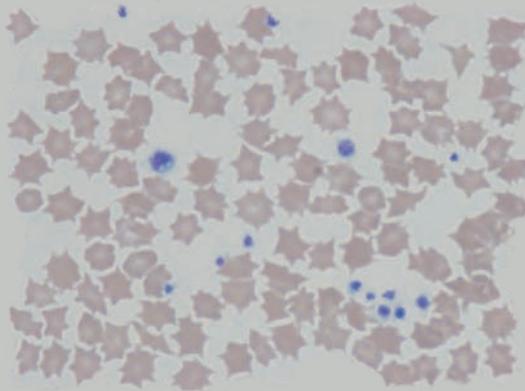


**THROMBOZYTENAGGREGATION UND
THROMBOEMBOLISCHES RISIKO**

-

**DAS SCHWEIN ALS MODELLTIER ZUR
ENDOVASKULÄREN EMBOLISATION VON
ZEREBRALEN ARTERIOVENÖSEN
MALFORMATIONEN BEIM MENSCHEN.**

CONSTANZE D. A. LEUSER



INAUGURAL-DISSERTATION

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

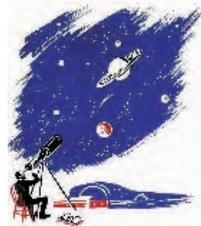
Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

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 Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem
Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere,
Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. A. Moritz

**Thrombozytenaggregation und thromboembolisches Risiko -
das Schwein als Modelltier zur endovaskulären Embolisation von
zerebralen arteriovenösen Malformationen beim Menschen**

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

eingereicht von

Constanze Dagmar Antje Leuser

Tierärztin aus Karlsruhe

Gießen 2009

In den Wissenschaften ist viel Gewisses,
sobald man sich von den Ausnahmen nicht irre machen läßt und die Probleme zu ehren weiß.
(Johann Wolfgang von Goethe)

Meinen Eltern

Inhalt:

1. Einleitung	7
2. Zielsetzung	8
3. Grundlagen	9 - 19
• primäre Hämostase	10 - 12
• Vasokonstriktion	10
• Thrombozyten	10 - 11
• Adhäsion / Aktivierung / Aggregation	11 - 12
• sekundäre Hämostase	13 - 15
• plasmatische Gerinnungsfaktoren	13 - 15
• Gegenregulation	16 - 19
• Heparin	16 - 18
• tertiäre Hämostase	19
• Fibrinolyse	19
• Diagnostik der Thrombozytenfunktion	20 - 25
• Schleimhautblutungszeit	20
• TEG und RTG	20 - 21
• Impedanzmethode	21
• Thrombozytenaggregation nach Born	22 - 24
• PFA 100™	25
• ADVIA 120™	26
• AVM-Modell	27 - 28
• Embolisation	29

4. Material und Methoden	30 - 36
• Versuchstiere	30
• AVM-Modell	30
• Anästhesie	31
• Heparindosierung	32 - 33
• Probenentnahme	34 - 35
• Thrombozytenaggregation	36
• ADVIA 120™	36
• Statistik	37
5. Ergebnisse	38 - 46
• Thrombozytenaggregation	38 - 43
• Kollagen	38 - 40
• ADP	41 - 43
• ADVIA 120™	44 - 46
6. Schlußfolgerung	47
7. Diskussion	48 - 53
• Thrombozytenaggregation	48 - 52
• ADVIA 120™	53
8. Zusammenfassung	54
9. Summary	55
10. Anhang	56 - 60
11. Abkürzungsverzeichnis	61 - 62
12. Geräte- und Firmenverzeichnis	63
13. Literaturverzeichnis	64 - 67

1. Einleitung

Arteriovenöse Malformationen (AVM) des Gehirns stellen angeborene Mißbildungen des Gefäßsystems dar. Hierbei besteht eine Verbindung zwischen zerebralen Arterien und Venen ohne zwischengeschaltetes Kapillarnetz (1). Das häufigste Symptom einer solchen Gefäßanomalie ist die intrakranielle bzw. intrazerebrale Blutung. Weitere Symptome der Erkrankung können zerebrale Anfallsleiden, neurologische Defizite und Hirnleistungseinbußen sein (1, 2).

Die Methoden zur Behandlung einer AVM umfassen die endovaskuläre Embolisation, die neurochirurgische Operation, sowie die stereotaktische Radiochirurgie (2). Ein kompletter Verschluss durch alleinige Embolisation gelingt nur in ca. 7-15% der Fälle (2). Allerdings kann dadurch das Behandlungsrisiko einer nachfolgenden Operation bzw. Radiochirurgie vermindert werden (2, 3).

Das *rete mirabile* des Schweines ähnelt der plexiformen arteriovenösen Malformation des Menschen. Aus diesem Grund hat sich diese Tierart als Modell in der humanmedizinischen Forschung und Ausbildung bewährt (4).

Das hohe Risiko thromboembolischer Komplikationen solcher Kathetereingriffe erfordert die Heparinisierung des Patienten beziehungsweise Versuchstieres (5, 6). Der Katheter tritt als Fremdoberfläche mit dem Blut in Kontakt und aktiviert die Gerinnungskaskade. Zudem besteht ein hohes Risiko einer Schädigung der Gefäßwand. Die Verletzung der Endothelzellen zieht ebenfalls eine Aktivierung der Blutgerinnung nach sich (7).

In vorherigen Versuchsreihen wurde bei Schweinen im Vergleich zum Menschen subjektiv eine erhöhte Thromboseneigung festgestellt (unveröffentlichte Beobachtung, R. Siekmann). Dies wurde in einer Studie von Höhle (2000) bestätigt. Sie weist eine erhöhte Aktivität der Gerinnungsfaktoren sowie eine abgeschwächte Fibrinolyse des Schweins im Vergleich zum Menschen nach (8).

2. Zielsetzung

Das thromboembolische Risiko bei interventionellen Kathetereingriffen macht eine Heparinisierung der Versuchstiere bzw. Patienten erforderlich. Somit steigt jedoch die Blutungsneigung. Bei einer Verletzung des Gefäßsystems führt dies zu entsprechend schwerwiegenden Komplikationen. Eine quantitative Abschätzung der Thrombozytenaktivierung durch den Eingriff ist schwierig. Aus ethischen Gesichtspunkten ist eine solche Versuchsreihe in der Humanmedizin nicht möglich. Deshalb wurden in der vorliegenden Studie die Aggregationsneigung der Blutplättchen sowie deren Aktivierungsgrad zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Kathetereingriffes beim Modelltier Schwein untersucht. Anhand der Thrombozytenfunktion sollte das Risiko des Auftretens thromboembolischer Komplikationen im Verlauf des Versuches abgeschätzt werden. Weiterhin sollte der Zeitpunkt mit der stärksten Aktivierung der Blutplättchen ermittelt werden.

3. Grundlagen

Die primäre Hämostase erfolgt durch die Vasokonstriktion und die Aggregation der Thrombozyten zu einem Thrombus. Diese Fähigkeit der Gerinnselbildung ist eine überlebensnotwendige Funktion zur Vermeidung größerer Blutverluste bei einer Verletzung des Gefäßsystems. Sie zeigt aus diesem Grund einen hohen Konservierungsgrad in der Evolution (8). Der Vorgang ist äußerst komplex. Die plasmatischen Gerinnungsfaktoren (sekundäre Hämostase) stabilisieren den Thrombus. Durch entsprechende regulatorische Mechanismen wird ein Überschießen der Reaktion verhindert und die Gerinnselbildung lokal beschränkt (9-13). Nach entsprechender Regenerationszeit erfolgt die Organisation des Thrombus mit Rekanalisation des Gefäßes oder, bei entsprechendem Schweregrad der Schädigung, die Ausbildung von Kollateralgefäßen (9-13).

Eine Abschwemmung des Thrombus oder von Teilen dessen kann, durch Verlegung des Gefäßlumens im Aufzweigungsgebiet, schwerwiegende Schäden oder den Tod zur Folge haben (12). Deshalb wird bei operativen Eingriffen oder internistischen Erkrankungen mit erhöhtem thromboembolischem Risiko die Gerinnung medikamentell gehemmt. Dies kann bei einer Überdosierung zur einer erhöhten Blutungsneigung führen (8-10, 12, 14).

Nachfolgend soll auf die an der Gerinnselbildung beteiligten Zellen, Faktoren und Strukturen näher eingegangen werden. Neben den Thrombozyten und den plasmatischen Gerinnungsfaktoren umfasst dies auch das Gefäßsystem. Die Endothelzellen und die subendotheliale Matrix stellen Adhäsionsproteine bereit. Die glatten Muskelzellen verlangsamen durch eine Vasokonstriktion den Blutfluß.

primäre Hämostase

Vasokonstriktion

Bei der Verletzung eines Gefäßes führen lokale myogene Kontraktionen, neuronale Reflexe und humorale Faktoren (Serotonin, Katecholamine, Thromboxan A₂) zur Vasokonstriktion. Der Blutverlust wird minimiert. Dies ermöglicht den Thrombozyten durch Absenkung des Blutdruckes und Flußgeschwindigkeit die Adhäsion und Bildung eines Aggregats (9, 10, 12, 14).

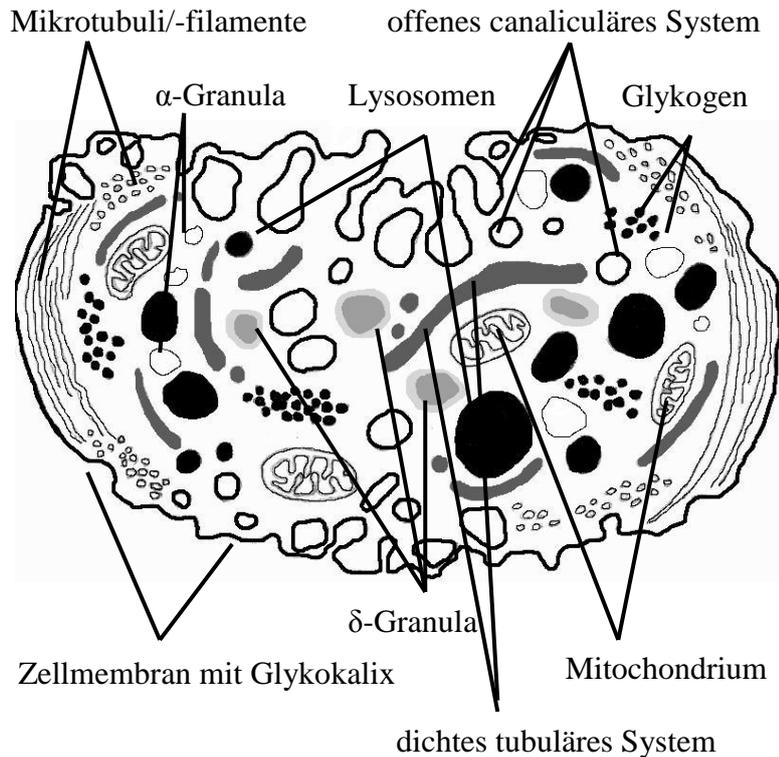
Thrombozyten

Die Blutplättchen entstehen im Knochenmark aus Megakaryoblasten. Diese differenzieren sich durch Zytokine und Wachstumsfaktoren zu Promegakaryozyten und Megakaryozyten (9, 11, 13-15). Letztere bilden durch Einstülpung der Zellmembran eine reliefartige Oberfläche. Der Prozeß setzt sich von der Peripherie der Zelle zum Zentrum fort, so daß pseudopodienartige Ausläufer entstehen (15). Sie dringen zwischen den Endothelzellen in die Knochenmarksinus vor und schnüren die 2-4 µm großen Thrombozyten ab (11, 15). Auf Grund des fehlenden Nukleus ist die Lebensdauer auf 3-10 Tagen beschränkt. Der Abbau erfolgt in der Leber und Milz (9, 13, 15).

Die Thrombozyten besitzen Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat sowie Lysosomen und andere Granula. Deren Inhaltsstoffe werden nach Aktivierung der Zellen durch Exozytose freigesetzt (10-12, 15-17). In den „elektronendichten“ oder „dense“ (δ) Granula werden kleinere Moleküle (ADP/ATP, Serotonin, Histamin, Calcium, Magnesium) gespeichert. Diese spielen für die Zellaktivierung eine wichtige Rolle. Die α-Granula enthalten verschiedene Polypeptide: Gerinnungsproteine (Gerinnungsfaktor V und VIII, Fibrinogen), Adhäsionsmoleküle (Fibronectin, Vitronectin, von-Willebrand-Faktor, Thrombospondin), Wachstumsfaktoren (platelet derived / epidermal growth factor),

Proteaseinhibitoren (Plasminogenaktivator-Inhibitor-1, α_2 -Antiplasmin), Adhäsionsmoleküle (P-selectin, Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor) sowie β -Thromboglobulin und Plättchenfaktor 4 (9, 10, 12, 13, 17). (siehe Abbildung 1)

Abbildung 1: Thrombozyt modifiziert nach H. Hess, P. Tschudi 1990 (15)



Adhäsion / Aktivierung / Aggregation

Die Endothelzellen produzieren und sezernieren Prostazyklin, ein Prostaglandin das die Thrombozytenaktivierung hemmt. Zudem exprimieren sie an ihrer Oberfläche Nukleasen. Diese spalten plättchenaktivierendes ATP und ADP zu AMP. Bei intakter Endothelzellschicht wird somit eine Aggregation der Blutplättchen verhindert (9-14).

