecht	BCS	Gewicht (kg)
38	Shetlandpony	12	S	3	186
39	Haflinger	4	W	3	409
40	Kleinpferd	20	W	4	384
41	Haflinger	4	S	3	391
42	Norweger	20	S	3	433
43	Isländer	11	W	3	391
44	Isländer	26	W	4	382
45	Haflinger	23	S	4	408
46	Isländer	21	S	4	348
47	Isländer	18	S	4	354
48	Isländer	7	S	3	324
49	Haflinger	7	S	4	445
50	Haflinger	15	S	4	490
51	Norweger	13	W	3	385
52	Norweger	6	W	3	373
53	Kleinpferd	16	W	4	277
54	Isländer	8	S	4	320
55	Isländer	17	W	3	309
56	Shetlandpony	21	S	4	158
57	Dt. Reitpony	10	W	3	339
58	Kleinpferd	9	S	3	207
59	Kleinpferd	19	S	4	200
60	Kleinpferd	7	W	3	221
61	Shetlandpony	9	S	4	184

Dt. Reitpony: deutsches Reitpony, kg: Kilogramm, W: Wallach, S: Stute, BCS: Body Condition Score

**Tab. A3: Ergebnisse vom COLtest, ADPtest, ADPtest HS und ASPItest bei 61 gesunden Kleinpferden (AUC in U)**

Proband Nr.	COLtest	ADPtest	ADPtest HS	ASPItest
1	274	280	238	160
2	116	159	173	95
3	129	59	33	15
4	146	27	47	6
5	312	277	240	41
6	61	70	33	9
7	215	115	73	12
8	44	16	13	14
9	338	270	165	*
10	320	265	194	109
11	301	171	89	249
12	237	90	76	16
13	231	94	75	7
14	250	155	124	94
15	331	136	112	8
16	290	265	181	87
17	318	125	63	31
18	231	90	72	20
19	118	56	42	9
20	224	76	59	42
21	264	36	26	2
22	345	70	45	12
23	240	90	73	9
24	279	140	103	9
25	231	103	101	78
26	183	29	31	5
27	201	112	79	176
28	292	91	63	13
29	212	151	77	176
30	260	58	60	12
31	152	45	35	157
32	309	78	50	204
33	388	111	51	6
34	249	113	91	17
35	294	103	80	7
36	214	95	69	34
37	247	124	93	51
38	222	195	187	145
39	265	40	31	*
40	321	287	283	259
41	123	94	86	35

Proband Nr.	COLtest	ADPtest	ADPtest HS	ASPItest
42	293	97	92	20
43	208	235	198	168
44	360	286	329	251
45	357	367	319	183
46	255	169	114	3
47	256	327	340	186
48	305	296	144	119
49	308	255	274	269
50	219	158	125	22
51	366	306	273	26
52	314	305	310	276
53	307	276	335	272
54	401	367	354	38
55	184	222	191	113
56	276	58	*	9
57	363	326	355	321
58	366	322	305	165
59	309	318	286	316
60	320	125	85	41
61	358	253	257	308

\*: nicht messbar

**Tab. A4: Ergebnisse der Regressionsanalysen zur Überprüfung einer Abhängigkeit der Thrombozytenfunktion von ausgewählten hämatologischen Variablen bei gesunden Kleinpferden**

		COLtest	ADPtest	ADPtest HS	ASPItest
WBC	<b>p</b>	<b>0,004</b>	<b>0,021</b>	<b>0,037</b>	<b>0,028</b>
	r	0,366	0,295	0,271	0,286
ERY	<b>p</b>	0,732	0,791	0,752	0,228
	r	0,045	0,035	0,042	0,159
HTC	<b>p</b>	0,456	0,606	0,601	0,671
	r	0,097	0,067	0,069	0,057
PLT	<b>p</b>	0,445	0,395	0,765	0,888
	r	0,100	0,111	0,039	0,019
MPC	<b>p</b>	0,765	<b>0,030</b>	<b>0,042</b>	0,315
	r	0,039	-0,277	-0,263	-0,133
MPV	<b>p</b>	0,760	<b>0,007</b>	<b>0,007</b>	0,141
	r	-0,040	0,344	0,342	0,194

WBC: Leukozytenzahl, ERY: Erythrozytenzahl, HTC: Hämatokrit, PLT: Thrombozytenzahl, MPC: Mean Platelet Component, MPV: Mean Platelet Volume, p: Signifikanzwert, r: Korrelationskoeffizient, fett unterlegt: statistisch signifikant

**Tab. A5: Am Multiplate® Analyzer ermittelte Werte der 20 an SIRS erkrankten Equiden (AUC in U)**

Nr.	COLtest	APDtest	ADPtest HS	ASPItest
1	<b>526</b>	<b>414</b>	306	90
2	<b>54</b>	31	26	46
3	352	138	137	<b>13</b>
4	217	252	230	9
5	<b>112</b>	114	140	56
6	<b>60</b>	37	30	<b>0</b>
7	<b>10</b>	<b>18</b>	<b>9</b>	<b>0</b>
8	<b>482</b>	239	242	<b>21</b>
9	<b>495</b>	80	<b>49</b>	22
10	200	127	110	<b>12</b>
11	350	<b>17</b>	<b>9</b>	7
12	387	386	<b>376</b>	171
13	<b>89</b>	<b>10</b>	<b>19</b>	<b>0</b>
14	387	289	260	51
15	354	101	100	6
16	<b>443</b>	326	333	76
17	323	94	106	57
18	327	340	343	<b>36</b>
19	410	216	193	<b>10</b>
20	144	<b>35</b>	<b>32</b>	80

fett unterlegt: außerhalb des rassespezifischen Referenzintervalls liegende Werte