Eine Schädigung der Gefäßwand hat zur Folge, daß subendotheliale Strukturen wie Kollagenfasern, Basalmembran sowie Gewebethromboplastin („tissue factor“ bzw. Faktor III - ein transmembranes Protein) in Kontakt mit den Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten treten können (10, 12, 14).

Die Endothelzellen produzieren den von-Willebrand-Faktor (vWF). Dieser liegt in den Speicherorganellen, Weibel-Palade-Bodies, als hochmolekulares Multimer aus identischen Untereinheiten vor. Bei einer Stimulation der Zellen durch Thrombin, Serotonin oder Histamin wird der vWF mittels Exozytose freigesetzt und zirkuliert in globulärer Form im Plasma (10, 12, 14). Er bindet an die Kollagenfibrillen und andere Strukturproteine der subendothelialen Matrix. Unter dem Einfluß hoher Scherkräfte kommt es zu einer Konformationsänderung, einer Entfaltung des Moleküls. Somit werden die Bindungsdomänen für den thrombozytären Rezeptor, der Glykoproteinrezeptor Ib/IX, zugänglich (10-12, 14). Bei niedrigen Scherkräften kann die Adhäsion an die verletzte Gefäßwand auch fibrinogenvermittelt erfolgen. Bei hohen Scherkräften ist die stabilere Verbindung mit Hilfe des von-Willebrand-Faktors notwendig (12).

Die Adhäsion der Thrombozyten an der Gefäßwand führt zu deren Aktivierung. Die Zellen durchlaufen eine Gestaltwandlung, den „shape change“. Sie bilden durch eine Kontraktion ihres Zytoskelettes Pseudopodien aus (10, 12, 14, 16). Es kommt zu einer Umverteilung der Glykoproteinrezeptoren (GP-Rezeptoren) an der Oberfläche. Der Fibrinrezeptor IIb-IIIa, ein Integrin aus zwei Glykoproteinketten, wandert in die Peripherie. Der GP-Rezeptor Ib-IX wird im Zentrum der Zellen exprimiert. Er dient der Anheftung an die verletzte Gefäßwand mittels des vW-Faktors und anderen Adhäsionsproteinen (12). Negativ geladene Phospholipide, Phosphatidylserin und Phosphatidylcholin, werden von der Innenseite der Membran an die Außenseite transferiert. Sie dienen als reaktive Oberflächen und führen die Reaktionspartner der Gerinnungskaskade, Gerinnungsfaktoren und ihre Substrate, zusammen. Somit wird die Thrombusbildung lokalisiert. Die Rezeptoren für die Gerinnungsfaktoren X und V werden zugänglich. Mittels Exozytose werden die Inhaltsstoffe der Granula freigesetzt. Es kommt zu einer lokalen Anreicherung von Gerinnungsfaktoren sowie zur Aktivierung weiterer Thrombozyten. Diese heften sich durch P-Selektin an die Gefäßwand an (9-13). Durch Thrombin wird eine Konformationsänderung des GP-Rezeptors IIb/IIIa ausgelöst, so daß eine

Interaktion mit Fibrin möglich wird. Die Fibrinbrückenbildung zwischen den Blutplättchen ermöglicht die Bildung eines stabilen Thrombozytenaggregates (9, 10, 12, 14).

sekundäre Hämostase

Plasmatische Gerinnungsfaktoren

Die Gerinnungsfaktoren zirkulieren im Blut in Form inaktiver Vorstufen. Sie werden durch proteolytische Spaltung aktiviert. Einzige Ausnahme bildet der Faktor VII. Er liegt zu 1% in bereits aktivierter Form im Plasma vor (12). Die Gerinnungsfaktoren werden mit römischen Ziffern durchnummeriert und im Falle der aktivierten Form mit einem „a“ gekennzeichnet.

Die Zellen der subendothelialen Matrix exprimieren an ihrer Oberfläche Gewebethromboplastin. Der extrazelluläre Anteil weist eine hochaffine Bindungsstelle für den Faktor VII auf. Normalerweise hat das strömende Blut keinen Kontakt mit diesen Zellen. Bei einer Verletzung kommt es zur Aktivierung des Faktors durch Gewebethromboplastin und zur Komplexbildung der beiden Proteine (10-12, 14). Dies führt zu einer hochgradigen Steigerung der proteolytischen Aktivität. Es kommt zur Aktivierung der Faktoren IX und X sowie zur autokatalytischen Aktivierung weiterer Faktor VII Moleküle (9-14).

Faktor Xa bildet auf negativ geladenen Oberflächen, Phospholipiden, einen Komplex mit dem Kofaktor Va. Dieser spaltet Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin, einem enzymatischen Faktor. Die Membran der aktivierten Thrombozyten ist besonders reich an solchen Phospholipiden (9-14). Die Bindung der Gerinnungsfaktoren, die ebenfalls negativ geladene Abschnitte enthalten, erfolgt über Ca^{2+} Ionen. Faktor IXa und Kofaktor VIIIa bilden gleichfalls einen Komplex auf den Phospholipidoberflächen. Dieser aktiviert weitere Faktor X Moleküle. Es kommt zu einer Verstärkung der initialen Gerinnungsaktivierung (9-14). Die Komplexbildung mit den Kofaktoren V und VIII steigert die proteolytische Aktivität der Gerinnungsfaktoren X und IX erheblich (9-14).

Die Gerinnungskaskade kann auch durch die autokatalytische Aktivierung des Faktors XII an negativ geladene Oberflächen ausgelöst werden (9-14). Faktor XIIa aktiviert Präkallikrein. Dieses hat zusammen mit dem Kofaktor Kininogen eine verstärkende Wirkung, da es weitere Faktor XII Moleküle sowie den Faktor XI aktiviert. Dieser aktiviert seinerseits Faktor IX. Nach Komplexbildung des Faktors IX mit Kofaktor VIII kommt es zur Aktivierung von Faktor X und zur Bildung von Thrombin.

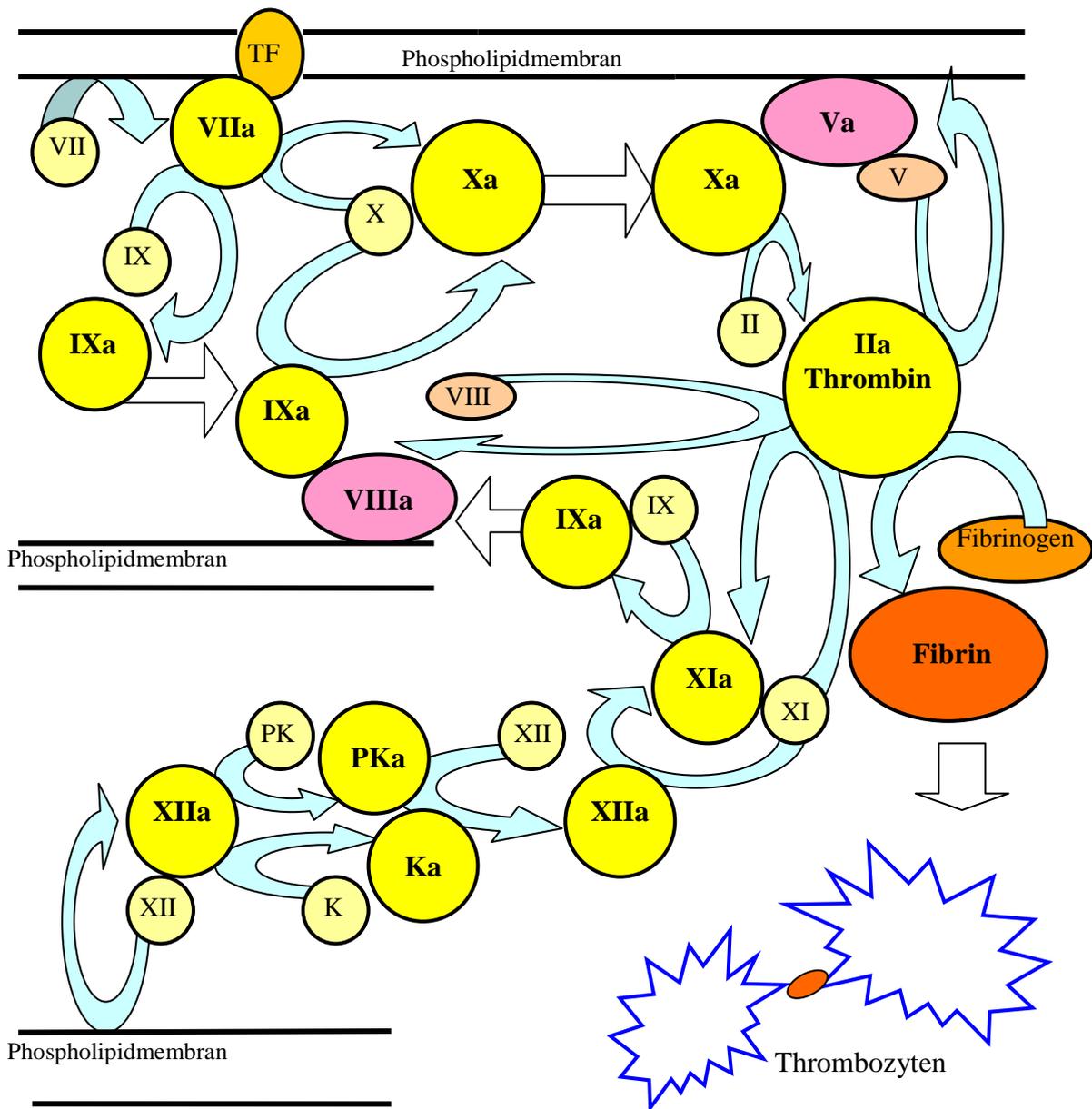
Das Enzym Thrombin nimmt eine Schlüsselrolle in der Blutgerinnung ein. Es aktiviert den Faktor XI und die Kofaktoren V und VIII und beschleunigt so den Ablauf der Gerinnungskaskade. Weiterhin aktiviert es zusätzliche Thrombozyten und es katalysiert die Fibrinbildung aus dem inaktiven Fibrinogen (9-14).

In der Leber wird Fibrinogen aus drei Peptidketten (α , β und γ) synthetisiert. Innerhalb des Moleküls sind je zwei identische Ketten antiparallel zueinander angeordnet. Im N-terminalen Bereich sind sie kovalent miteinander verbunden. Hier katalysiert Thrombin die Abspaltung der Fibrinopeptide A und B der α - und β -Ketten (9-14). Es kommt zu einer Konformationsänderung und zur End-zu-End Polymerisation der Monomere (9-14).

Thrombin aktiviert außerdem den Faktor XIII, eine Transamidase. Diese katalysiert die Quervernetzung der Fibrinmonomere über kovalente Bindungen zwischen den γ -Ketten. Zusätzlich werden kovalente Bindungen zwischen den α -Ketten ausgebildet. Das Thrombozytenaggregat wird durch die Brückenbildung der Fibrinmoleküle stabilisiert und mit der extrazellulären Matrix durch Quervernetzungen des Fibrins mit Kollagen, Fibronectin, Vitronectin und dem von-Willebrand-Faktor verankert (9-14).

Die Retraktion des Gerinnsels wird über die Aktin- und Myosin-Filamente des thrombozytären Zytoskelettes vermittelt (9, 10, 12, 14). (siehe Abbildung 2)

Abbildung 2: Gerinnungskaskade



TF: Tissue Factor; PK: Präkallikrein; PKa: aktiviertes Präkallikrein;
 K: Kininogen; Ka: aktiviertes Kallikrein;
 II - XII: Faktor II - XII; IIa - XIIa: aktivierter Faktor II - XII

Die Aktivierung der Gerinnungskaskade würde ohne geeignete Gegenregulation zu einem kompletten Verschluss des verletzten Gefäßes durch übermäßiges Anwachsen des Gerinnsels führen. Zudem käme es zur Thrombusbildung in unverletzten Gefäßbereichen durch Abschwemmung aktivierter Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten. Aus diesem Grund werden mit der Aktivierung des Blutgerinnungssystems auch gerinnungshemmende Faktoren aktiviert (9-14).

biologische Hemmung der Gerinnung

Der „Tissue Factor Pathway Inhibitor“ (TFPI) inaktiviert durch Bindung den Faktor Xa und verhindert die Spaltung von Prothrombin zu Thrombin. Zudem neutralisiert er den Komplex aus Gewebethromboplastin und Faktor VIIa. In Anwesenheit von Heparin ist die Wirkung um das 40fache gesteigert (10, 12).

Die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin, ein Kofaktor verankert in der Endothelzellmembran, führt zu einer Veränderung der Substratspezifität. Thrombin kann die Faktoren V, VIII, XI, Fibrinogen oder die Thrombozyten nicht mehr aktivieren. Statt dessen wird das Proenzym Protein C aktiviert. Dieses bildet mit dem im Plasma vorkommenden Kofaktor Protein S einen Multienzymkomplex. Gebunden an Phospholipide inaktiviert er die Kofaktoren Va und VIIIa. Somit wird die Bildung von Thrombin herunterreguliert (10-12).

Heparin

Heparin kommt in Mastzellen, basophilen Granulozyten und Endothelzellen vor (10, 11). Die Grundbausteine sind sulfatierte Disaccharide aus einem Aminozucker und einem Uronsäurerest. Die funktionelle Gruppe stellen die Sulfatreste dar, verantwortlich für die starke negative Ladung (10). Die Hemmung der Blutgerinnung erfolgt durch Bindung an Antithrombin. Entscheidend für diese Bindung ist eine Pentosaccharidsequenz des Heparins aus drei sulfatierten Glukosaminen und zwei Uronsäuremolekülen. Die Moleküle liegen in unterschiedlichen Kettenlängen vor. Je nach Größe unterscheidet man fraktioniertes und unfraktioniertes Heparin (10). Bei einer Kettenlänge von mehr als 18 Sacchariden

(unfraktioniert) bindet es an Antithrombin und Thrombin. Dies beschleunigt dessen Inaktivierung um das Tausendfache. Bei weniger als 18 Sacchariden (fraktioniert) bindet es nur an Antithrombin (10, 12). Nach der Inaktivierung dissoziiert das Heparin und steht für weitere Reaktionen zur Verfügung (10). Der Protease-Antithrombin-Komplex wird über das Retikulo-Endotheliale-System abgebaut (10, 12). Heparin stimuliert in den Endothelzellen die Synthese von Heparansulfat sowie die Freisetzung von TFPI und Gewebeplasminogenaktivator. An der Oberfläche gebunden verstärkt es die negative Ladung des Endothels und wirkt so antithrombotisch. Zudem blockiert es die Adhäsionsproteine Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin und den von-Willebrand-Faktor (10, 12).

Das Antithrombin-Heparin-System inaktiviert sowohl den Faktor Xa als auch Thrombin (10-13). Antithrombin wird in der Leber synthetisiert. Es bildet einen Komplex mit dem Faktor Xa beziehungsweise Thrombin durch Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen den Aminosäuren Arginin und Serin, dem aktiven Zentrum der Gerinnungsfaktoren (10, 12). Der Abbau erfolgt über die Leber und das Monozyten-Makrophagen-System (12). Die Inaktivierung von Faktor Xa bzw. Thrombin durch Antithrombin wird durch die Bindung von Heparin wesentlich beschleunigt, da durch eine Konformationsänderung das aktive Zentrum leichter zugänglich wird (12). *In vivo* stellen die Heparanproteoglykane der Endothelzellen die Heparinkomponente dar. Andere Serinproteasen, wie die Faktoren IXa, XIa, XIIa, werden ebenfalls neutralisiert, allerdings mit wesentlich geringerer Affinität (10, 12). Der Heparin-Kofaktor-II besitzt eine höhere Substratspezifität als Antithrombin und inaktiviert in erster Linie Thrombin. Die Wirkung wird durch Heparin hochgradig verstärkt (10, 12).

Durch Bindung an histidinreiche Glukoproteine oder durch Plättchenfaktor 4 inaktiviert, wird das Heparin durch Enzyme im Plasma und der Leber abgebaut. Nach Desulfatierung erfolgt die Ausscheidung über die Nieren (10).

Laut humanmedizinischen Angaben werden nach intravenöser Gabe 40% des unfraktionierten Heparins mit einer Halbwertszeit von 5-10 Minuten eliminiert. Danach erfolgt die Elimination

langsamer mit einer Halbwertszeit von 60-90 Minuten. Die Überwachung der Wirkung der unfraktionierten Heparine ist über die Bestimmung der aktivierten Prothrombinzeit und der activated clotting time (ACT) möglich (10). Fraktionierte Heparine zeichnen sich durch ihre bessere Bioverfügbarkeit nach subkutaner Applikation aus. Sie werden mit einer Halbwertszeit von 2–4 Stunden aus dem Plasma eliminiert. Das Verhältnis der Anti-Faktor Xa-Aktivität zur Anti-Faktor IIa-(Thrombin)-Aktivität beträgt 4:1. Die fraktionierten Heparine müssen deshalb über eine Bestimmung der Anti-Faktor Xa-Aktivität im Plasma kontrolliert werden (10). Da die Möglichkeit der Neutralisation mit Protamin gegeben ist, wird Heparin häufig zur Thromboseprophylaxe eingesetzt (10, 12).

In der Humanmedizin wird bei endovaskulärer Embolisation einer AVM Heparin zunächst als Bolus intravenös (i.v.) und anschließend als Dauertropfinfusion (DTI) verabreicht (6, 18). Die Dosierung kann nach Körpergewicht mit 50 I.E./kg Bolus und einer DTI mit 50 I.E./kg/h erfolgen oder pauschal mit einem Bolus von 5000 I.E. und einer DTI mit 1000 I.E./h (6, 12, 18).

Die Heparinisierung des Modelltieres Schwein richtet sich häufig nach den Dosierungsempfehlungen für den Menschen und variiert zum Teil stark zwischen den einzelnen Studien (3, 4, 19, 20).

Da das Gerinnungs- und Fibrinolyse-System zwischen den einzelnen Tierspezies jedoch deutliche Unterschiede zeigt, variiert folglich auch die Heparinwirkung (8). Aus diesem Grund sollte die Dosierung für den Menschen nicht unesehen für das Tier übernommen werden. Untersuchungen zu Heparinwirkung, Halbwertszeit und Dosierung sind für die Spezies Schwein nicht bekannt. Da jedoch das Schwein immer häufiger als Versuchstier gerade in der interventionellen Forschung eingesetzt wird, besteht Bedarf an entsprechenden Studien. Diese sollten neben den plasmatischen Gerinnungsfaktoren auch die Thrombozyten, die ebenfalls tierartsspezifische Unterschiede in ihrer Aggregationsneigung aufweisen, einschließen.

tertiäre Hämostase

Fibrinolyse

Die Fibrinolyse stellt eine weitere wichtige Reaktion im Rahmen der Gerinnungsregulation und der Reorganisation nach erfolgter Wundheilung dar. Die Spaltung des Fibrins erfolgt durch Plasmin, ein in der Leber synthetisiertes Enzym, das im Plasma als inaktives Plasminogen vorliegt (10, 12). Durch Gewebeplasminogenaktivator („tissue-type plasminogen activator“, t-PA) und Urokinase („urokinase-type plasminogen activator“, u-PA) wird das Molekül Plasminogen, bestehend aus zwei durch Disulfidbrücken miteinander verbundenen Ketten, zu Plasmin gespalten. Durch autokatalytische Abspaltung der Aminosäure Glutamin am N-terminalen Ende entsteht Lysin-Plasmin, mit wesentlich höherer Affinität zum Fibrin und gesteigerter Aktivität (9-12). Das Plasminmolekül verfügt über eine Lysinbindungsstelle mit der es an lysinreiche Regionen des Fibrins bindet. Diese Lysinbindungsstelle wird bei freiem, nicht an Fibrin gebundenem Plasmin, durch die kovalente Bindung des α_2 -Antiplasmin irreversibel blockiert (10, 12). Die Hemmung der Plasminogenaktivatoren erfolgt über Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), der von den Endothelzellen produziert und sezerniert wird. Durch die Bildung eines Komplexes werden t-PA und u-PA neutralisiert (9, 10, 12, 14).

Die Untersuchung der Funktion und des Aktivierungsgrades der Thrombozyten ist auf Grund der Komplexität der Gerinnungskaskade und der Sensibilität der Blutplättchen schwierig und störanfällig. Entscheidend für die Qualität der Untersuchung ist vor allem die Entnahmetechnik und Behandlung der Probe. Längeres Stauen des Gefäßes ist zu vermeiden, ebenso ein großer Unterdruck. Die Probengefäße sollten aus Kunststoff sein, da Glasgefäße zu einer Aktivierung der Faktoren XII, XI und der Thrombozyten führen (7, 14, 21).

Es stehen verschiedene Methoden zur Verfügung.

Diagnostik der Thrombozytenfunktion

Schleimhautblutungszeit

Die Schleimhautblutungszeit wird zur Diagnostik des von-Willebrand-Syndroms eingesetzt. Nach Inzision mit einer standardisierten Lanzette wird die Zeit bis zur Blutstillung gemessen. Es handelt sich um einen Screeningtest, da die Blutungszeit von der Zahl und der Funktion der Thrombozyten und den plasmatischen Gerinnungsfaktoren, insbesondere des von-Willebrand Faktors, abhängt (7, 14).

TEG und RTG

Die Thrombelastographie (TEG) und die Resonanzthrombographie (RTG) zählen zu den Globaltests im weiteren Sinn. Zur Anwendung kommen Vollblut oder rekalkifiziertes Zitratblut.

Bei der Untersuchung mittels TEG wird die Probe in eine Kunststoffküvette gegeben in die ein Edelstahlzylinder eingetaucht wird. Das sich bildende Fibrin führt zu einer Verbindung des Edelstahlzylinders mit der sich langsam drehenden Küvette, so daß der Zylinder zunehmend in die Drehbewegung mit einbezogen wird. Die Drehung des Zylinders wird als spindelförmige Kurve aufgezeichnet und erlaubt eine Differenzierung zwischen Gerinnungszeit, Gerinnselformierungszeit und Thrombusfestigkeit.

Das RTG ermöglicht die Unterscheidung zwischen dem Effekt der Fibrinbildung und der Thrombozytenaktivität. In eine Kunststoffküvette wird ein Metallpendel abgesenkt das eine Orbitalschwingung ausführt. Der Radius der Schwingung wird in Form einer Kurve aufgezeichnet. Durch die Elastizität des Fibringerinnsels kommt es zu einer Erhöhung der Eigenfrequenz in den Resonanzbereich der Erregungsfrequenz. Der Radius des Pendels nimmt zu, die Kurve steigt an. Die Kontraktionsspannung durch die Thrombozyten führt zu einer Abnahme und somit zum Absinken der Kurve. Dadurch kann eine Aussage getroffen werden über Gerinnungszeit, Fibrinbildungszeit und Amplitude des Fibrinschenkels (Hypo-/Hyperfibrinogenämie) und Amplitude des Thrombozytenschenkels (Aktivität, Zahl). Beide Methoden weisen jedoch eine geringe Sensitivität auf. Sie dienen deshalb vor allem als globale Suchtests (7).

Thrombozytenaggregation

Die Thrombozytenaggregation erlaubt eine Aussage zu Funktion und Aktivität der Blutplättchen. Sie kann mittels photometrischer oder elektrischer Methode gemessen werden.

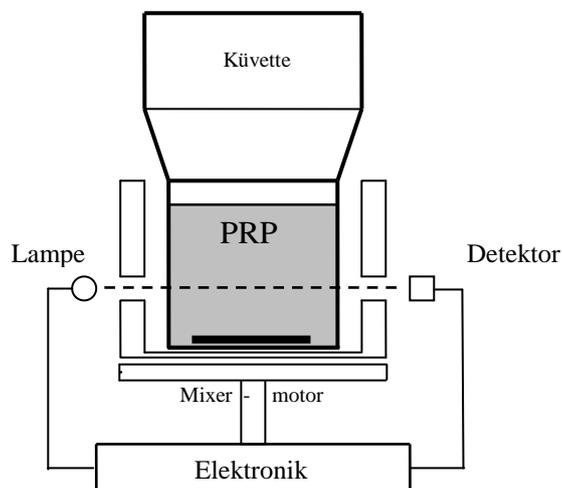
Impedanzmethode

In das mit Zitrat versetzte Vollblut werden zwei Elektroden eingetaucht und der elektrische Widerstand gemessen. Nach Zugabe von Aktivatoren, sogenannten Induktoren, ändert sich dieser durch die Bildung von Aggregaten. Die Sensitivität der Methode ist im Vergleich zur photometrischen Messung schlechter. Eine Änderung der Impedanz ist erst mehrere Minuten nach Induktorzugabe und ausreichender Aggregatbildung meßbar. Zudem wird durch die Verwendung von Vollblut die Messung von den hämatologischen Parametern stärker beeinflusst (22, 23).

Thrombozytenaggregation nach Born

Die Aktivierung der Aggregation durch ADP wurde bereits 1961 entdeckt (24). Dies führte zur Entwicklung des optischen Aggregometers (Born 1962) und Entdeckung weiterer Kofaktoren und Inhibitoren der Thrombozytenaggregation (25). Die Methode nutzt die Korrelation zwischen steigender Lichtdurchlässigkeit und der Bildung von Aggregaten. Sie findet bis heute Anwendung in der Grundlagenforschung, sowie bei klinischen und epidemiologischen Studien. Sie wird am häufigsten zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion genutzt (24). Das Gerät wird mit plättchenarmem Zitratplasma (PAP) auf 100%, mit plättchenreichem (PRP) auf 0% geeicht. Die Probe sollte nach der Entnahme und vor der Präparation des Plasmas 30 Minuten erschütterungsfrei gelagert werden, da die Thrombozyten refraktär sind (26). Das Plasma wird erwärmt (37°C) und mit einem Magnetrührer in Bewegung gehalten (Abbildung 3).