**Tab. A6: Ergebnisse der Regressionsanalysen zur Überprüfung einer Abhängigkeit der Thrombozytenfunktion von ausgewählten hämatologischen Variablen bei kranken Kleinpferden**

		COLtest	ADPtest	ADPtest HS	ASPItest
WBC	p	<b>0,005</b>	0,523	0,519	0,549
	r	<b>0,840</b>	0,246	0,248	0,232
ERY	p	0,36	0,97	0,932	0,681
	r	-0,374	-0,015	0,033	0,16
HTC	p	0,264	0,662	0,776	0,821
	r	-0,417	-0,17	-0,111	-0,088
PLT	p	0,715	0,375	0,43	0,987
	r	0,142	0,337	0,301	0,006
MPC	p	0,974	0,755	0,789	0,232
	r	0,013	0,122	0,104	0,443
MPV	p	0,591	0,713	0,692	0,39
	r	-0,208	-0,143	-0,154	-0,327

WBC: Leukozytenzahl, ERY: Erythrozytenzahl, HTC: Hämatokrit, PLT: Thrombozytenzahl, MPC: Mean Platelet Component, MPV: Mean Platelet Volume, p: Signifikanzwert, r: Korrelationskoeffizient, fett unterlegt: statistisch signifikant

**Tab. A7: Ergebnisse der Regressionsanalysen zur Überprüfung einer Abhängigkeit der Thrombozytenfunktion von ausgewählten hämatologischen Variablen bei kranken Warmblutpferden**

		COLtest	ADPtest	ADPtest HS	ASPItest
WBC	p	<b>0,001</b>	0,142	0,186	0,917
	r	<b>0,873</b>	0,473	0,431	-0,035
ERY	p	0,795	0,791	0,835	0,321
	r	0,089	-0,091	-0,071	-0,33
HTC	p	0,541	0,257	0,284	0,242
	r	-0,207	-0,374	-0,355	-0,385
PLT	p	<b>0,024</b>	<b>0,045</b>	0,064	0,689
	r	0,670	0,613	0,575	0,137
MPC	p	0,075	0,882	0,966	0,179
	r	0,557	0,051	0,015	-0,437
MPV	p	<b>0,05</b>	0,559	0,692	0,862
	r	-0,602	-0,198	-0,135	0,060

WBC: Leukozytenzahl, ERY: Erythrozytenzahl, HTC: Hämatokrit, PLT: Thrombozytenzahl, MPC: Mean Platelet Component, MPV: Mean Platelet Volume, p: Signifikanzwert, r: Korrelationskoeffizient, fett unterlegt: statistisch signifikant

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Prof. Dr. Kerstin Fey für das Überlassen dieses interessanten Themas und die gute Betreuung dieser Arbeit. Sie hat mir stets wertvolle Hinweise für ein korrektes wissenschaftliches Arbeiten gegeben. Vielen Dank für die professionelle Beratung und sehr lehrreiche Zusammenarbeit in der Klinik!

PD Dr. Katja Roscher möchte ich für die gemeinsame Erarbeitung des Themas danken. Vom ersten Verfassen der Studienprotokolle, den Messungen, den statistischen und grafischen Umsetzungen bis zur finalen Fassung der Disputation hat sie mir stets geholfen. Dafür möchte ich mich ganz herzlich bedanken!

Ich möchte mich auch bei Herr Prof. Dr. Moritz für seine Unterstützung und die Verwendung der Laborgerätschaften danken.

Ein großer Dank geht an das Team der Inneren Medizin für Pferde. Nur durch eure Unterstützung haben wir die Untersuchungen machen können, also vielen lieben Dank! Ich habe immer sehr gerne mit euch zusammengearbeitet!

Weiterhin danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Zentrallabors der Klinik für Kleintiere. Insbesondere möchte ich mich herzlich bei Martina für ihre Hilfe, manchmal auch am eigentlich freien Wochenende, bedanken.

Für die statistische Berechnung als auch die grafischen Darstellungen bedanke ich mich insbesondere bei Herrn Dr. Failing und Frau Sparenberg.

Herzlichen Dank an meine Mama, meinem verstorbenen Papa und meine Schwester Jana, die immer an mich geglaubt haben und mich in all meinen Zielen bestärkt haben! Auch ein besonderer Dank geht an meine langjährigen Freundinnen, ihr wart immer für mich da.

Von ganzen Herzen danke ich Jan, er hat mich von Anfang bis Ende mit seinen wertvollen Hinweisen und aufbauenden Worten liebevoll unterstützt. Danke einfach dafür, dass du immer für mich da bist!

Zum Abschluss möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6864-6