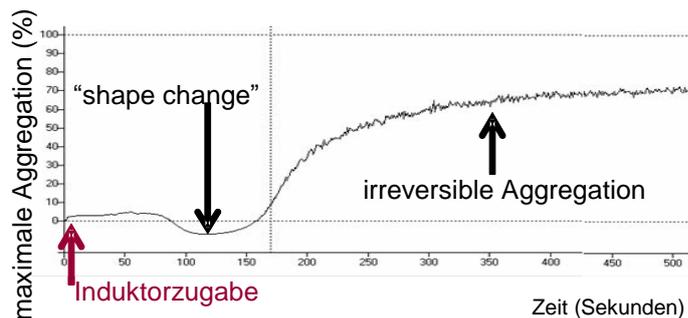
Abbildung 3: Meßprinzip modifiziert nach Hans D. Reuter 2000 (27)



Die Aggregation wird durch Zugabe eines Induktors ausgelöst. Diese zeigen jedoch speziesspezifische Unterschiede. Thrombozyten von Schweinen und Schafen reagieren weniger sensibel gegenüber ADP als die des Menschen. Im Allgemeinen ist die Thrombozytenfunktion des Schweins jedoch ähnlich der des Menschen (8). Sowohl ADP als auch Kollagen werden für die Untersuchung der Aggregation für die Spezies Schwein

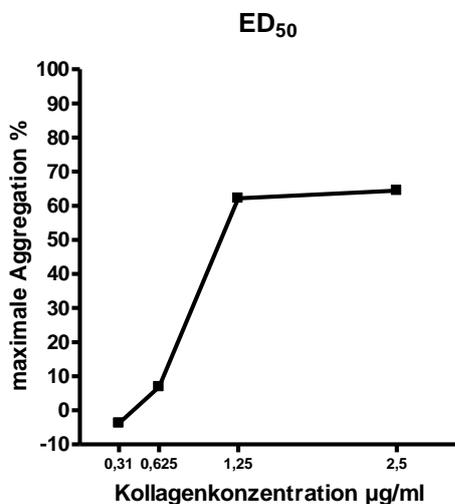
eingesetzt (16, 28-30). Die Literaturangaben sind jedoch begrenzt, weitere Studien sind notwendig (28). Ausgewertet werden die Veränderungen der Transmission in einem Zeitraum von 600 Sekunden: die anfängliche Abnahme („shape change“), die Geschwindigkeit (Gradient der maximalen Aggregation) und die maximale Lichtdurchlässigkeit (maximale Aggregation) (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4: Aggregationskurve Apact Applikation, Version 1.4



Die Beurteilung und Quantifizierung einer gesteigerten Thrombozytenaktivität ist schwierig. Zur quantitativen Auswertung ist die effektive Dosis bei der 50% der maximalen Aggregation (ED_{50}) erreicht werden besser geeignet (23, 26). Die maximale Aggregation der Konzentrationsstufen wird nach fünf Minuten abgelesen und die ED_{50} bestimmt. Dies läßt eine Beurteilung der Reaktivität der Thrombozyten zu (23) (Abbildung 5).

Abbildung 5: maximale Aggregation der Konzentrationsstufen nach 5 Minuten



Anfang der 80er Jahre wurde die Aggregation nach Born in der Northwick Park Heart Studie von Tom Meade et al (1980) angewendet, um Patienten mit einem erhöhten Thrombose- und Herzinfarkttrisiko auf Grund einer erhöhten Aktivierungsneigung der Thrombozyten zu ermitteln. Als Induktoren kamen Adrenalin und ADP zum Einsatz, ausgewertet wurden die maximale Reaktion und die ED₅₀. Die Werte korrelierten zum Teil mit anderen Risikofaktoren für das Auftreten eines Herzinfarktes. So zeigten die Patienten mit steigendem Alter eine erhöhte Aggregationsneigung. Bei einer nachfolgenden Überprüfung der damaligen Probanden bis zum Jahr 1997 konnte jedoch retrospektiv keine Korrelation zwischen den Meßgrößen und dem Auftreten eines Infarktes ermittelt werden (aus *The recent history of platelets in thrombosis and other disorders* (24) p. 27-30).

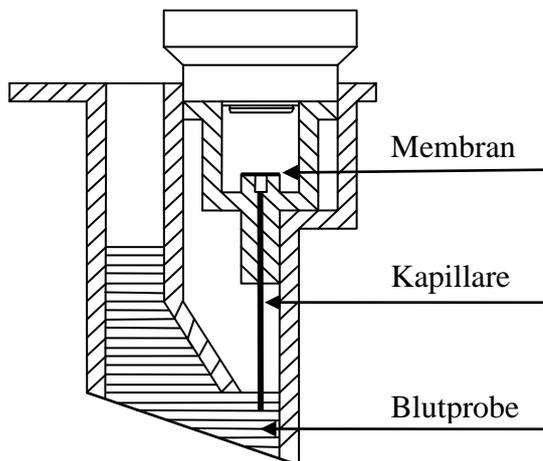
In einer Studie von Trip und Mitarbeitern aus dem Jahr 1990 wurden Patienten untersucht die bereits einen Herzinfarkt erlitten hatten. Die Probanden mit erhöhter spontaner Thrombozytenaggregation wiesen ein erhöhtes Risiko für einen weiteren Infarkt auf (aus *The recent history of platelets in thrombosis and other disorders* (24) p. 29).

Eine Arbeit von Peter Elwood et al (1993; 2001; 2003) mit über 2000 Männern mittleren Alters konnte keine Vorhersage für das Auftreten eines Myokardinfarktes treffen. Allerdings ergab sich eine schwache Korrelation für das Eintreten eines Schlaganfalls: überraschenderweise hatten die Patienten mit erhöhter Aggregationsneigung ein geringeres Schlaganfallrisiko (aus *The recent history of platelets in thrombosis and other disorders* (24) p. 30-31).

PFA 100TM

Der Platelet Function Analyzer 100TM (PFA 100TM), entwickelt von Kratzer und Born 1985, stellt ein automatisiertes Gerät zur Prüfung der Plättchenfunktion dar und soll die zeitaufwendige und störanfällige kapilläre Blutungszeit ersetzen. Die Meßzellen enthalten eine kollagenbeschichtete Kapillare, durch die das Blut aus dem Probenreservoir angesaugt wird. Das Ende der Kapillare ist mit einer Membran bedeckt, die je nach Meßzelltyp mit ADP oder Epinephrin beschichtet ist. Die aggregierenden Thrombozyten verschließen nach und nach die Öffnung, die Zeit bis zum Verschluß der Membran wird in Sekunden angegeben (Abbildung 6).

Abbildung 6: PFA Meßzelle modifiziert nach Metzler 2001 (31)



Das Ergebnis ist abhängig von der Thrombozytenzahl und dem Hämatokritwert der Probe.

Bei einem Hämatokritwert von $< 35\%$ sind keine validen Messungen möglich (12, 21).

Das Gerät wurde in einer Studie von Mischke und Keidel (2002) für die Spezies Hund mit guter Reproduzierbarkeit und ausreichender Chargenkonstanz mit Kollagen/ADP-Meßzellen evaluiert, allerdings erfolgte im Rahmen dieser Untersuchungen kein Vergleich zum Aggregometer als Referenzmethode (32).

ADVIA 120™

Das Meßprinzip des automatisierten Multipspezies Hämatologiegerätes ADVIA 120™ (Siemens Medical Solutions Diagnostics, früher Bayer) basiert auf dem Prinzip des Durchflußverfahrens bei der die Blutzellen eine Meßöffnung passieren und durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt werden. Dabei werden die Zellen mit einem optischen Verfahren, der Doppelwinkel-Laserstreulicht-Meßmethode, nach isovolumetrischer Aufkuglung mit Glutaraldehyd differenziert. Zum Einsatz kommt bei dieser Methode ein Laserstrahl der ein monochromatisches Licht erzeugt. Anhand der Lichtintensität des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes sowie der Absorbtionseigenschaften der Zellen können diese nach ihrer Größe und ihren Transmissionseigenschaften unterschieden werden. Die Leukozyten werden mit Hilfe des Peroxidasekanals und des Basophilen-Kernsegmentierungskanals differenziert. Der Peroxidasekanal trennt die Leukozyten auf Grund der Färbung entsprechend ihrer endogenen Peroxidase-Aktivität. Der Basophilen-Kernsegmentierungskanal differenziert diese im Laserstreulicht anhand der Leukozytenkerne in mononukleäre, polymorphkernige und basophile Granulozyten. Die Thrombozyten (PLT) werden von Erythrozytenfragmenten, Zelltrümmern, u.ä. durch eine Doppelwinkel-Streulichtmessung unterschieden: Im Niedrigwinkelbereich wird das Zellvolumen, im Hochwinkelbereich der Brechungsindex gemessen. Somit wird auch die Bestimmung der Konzentration der mittleren inneren Thrombozytenbestandteile, ein Maß für die Granularität der Thrombozyten (mean platelet component = MPC) und die Verteilungsbreite der Thrombozytenbestandteile (platelet component distribution width = PCDW) möglich. Thrombozytenaggregate (clumps) werden gesondert dargestellt (14, 33, 34). Das Gerät ist in der Lage entsprechende Scattergramme zur genaueren Auswertung zu erstellen.

AVM-Modell

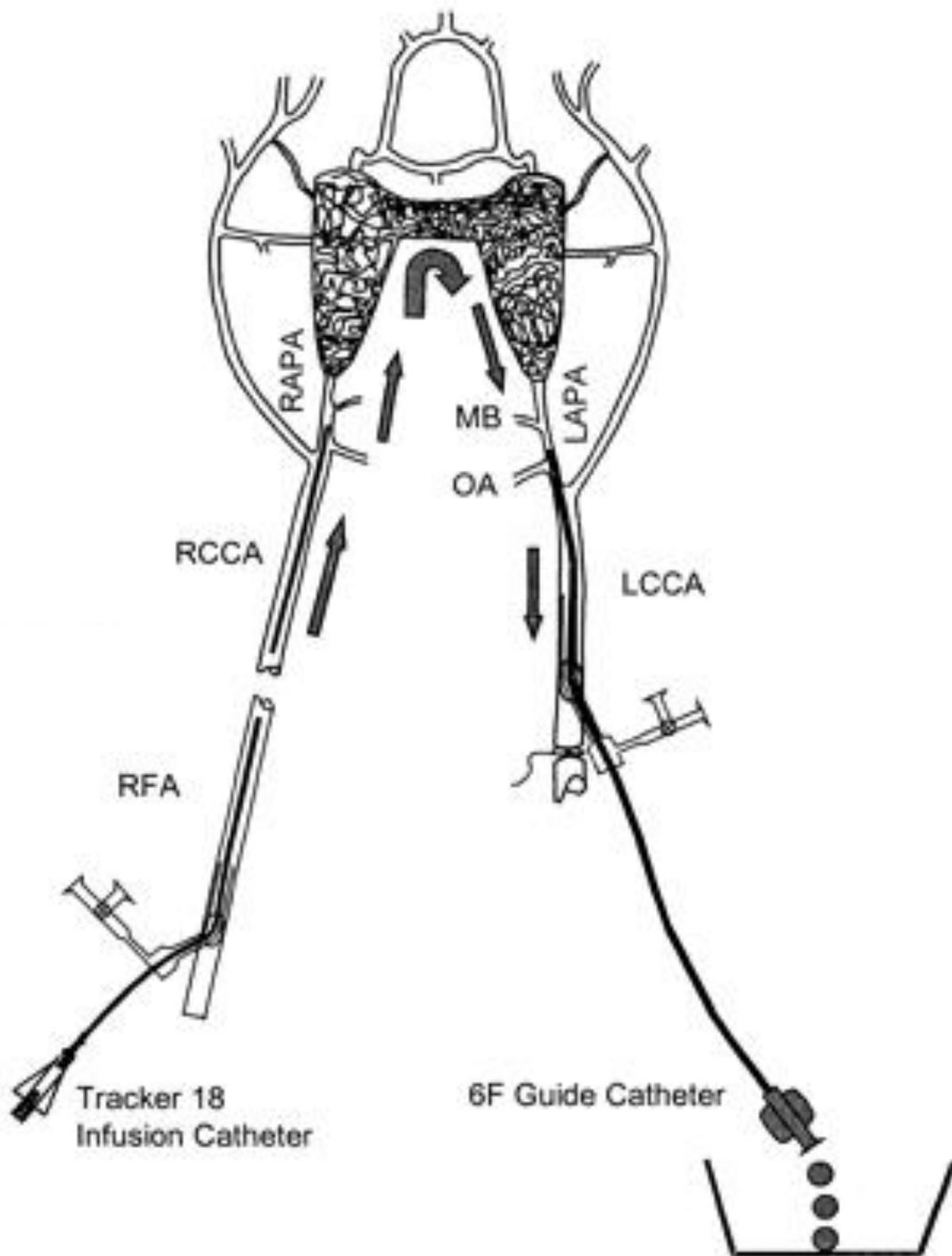
Zur Durchführung der Embolisationsstudie müssen, um vergleichbare Daten zum Menschen zu erhalten, am Modelltier Schwein folgende Modifikationen vorgenommen werden.

Das *rete mirabile* des Schweins, ein filigranes arterielles Netz ähnlich dem im Sinus cavernosus liegenden Segment der *Arteria carotis interna* des Menschen, dient Studien zur Untersuchung von Embolisationsmaterialien zum Verschuß arteriovenöser Malformationen.

Die bilateralen *rete mirabile* stellen den Nidus des Modells dar. Zwischen der rechten *Arteria carotis communis* und der *Vena jugularis externa* wird eine Fistel angelegt. Die Okklusion der rechten *Arteria occipitalis*, dem *ramus muscularis* der rechten *Arteria pharyngealis ascendens* und der rechten *Arteria carotis externa* maximiert den Blutfluß. Dies erzeugt den notwendigen Druckgradienten für den Shuntfluß. Die Blutzufuhr erfolgt durch die linke *Arteria carotis communis* über die linke *Arteria pharyngealis ascendens*, den linken *ramus anastomoticus* und der linken *Arteria anastomotica* (5).

Das modifizierte Modell nach Siekmann stellt den venösen Abfluß durch die Okklusion der *Arteria carotis communis* und Verschieben eines Katheters bis proximal der Abzweigung zur *Arteria occipitalis*, *Arteria pharyngealis ascendens* und *Arteria carotis externa* her. Der Druckgradient kommt durch die Verbindung mit der Atmosphäre zustande. Somit entfällt die Konstruktion einer arteriovenösen Fistel und die Okklusion der *Arteria occipitalis*, *Arteria pharyngealis ascendens* und *Arteria carotis externa* (4).

Abbildung 7: AVM Modell nach Siekmann



RAPA: rechte Arteria pharyngealis ascendens, LAPA: linke Arteria pharyngealis ascendens

MB: ramus muscularis, OA: Arteria occipitalis

RCCA: rechte Arteria carotis communis, LCCA: linke Arteria carotis communis

RFA: rechte Arteria femoralis

Embolisation

Zur Embolisation einer arteriovenösen Malformation stehen verschiedene Möglichkeiten zur Auswahl: mechanische (Ballon, ablösbare coils), Partikel (Polyvinyl Alkohol Partikel, Gelfoam) und Flüssigkleber (Cyanoacrylate, dehydratisierter Ethanol, Ethibloc, Sodium tetradecyl sulfat). Das Flüssigembolisat Onyx[®] ist ein Ethylen Vinyl Alkohol Copolymer gelöst in Dimethyl Sulfoxid. Die Zugabe von Tantalpulver sorgt für die erforderliche Röntgendichte. In wässrigen Lösungen diffundiert Dimethyl Sulfoxid und das Copolymer präzipitiert zu einem schwammartigen Embolus. Die Gefahr einer Verklebung mit dem Katheter oder der Gefäßwand besteht im Gegensatz zu den Cyanoacrylaten nicht (3, 18, 19).

4. Material und Methoden

Versuchstiere

Die Experimente mit der Tierversuchsnummer AZ:GI 20/10 Nr. 31/2004 wurden an 42 Deutschen Edelschweinen (95% männlich, 5% weiblich) vorgenommen. Die Tiere waren 3 bis 5 Monate alt und hatten ein Körpergewicht von 25 bis 40 kg ($32,3 \pm 5,6$ kg). Die Schweine wurden jeweils am Vortag der Untersuchungen aus der Versuchstieranstalt der Justus-Liebig Universität Gießen (Lehr- und Forschungsstation Oberer Hardthof des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik der Justus-Liebig Universität Gießen) angeliefert und im Fachbereich in einem isolierten Tierstall untergebracht. Die Tiere hatten ad libitum Zugang zu Wasser, erhielten jedoch am Tag des Eingriffes kein Futter.

AVM-Modell

In der Studie kam das Modell nach Siekmann und das Flüssigembolisat Onyx[®] (Micro Therapeutics, Inc., Irvine, CA, USA) zum Einsatz. Ein in der rechten *Arteria carotis communis* platzierter 6F Katheter (Cordis[®] Medizinische Apparate GmbH, Johnson & Johnson company, Miami Florida), der über die rechte *Arteria femoralis* mittels Seldinger-Technik eingebracht wurde, stellte die arterielle Seite des Modells dar. Als venöse Drainage diente die linke *Arteria Carotis communis*. Diese wurde distal des Zugangs ligiert und der Katheter in die linke *Arteria pharyngealis ascendens* bis über die Abzweigungen der *Arteria occipitalis*, *Arteria pharyngealis ascendens ramus muscularis* und *Arteria carotis externa* hinaus vorgeschoben. Hierzu wurden sogenannte Schleusen (Cordis[®] Medizinische Apparate GmbH, Johnson & Johnson company, Miami Florida) in das Gefäßsystem eingebracht. Diese dichten das Gefäß nach außen ab und ermöglichen das Wechseln der Katheter über eine Führungsschiene. Der erforderliche Druckgradient kam durch die Öffnung zur Atmosphäre zustande (4).

Anästhesie

Die Praemedikation erfolgte im Tierstall unabhängig vom Körpergewicht mit 500mg Ketamin (Ketanest[®], Pfizer Corporation Austria GmbH, Wien, Österreich) und 15mg Midazolam (Dormicum[®], Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) i.m.. Anschließend wurden die Tiere gewogen, in das Katheterlabor verbracht, der venöser Zugang (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) am Vorderlauf gelegt, eine Infusion mit 0,9%iger Natriumchloridlösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), eine vierpolige EKG-Ableitung mit Monitorüberwachung und das Pulsoxymeter angeschlossen. Nach Applikation von 0,5mg Atropinsulfat (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und 0,2mg Fentanyl (Fentanyl[®], Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) i.v. wurde zur transtrachealen Intubation (Ø 7 mm) ein ca. 5 cm langer Schnitt zwischen Kehlkopf und manubrium sterni durchgeführt. Die Beatmung inklusive Kapnometrie (Zufluß 1Liter O₂/min, 1,5Vol% Isofluran (Isofluran CP, CP Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland), Atemfrequenz 14Züge/min, Tidalvolumen 10ml/kg) erfolgte über ein geschlossenes Narkosekreissystem (Dräger Tiberius19; Drägerwerk AG & Co KG, Lübeck, Deutschland). Mit der Intubation startete ein Perfusor mit 6,6mg/kg/h Ketamin und 0,075mg/kg/h Midazolam i.v. Die Blutdruckmessung erfolgte invasiv über einen Katheter in der *Arteria femoralis*. Vor Präparation der *Arteria carotis communis* und angiographischer Darstellung des *rete mirabile* wurde angesichts der kardiodepressiven Wirkung der Manipulation, Suprarenin (Suprarenin[®], Hoechst Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt) mit 0,5-2µg/min mittels Perfusor verabreicht. Zur Vermeidung von Abbildungsartefakten durch Muskelzittern, wurden 4mg Pancuroniumbromid/kg (Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland) injiziert und nach Bedarf nach 45min wiederholt. Vasospasmen der zerebralen Arterien machten die Gabe von 0,2–0,4mg Glyceroltrinitrat (G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt, Deutschland) i.a. notwendig. Der daraus resultierende Blutdruckabfall wurde durch die Suprareningabe und die Applikation von Glyceroltrinitrat kontrolliert (35).

Heparindosierung

Zur Überwachung der Wirkung des unfraktionierten Heparins (Heparin Ratiopharm®) diente die aktivierte Koagulationszeit (activated clotting time, ACT) und die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (activated prothrombin time, aPTT) im Rahmen einer zweiten Studie der Arbeitsgruppe zur Untersuchung der plasmatischen Gerinnungsfaktoren.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Protokoll der Heparindosierung ist in Tabelle 1 dargestellt. Die ersten vier Tiere dienten der Dosisfindung für den Heparinbolus: die ersten beiden Schweine erhielten unabhängig von ihrem Körpergewicht 5000 I.E., die zwei nachfolgenden Tiere 400 I.E./kg und 250 I.E./kg.

Auf Grund der Vorversuche wurden drei randomisierte Gruppen eingeteilt mit 100 I.E./kg (6 Schweine), 200 I.E./kg (7 Schweine) und 300 I.E./kg (1 Schwein) Heparin im Bolus. Da sich die Dosierung mit 300 I.E./kg Heparin als zu hoch herausstellte, wurden keine weiteren Tiere dieser Gruppe zugeordnet.

Im zweiten Teil dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der Auswirkungen einer einmaligen Heparin-Bolusgabe mit anschließender Heparindauertropf-Infusion. Hier wurden vier Gruppen gebildet, die 20 Minuten nach der Bolusgabe von 100 I.E./kg, eine Dauertropfinfusion mit 33 I.E./kg/h (1 Tier), 50 I.E./kg/h (2 Tiere), 66 I.E./kg/h (11 Tiere) und 100 I.E./kg/h (10 Tiere) erhielten. Die Dosierungen mit 33 I.E./kg/h und 50 I.E./kg/h erwiesen sich als zu niedrig, deshalb wurden keine weiteren Tiere diesen Gruppen zugeordnet.

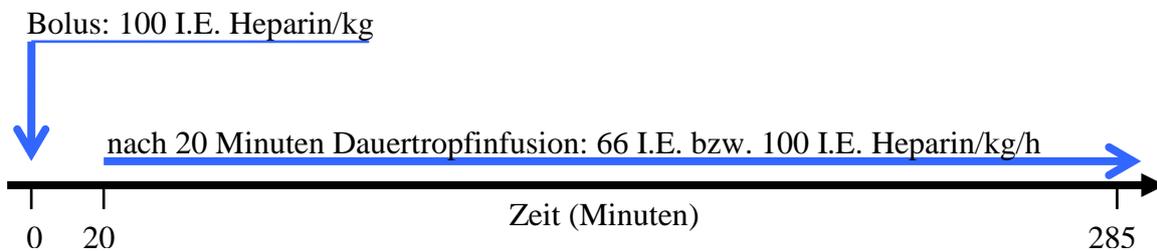
Ausgewertet wurden 4 Gruppen: die zwei Bolusgruppen mit 100 I.E. und 200 I.E. und die zwei DTI Gruppen mit 66 I.E./kg/h und 100 I.E./kg/h (Abbildung 9).

Heparindosierung	Gruppengröße (Tiernummern)
<u>Vorversuche:</u>	
5000 I.E. Heparin	2 Tiere (1, 2)
400 I.E. Heparin/kg	1 Tier (3)
250 I.E. Heparin/kg	1 Tier (4)
<u>Heparinbolus:</u>	
100 I.E. Heparin/kg	<u>6 Tiere</u> (5, 9, 11, 13, 14, 16)
200 I.E. Heparin/kg	<u>7 Tiere</u> (6, 8, 10, 12, 15, 17, 42)
300 I.E. Heparin/kg	<u>1 Tier</u> (7)
<u>Heparindauertropfinfusion: 100 I.E. Heparin/kg als Bolus i.v., nach 20 Minuten:</u>	
33 I.E. Heparin/kg/h	<u>1 Tier</u> (18)
50 I.E. Heparin/kg/h	<u>2 Tiere</u> (20, 22)
66 I.E. Heparin/kg/h	<u>11 Tiere</u> (19, 23, 25, 26, 28, 30, 33, 35, 37, 39, 41)
100 I.E. Heparin/kg/h	<u>10 Tiere</u> (21, 24, 27, 29, 31, 32, 34, 36, 38, 40)

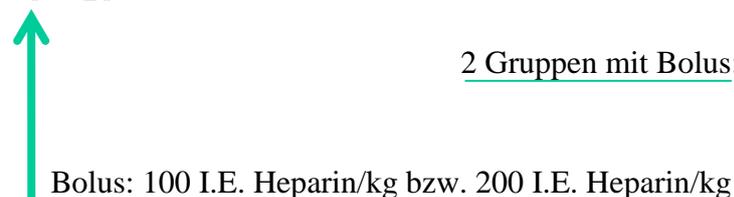
Tabelle 1: Heparindosierung

Abbildung 9: ausgewertete Heparingruppen

2 Gruppen mit Dauertropfinfusion:



2 Gruppen mit Bolus:



Probenentnahme

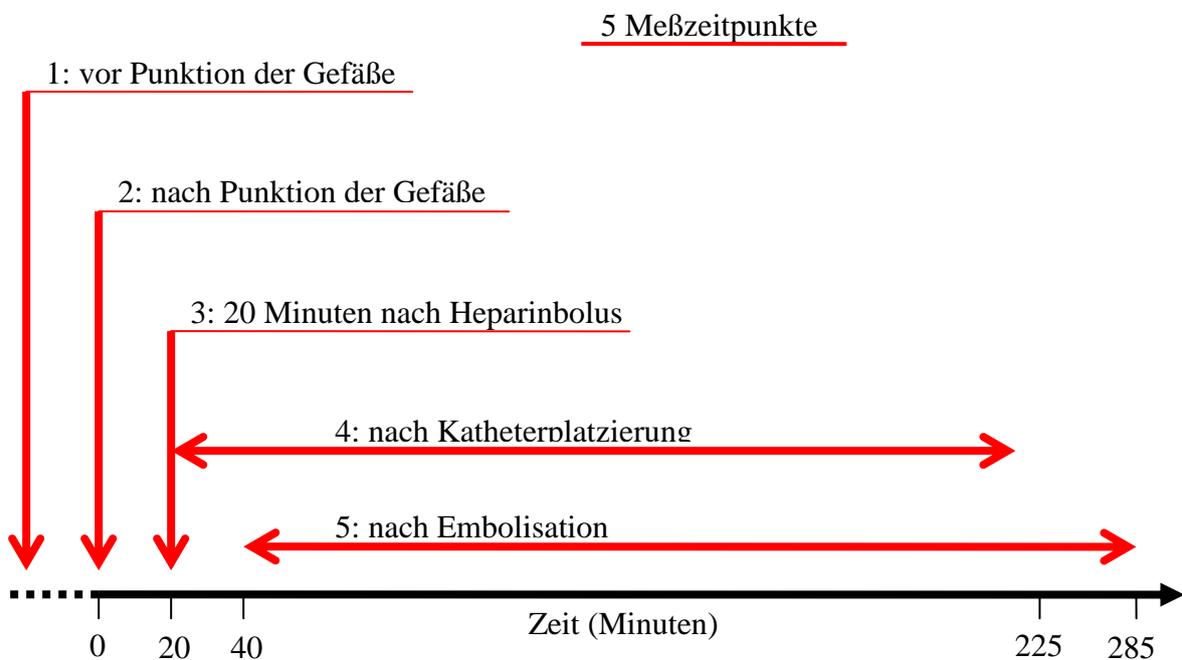
Die erste Blutentnahme erfolgte durch einen 20G Venenverweilkanüle (Vasofix® Braunüle®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) aus der *Vena cephalica*, um den Einfluß der Punktionen zum Einbringen der Schleusen für die Katheter zu untersuchen. Im Folgenden wurde das Blut aus der *Vena femoralis* mittels 5F Katheter (Cordis® Medizinische Apparate GmbH, Johnson & Johnson company, Miami Florida) gewonnen. Dieser wurde nach jeder Blutabnahme mit 10 ml einer 0,9%igen Kochsalzlösung gespült um einen Verschuß durch Aggregate zu verhindern. Aus diesem Grund war es notwendig zunächst 10 ml Blut zu aspirieren, mit Reapplikation nach Entnahme der entsprechenden Proben: 10%-Na-Zitratblut (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) für die Untersuchung der Thrombozytenaggregation und (K₂)EDTA-Blut (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) zur Untersuchung mit dem Hämatologiegerät ADVIA 120™ (Tabelle 2).

Zeitpunkt der Blutentnahme	Probe
vor Punktion der Arterien und der Vene über den Zugang an der <i>Vena cephalica</i> :	10 ml Zitratblut (Aggregometrie) 1,2 ml EDTA-Blut (ADVIA 120™)
Zugang an der rechten <i>Vena femoralis</i> : nach Punktion der beiden <i>Arteria femoralis</i> und der linken <i>Arteria carotis communis</i>	10 ml Zitratblut (Aggregometrie) 1,2 ml EDTA-Blut (ADVIA 120™)
<u>Heparingabe</u>	
20 Minuten nach Gabe des Heparinbolus	10 ml Zitratblut (Aggregometrie) 1,2 ml EDTA-Blut (ADVIA 120™)
nach Katheterplatzierung im rete mirabile	10 ml Zitratblut (Aggregometrie) 1,2 ml EDTA-Blut (ADVIA 120™)
nach Abschluß der Embolisationsstudie	10 ml Zitratblut (Aggregometrie) 1,2 ml EDTA-Blut (ADVIA 120™)

Tabelle 2: Probenentnahme

Insgesamt wurden 5 Proben entnommen: die erste vor, die zweite nach Legen der Schleusen. Der Punktion der Arterien, der Vene und der Ligation der *Arteria carotis communis* folgend wurde das Heparin appliziert und 20 Minuten später die dritte Blutentnahme vorgenommen. Nach Platzierung der Katheter im *rete mirabile* wurde die vierte, nach Beendigung der Embolisationsstudie die fünfte Blutprobe abgenommen (Abbildung 10).

Abbildung 10: Meßzeitpunkte



Thrombozytenaggregation

Die Thrombozytenaggregation wurde mit dem 4-Kanal-Aggregometer APACT 4 (Labitec) mit dem Induktor ADP (Chrono-Log, Leiden, Niederlande) in den Konzentrationen 20µmol/ml, 10µmol/ml, 5µmol/ml, 2,5µmol/ml, sowie Kollagen (mölab, Langenfeld, Deutschland) in den Konzentrationen 2,5µg/ml, 1,25µg/ml, 0,625µg/ml, 0,31µg/ml untersucht. Die Auswertung erfolgte automatisch mit einem systemeigenen Computerprogramm (Apact Applikation, Version 1.4, PASS Engineering GmbH, Bonn), angegeben wurden die Werte der maximalen Aggregation, des maximalen Gradienten der Aggregation und der „shape change“ der Thrombozyten.

Nach einer Ruhephase von 30 Minuten in vertikaler Position bei Raumtemperatur wurde das plättchenreiche Plasma durch Zentrifugation mit 75g (ohne Bremse) für 20 Minuten, anschließend das plättchenarme Plasma durch erneute Zentrifugation mit 6500g für 90 Sekunden hergestellt.

ADVIA 120™

Die Untersuchungen wurden mit dem hämatologischen Analysegerät ADVIA 120™ (Firma Siemens, Medical Solutions Diagnostics, Eschborn) mit (K₂)EDTA-Blut innerhalb 1 Stunde nach der Entnahme der Probe durchgeführt. Die für die Studie interessanten Meßgrößen stellten die Anzahl der Thrombozyten (PLT) und Thrombozytenaggregate (PLT clumps) sowie der MPC (mittlere Konzentration der inneren Bestandteile der Thrombozyten, entspricht weitestgehend der Granularität der Thrombozyten) als Maßstab der Aktivierung und der PCDW (Verteilungsbreite des MPC) dar (7, 14).

Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Statistikprogramms BMDP/Dynamic Release 7.0. auf der Rechneranlage der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (AG-Leiter: Dr. Dipl. K. Failing). Die Erstellung der graphischen Darstellungen wurde mit dem Statistikprogramm GraphPadPrism 4.0 (GraphPad Software, San Diego) durchgeführt. Von den Daten wurde zunächst eine einfache beschreibende Statistik angefertigt. Da die Anzahl der Aggregate, der Wert der maximalen Aggregation und des Gradienten mit dem Induktor Kollagen und der shape change eine stark rechtsschiefe Verteilung zeigten, wurden die Daten logarithmiert. Zum Vergleich der hämatologischen Parameter zu den Meßzeitpunkten fand ein Students t-Test oder - im Falle nicht normalverteilter Daten - ein Wilcoxon Mann Whitney Test Verwendung. Die Werte der Aggregation wurden in Hinblick auf Meßzeitpunkt und Induktorkonzentration mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) untersucht, bezüglich Meßzeitpunktes, Induktorkonzentration und Heparinkonzentration mit einer dreifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA). P-Werte von $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

5. Ergebnisse

Thrombozytenaggregation

Kollagen

Im Vergleich der Aggregationswerte zum Meßzeitpunkt 1 vor Punktion der *Arteria femoralis* und *Vena femoralis* und Ligation der *Arteria Carotis Communis* zu den Werten zum Meßzeitpunkt 2 nach Punktion und Legen der Schleusen, ergab sich eine höhere Aggregationsneigung zum Zeitpunkt 2. Dieser Anstieg war allerdings nicht signifikant (Abbildungen 11 und 12; Anhang Tabelle 3).

Abbildung 11: maximale Aggregation

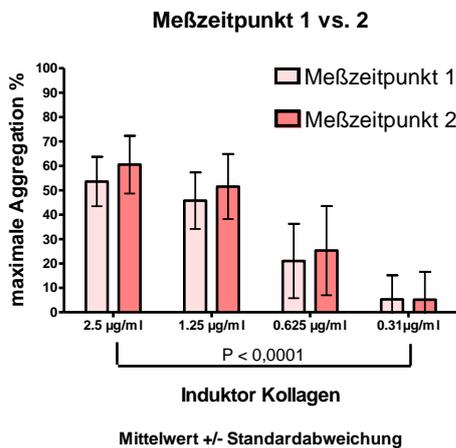
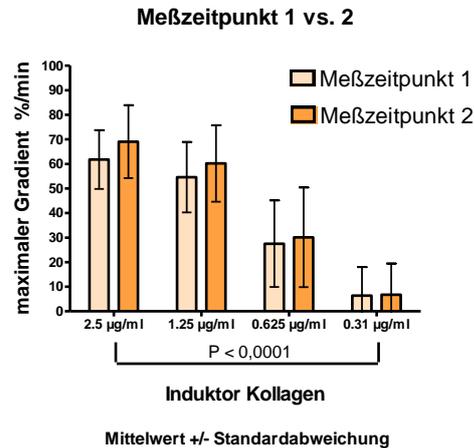


Abbildung 12: maximaler Gradient der Aggregation



Die Werte der maximalen Aggregation und des maximalen Gradienten der Aggregation sanken mit abnehmender Kollagenkonzentration hochsignifikant. Auch der „shape change“ zeigte eine Abhängigkeit von der Induktorkonzentration (nicht dargestellt, siehe Anhang Tabelle 3: $P < 0,0001$): die Werte waren bei niedrigen Konzentrationen des Agonisten deutlich höher. Es ergab sich keine Abhängigkeit der sinkenden Werte der maximalen Aggregation, des maximalen Gradienten der Aggregation und des „shape change“ mit abnehmender Induktorkonzentration von den verschiedenen Meßzeitpunkten (Tabelle 3).

Der Vergleich der Meßzeitpunkte 2: nach Legen der Schleusen, 3: 20 Minuten nach Gabe des Heparinbolus, 4: nach Platzierung der Katheter im *rete mirabile* und 5: nach Embolisation, zeigte deutlich sinkende Aggregationswerte der maximalen Aggregation und des maximalen Gradienten (siehe Abbildungen 13 und 14).

Abbildung 13: maximale Aggregation

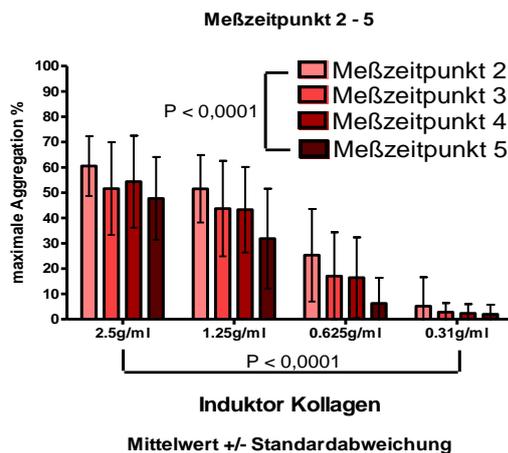
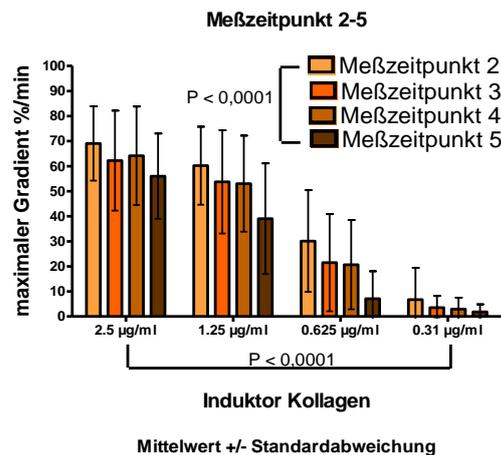


Abbildung 14: maximaler Gradient der Aggregation

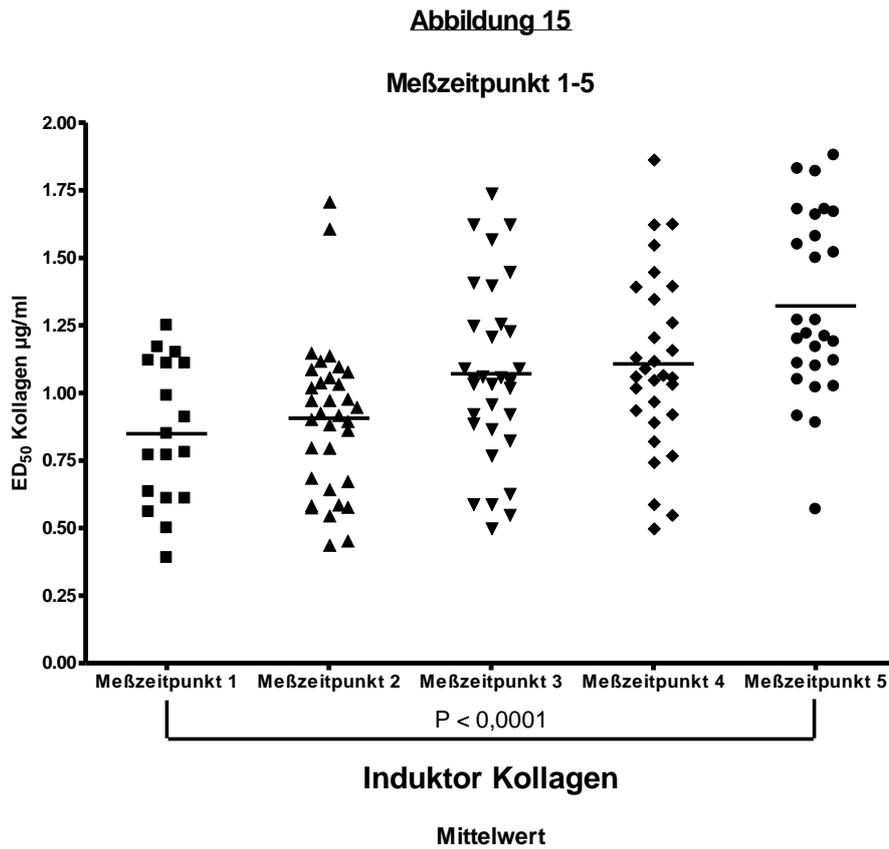


Die maximale Aggregation ($P < 0,0001$) und der maximale Gradient ($P = 0,0010$) sanken mit abnehmender Konzentration des Induktors erheblich, mit einem erkennbaren Einfluß des Meßzeitpunktes auf die sinkenden Werte (nicht dargestellt, Anhang Tabelle 4).

Die Heparingruppen unterschieden sich in der maximalen Aggregation und dem maximalen Gradienten nicht wesentlich voneinander. Für die Werte der Aggregation ergaben sich keine Abhängigkeiten zwischen der Zugehörigkeit zu einer der Gruppen und dem Meßzeitpunkt. Es bestand jedoch eine Korrelation zwischen den durch die abnehmenden Induktorkonzentrationen sinkenden Aggregationswerte und der jeweiligen Heparindosierung (Anhang Tabelle 5: maximale Aggregation: $P = 0,0105$, maximaler Gradient $P = 0,0308$).

ED₅₀

Die jeweilige Kollagenkonzentration bei der 50% des maximalen Aggregationswertes erreicht wurden, zeigte im Vergleich der Meßzeitpunkte einen signifikanten Anstieg von Zeitpunkt 1 nach Zeitpunkt 5 und ist somit Anzeichen einer abnehmenden Aggregationneigung der Thrombozyten im Verlauf des Eingriffes (Abbildung 15, Anhang Tabelle 9).



ADP

Die Messungen mit dem Induktor ADP zeigten einen signifikanten Anstieg der maximalen Aggregation und des maximalen Gradienten der Aggregation von Meßzeitpunkt 1 nach Meßzeitpunkt 2 (siehe Abbildung 16 und 17). Der „shape change“ veränderte sich nicht wesentlich zwischen den Meßzeitpunkten (Anhang Tabelle 10).

Abbildung 16: maximale Aggregation

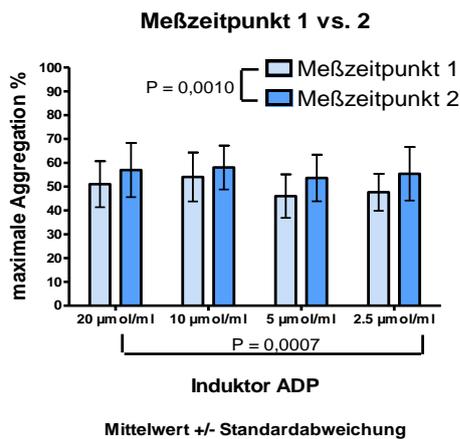
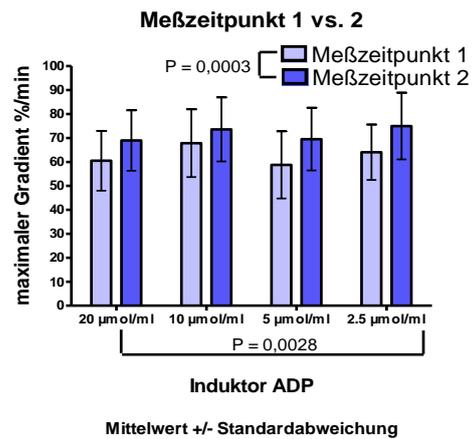


Abbildung 17: maximaler Gradient der Aggregation



Die Meßreihen zeigten mit sinkender Konzentration des Agonisten einen ausgeprägten Abfall der Werte der maximalen Aggregation und des maximalen Gradienten, jedoch keinen erkennbaren Unterschied im „shape change“ (Anhang Tabelle 10). Eine Abhängigkeit der sinkenden Aggregationswerte mit sinkender Induktorkonzentration vom Meßzeitpunkt bestand nicht (Tabelle 10).

Im Verlauf des Eingriffes fielen die Werte der Aggregation von Zeitpunkt 2 nach Zeitpunkt 5 deutlich ab (siehe Abbildung 18 und 19).

Abbildung 18: maximale Aggregation

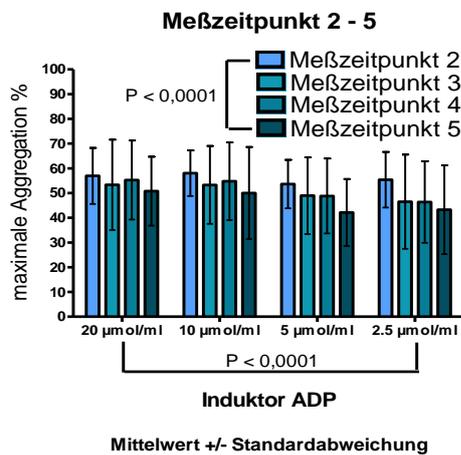
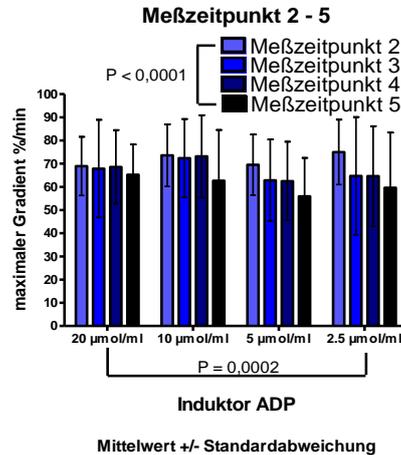


Abbildung 19: maximaler Gradient der Aggregation

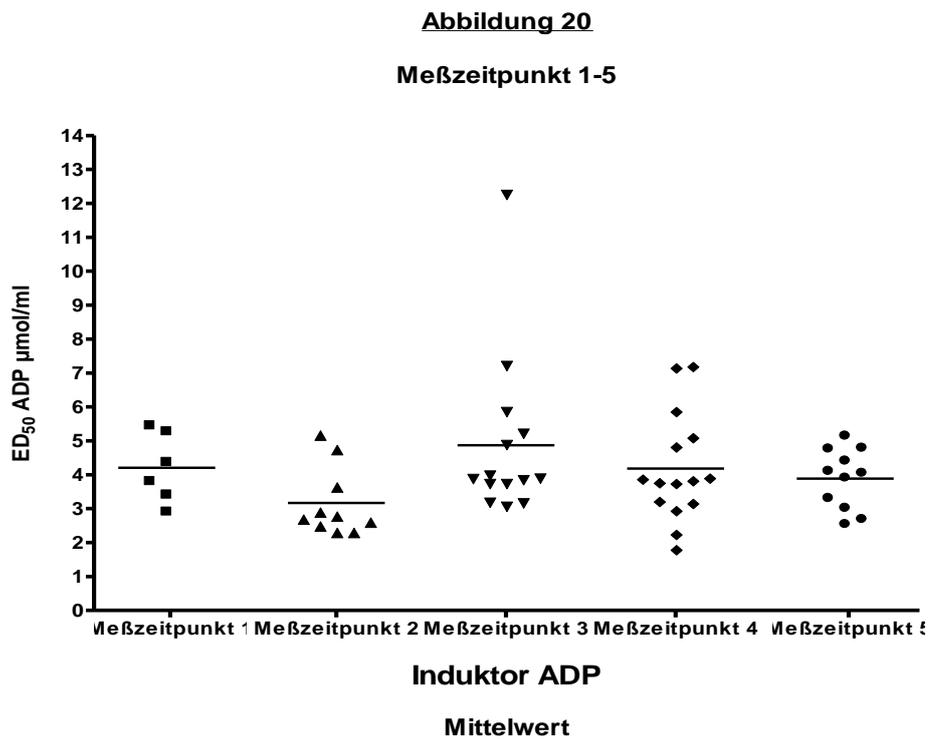


Mit abnehmender Konzentration des Induktors sank das Ausmaß der maximalen Aggregation und des maximale Gradienten wesentlich. Eine Auswirkung des Meßzeitpunktes auf die mit abnehmender Konzentration sinkenden Werte der maximalen Aggregation und des maximalen Gradienten der Aggregation bestand nicht (Anhang Tabelle 11).

Die Heparingruppen unterschieden sich in der maximalen Aggregation und dem maximalen Gradienten nicht maßgeblich voneinander. Es konnte jedoch eine Auswirkung der Heparindosierung auf die von Zeitpunkt 2 nach Zeitpunkt 5 absinkenden Werte der maximalen Aggregation ($P = 0,0474$) bei der Bolusgruppe 2 mit der höheren Dosierung von 200 I.E./Heparin/kg beobachtet werden. Ein Einfluß auf die mit abnehmender Induktorkonzentration sinkenden Werte bestand nicht. Die Gruppenzugehörigkeit und somit die Heparindosierung zeigte keine Korrelation zu den sinkenden Werten des maximalen Gradienten im Verlauf des Versuches oder mit abnehmender ADP-Konzentration (Anhang Tabelle 12).

ED₅₀

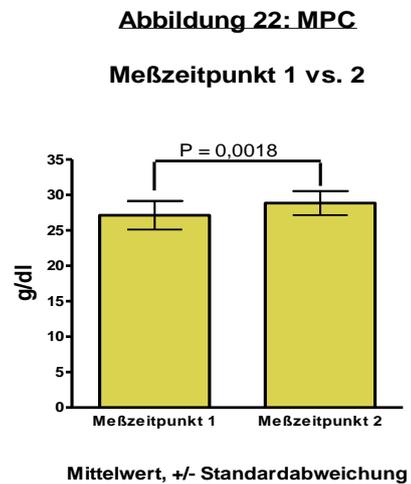
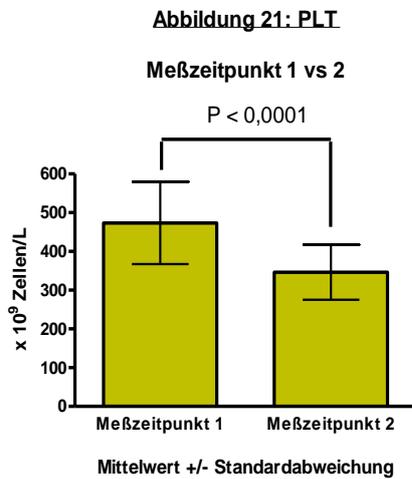
Im Gegensatz zu der Aggregometrie mit dem Induktor Kollagen unterschied sich die effektive Dosis der Induktorkonzentration bei der 50% der maximalen Aggregation erreicht wurden mit dem Induktor ADP nicht entscheidend zwischen den verschiedenen Meßzeitpunkten (Abbildung 20; Anhang Tabelle 16).



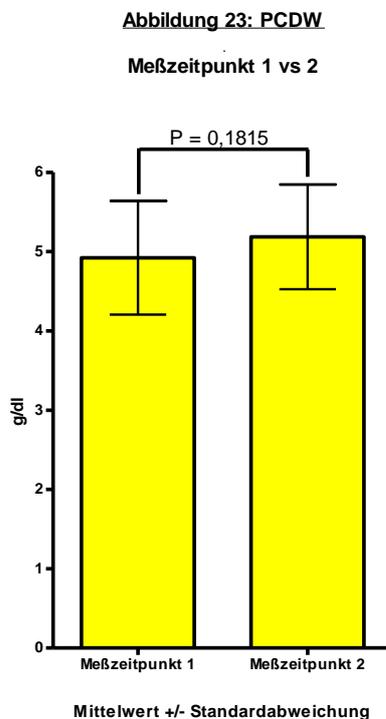
Der in Abbildung 20 sichtbare Abfall der ED₅₀ von Meßzeitpunkt 1 nach Meßzeitpunkt 2 war nicht signifikant ($P = 0,0707$).

ADVIA 120™

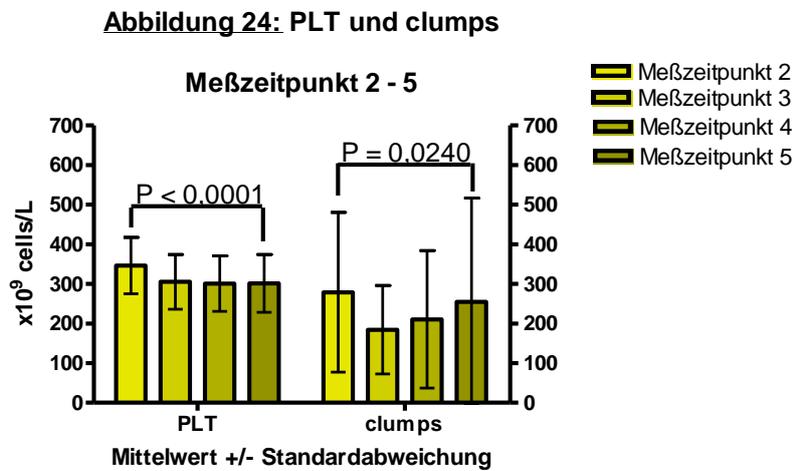
Von Meßzeitpunkte 1 nach 2 sank die Anzahl der Thrombozyten erheblich. Der MPC als Maß für die Granularität der Thrombozyten nahm im Vergleich zu (Abbildung 21 und 22).



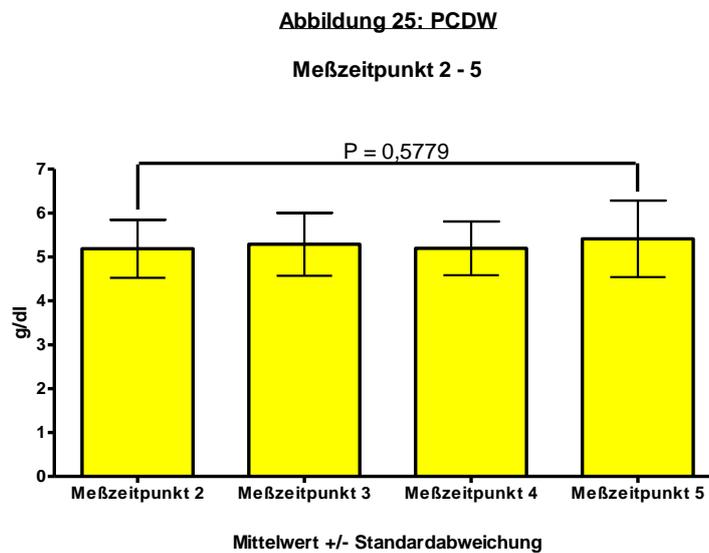
Die Anzahl der Thrombozytenaggregate (P = 0,2432) und der PCDW (P = 0,1815) änderten sich nicht signifikant (Abbildung 23; Anhang Tabelle 17).



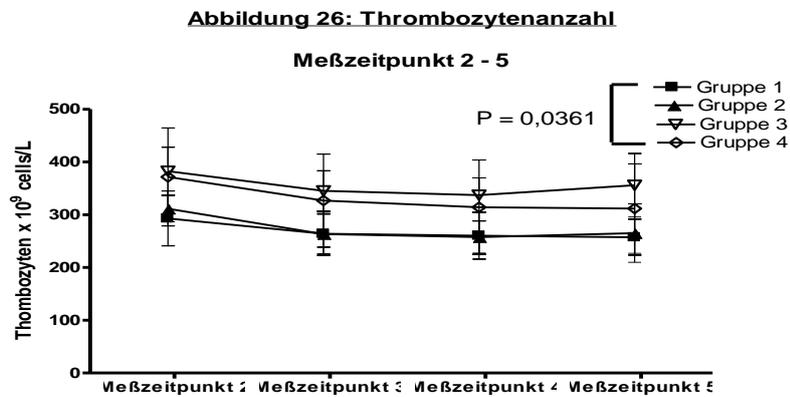
Im Verlauf des Eingriffes sank die Anzahl der Thrombozyten und der Aggregate eindeutig von Meßzeitpunkt 2 nach Meßzeitpunkt 5 (Abbildung 24).



Im Vergleich der Meßzeitpunkte 2-5 änderte sich die Granularität der Thrombozyten sowie der PCDW nicht signifikant (Anhang Tabelle 18).



Die Thrombozytenzahl unterschied sich erkennbar zwischen den Heparin-Gruppen mit niedrigeren Werten der beiden Bolusgruppen 1 und 2 (Abbildung 24).



Die Heparindosierung hatte keinen Einfluß auf die Anzahl der Thrombozytenaggregate oder den MPC als Maß der Aktivierung. Ebenfalls ergab sich keine Korrelation zwischen der Dosis des Heparins und den verschiedenen Meßzeitpunkten (Anhang Tabelle 19).

6. Schlußfolgerung

Thrombozytenaggregation

Die Werte der maximalen Aggregation, des maximalen Gradienten der Aggregation und der „shape change“ waren stark abhängig von der Dosis des zugesetzten Induktors.

Zum Meßzeitpunkt 2 konnten mit beiden Agonisten die höchsten Aggregationswerte beobachtet werden, diese sanken im weiteren Verlauf des Versuches ab.

ADVIA 120TM

Die Anzahl der Thrombozyten zeigte einen deutlichen Abfall zum Meßzeitpunkt 2, im Folgenden sank die Anzahl der Blutplättchen und Aggregate weiter ab.

7. Diskussion

Bei Auswertung der Messergebnisse müssen tierartsspezifische sowie induktorbedingte Besonderheiten ebenso wie der Einfluß der Heparinisierung berücksichtigt werden.

Thrombozytenaggregation

Die Meßwerte zeigten eine starke Abhängigkeit von der Dosis des zugesetzten Induktors.

Dieser in der Humanmedizin (23, 26) bekannte Effekt wurde in verschiedenen Untersuchungen für die Spezies Hund (28, 36), Schwein (30), Meerschwein (28), Ratte (28, 36) und Kaninchen (28, 36) bestätigt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen folglich eine Übereinstimmung mit der Literatur.

Dies ermöglicht durch die Erstellung von Dosisabhängigkeitskurven und Bestimmung der ED₅₀ eine Auswertung in Bezug auf eine gesteigerte bzw. verminderte Aggregationsneigung und im Hinblick auf individuelle oder speziesspezifische Unterschiede der Thrombozytenaktivierung (23, 26, 28, 36).

Die Relation zwischen Induktorkonzentration und dem Ausmaß der Aggregation variiert je nach Reagenz. Häufig werden Kollagen (21-23, 26, 28, 37-42) und ADP (21-23, 26, 28, 30, 36-40, 42-44) eingesetzt, seltener Arachidonsäure (22, 26, 39, 40, 42), Adrenalin (21, 23, 26, 37, 38, 42) oder plättchenaktivierender Faktor (PAF) (28, 30). Bei Auswahl des Induktors sind tierartsspezifische Unterschiede zu beachten. Die Thrombozyten des Schweins zeigen eine schlechte Ansprechbarkeit auf Arachidonsäure, Adrenalin (42) und PAF (30).

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie die Agonisten ADP und Kollagen verwendet. Sie aktivieren durch Bindung an Rezeptoren der Zellmembran über Botenstoffe die Aggregation der Thrombozyten und Sekretion der Granula. Die daran beteiligten Stoffwechselwege wurden an humanen Thrombozyten, aber auch an Blutplättchen anderer Spezies (Nerz, Rind, Maus) untersucht (11, 17, 26).

Die Bindung von ADP an den Rezeptor führt zu einer G-Protein vermittelten Aktivierung der Phospholipase C. Diese spaltet Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) zu Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). Durch die Botenstoffe kommt es zum Anstieg der Kalziumkonzentration durch ligandenaktivierte Kanäle im endoplasmatischen Retikulum (IP₃) und zur Phosphorylierung von Sekretionsproteinen durch die Proteinkinase C (DAG). Der Exozytose der Granula folgt die Aktivierung weiterer Thrombozyten (11, 17, 26).

Kollagen aktiviert in niedriger Konzentration den Arachidonat-Metabolismus, es kommt zur Bildung von Thromboxan A₂. Dieses hemmt die Adenylatzyklase und vermittelt durch die Abnahme der cAMP-Konzentration die Aggregation. Bei hohen Kollagenkonzentrationen kommt es zur direkten Aktivierung der Thrombozyten über Glykoproteinrezeptoren (11, 17, 26).

In der vorliegenden Arbeit war die Dosisabhängigkeit der Meßwerte mit dem Induktor Kollagen deutlicher ausgeprägt als mit dem Aktivator ADP. Der Bezug zwischen der Kollagenkonzentration und der Aktivierung der Thrombozyten läßt sich folglich für die eigene Untersuchung bestätigen.

Die Ergebnisse der Studie zeigten bei den niedrigen Verdünnungsstufen des Kollageninduktors einen vergleichsweise stärker ausgeprägten „shape change“. In einer Studie von Maurer-Spurej und Devine (2001) wurde nachgewiesen, daß der initiale Abfall der Lichttransmission auf die Bildung von Mikroaggregaten zurückzuführen ist und nicht auf den „shape change“ der Thrombozyten wie lange angenommen wurde (44).

Eine hohe Kollagenkonzentration führt zur Aktivierung vieler Blutplättchen und Entstehung größerer Aggregate. Folglich ist die Bildung von Mikroaggregaten bei niedrigen Konzentrationen vermehrt. Dies bestätigen auch die eigenen Ergebnisse.

Im Vergleich der ersten beiden Meßzeitpunkte konnte keine verstärkte Formierung von Mikroaggregaten nach dem Legen der Schleusen beobachtet werden.

Die Aggregationswerte zeigten zwar mit dem Kollageninduktor einen Anstieg von Zeitpunkt 1 nach Zeitpunkt 2, es ergab sich allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied. Bei Betrachtung der ED₅₀ lag diese zum Meßzeitpunkt 2 höher, wenn auch nicht signifikant.

Die Versuchsreihen mit dem Induktor ADP zeigten einen bezeichnenden Anstieg der Werte der maximalen Aggregation und des maximalen Gradienten von Meßzeitpunkt 1 nach Meßzeitpunkt 2. Obwohl dieser Effekt statistisch nicht signifikant war, konnte auch ein Absinken der ED₅₀ zum Meßzeitpunkt 2 beobachtet werden.

Die Untersuchungen von Hayes et al (2003) konnten nachweisen, daß das thromboembolische Risiko nach Karotisendarterektomie in Relation zur Sensitivität der Thrombozyten auf physiologische Agonisten steht. Vor dem Eingriff wurde die Aggregation mit Kollagen in den Konzentration 10, 20 und 50 µg/ml und ADP in den Konzentrationen 0,5, 1, 2 und 4 µmol/ml gemessen. Die Patienten mit einem hohen thromboembolischen Risiko, (>25 Emboli in einem Zeitraum von 3h post OP in der mittleren Zerebralarterie, gemessen mittels transcranialem Doppler) zeigten eine höhere Aggregationsneigung mit beiden Aktivatoren. Die Ansprechbarkeit der Blutplättchen auf Kollagen wird durch von den δ-Granula sezerniertem ADP moduliert. Demzufolge wurde eine erhöhte Sensibilität gegenüber ADP vermutet (39).

Dies deckt sich mit den eigenen Ergebnissen. Der Anstieg der Aggregationswerte war mit dem Induktor ADP wesentlich stärker ausgeprägt, so daß sich ein statistisch signifikanter Unterschied ergab.

Eine Korrelation zwischen dem Auftreten thrombotischer Vorfälle und einer erhöhten Aggregationsneigung konnte auch in einer Arbeit von Poston et al (2005) nachgewiesen werden. Bei Bypass-Operationen ohne Herzlungenmaschine wurde mit Hilfe der Vollblutaggregometrie (Impedanzmethode, Kollagen als Induktor: 1 und 5 µg/ml) die Thrombozytenaktivierung untersucht und zum Auftreten von perioperativen und innerhalb von 24h post OP beobachteten Blutungen oder Thrombosen des Bypasses in Bezug gesetzt. Der Blutverlust wurde anhand des mittels Thoraxdrainage gewonnenen bzw. intraoperativ

abgesaugten Volumens und dem Hämatokrit quantifiziert. Das Auftreten einer Thrombus bedingten Stenose des Bypasses wurde durch eine CT gestützte Angiographie ermittelt (41).

Es kann also für die vorliegende Arbeit gefolgert werden, daß die Reaktivität der Thrombozyten und somit das thromboembolische Risiko zum Meßzeitpunkt 2 höher war als zum Meßzeitpunkt 1.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen sanken die Werte der maximalen Aggregation und des maximalen Gradienten der Aggregation mit beiden Induktoren von Zeitpunkt 2 nach Zeitpunkt 5 ab.

Mit Kollagen als Aktivator zeigte sich der Abfall umso stärker, je niedriger dessen Konzentration war. Hier ließ sich bei Auswertung der ED_{50} ein deutlicher Anstieg mit dem Fortgang des Versuches feststellen.

Obleich auch die Messungen mit dem Induktor ADP sinkende Aggregationswerte aufwiesen, unterschied sich die ED_{50} nicht statistisch entscheidend zwischen den verschiedenen Meßzeitpunkten.

Diese abnehmende Aggregationsneigung wurde von einer Arbeit von Boldt et al (1994) zum Einfluß unterschiedlicher Antikoagulationsprotokolle auf die Thrombozytenfunktion im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe bestätigt. Im Weitergang der Operation sanken die Aggregationswerte deutlich ab (38).

Für die abnehmende Aggregationsneigung der Thrombozyten ist sicherlich auch die Heparinisierung der Versuchstiere verantwortlich.

Es ist bekannt, daß Heparinfragmente an die Blutplättchen binden und somit die Funktion beeinträchtigen. So wird die durch Kollagen ausgelöste Aggregation gehemmt (38).

Dies stützt die eigene Beobachtung. Im Vergleich war mit dem Induktor Kollagen eine deutlichere Abnahme der Werte und ein ausgeprägter Anstieg der ED_{50} zu erkennen.

Eine Studie von Laga und Mitarbeitern (2005) konnte ebenso eine verminderte Aggregationsneigung als Folge der Heparinisierung beobachten. Als Induktoren kamen ADP, Arachidonsäure und Kollagen zum Einsatz (45).

Zum gleichen Schluß kommt auch eine Studie von Muriithi et al (2000). Eine in vivo Heparinisierung hemmt im Gegensatz zur Zugabe von Heparin in vitro, die Thrombozytenaggregation. Daher wird vermutet, daß endotheliale Proteine im Plasma eine Rolle spielen. Mit Hilfe der Impedanzmethode (Kollagen 0,6 µg/ml) wurde deshalb die Aggregation von Blutplättchen einer gesunden Kontrollgruppe in plättchenarmem Plasma der heparinisierten Patienten gemessen. Es konnte bestätigt werden, daß die verminderte Funktion der Thrombozyten sekundär heparinbedingt war. Dieses Phänomen trat dosisunabhängig ab einer Dosierung von ≥ 30 I.E. Heparin/kg auf. Bei mehrmaliger Messung der Proben nach einer Lagerungszeit von 1h und 2h verstärkte sich der Effekt (46).

Somit kann gefolgert werden, daß die Abnahme der Aggregationsneigung sicherlich durch die Heparinapplikation bedingt ist. Dies bestätigt auch der zunehmende Abfall der Werte im Verlauf des Versuches.

Die verschiedenen Heparingruppen untereinander zeigten keinen signifikanten Unterschied. Allerdings ergab sich eine Korrelation zwischen der Dosis des Antikoagulanz und der Induktorkonzentration: die Tiere der Gruppe 2 mit einem Bolus von 200 I.E./kg. zeigten einen besonders deutlichen Abfall der Werte bei beiden Induktoren in den unteren Verdünnungsstufen.

Dies konnte auch in einer humanmedizinischen Studie von Boldt und Mitarbeitern (1994) beobachtet werden. Die Aggregation wurde mit 4 µg/ml Kollagen bzw. 2 µmol/ml ADP induziert. Die beiden Gruppen mit hohen Heparinkonzentrationen (Bolus: 300 I.E./kg, anschließend DTI mit 10000 I.E./h; Bolus: 600 I.E./kg) zeigten einen deutlicheren Abfall der Aggregationswerte als diejenigen mit niedrigeren Konzentrationen (38).

ADVIA 120™

Es wurde ein signifikanter Abfall der Anzahl an Thrombozyten von Zeitpunkt 1 nach Zeitpunkt 2 festgestellt. Dies korreliert mit dem Blutverlust bedingt durch die Punktion der Gefäße, dem Einbringen der Schleusen und der Ligatur der *Arteria carotis communis*.

Die mittlere Konzentration der Granularität der Thrombozyten war zum Zeitpunkt 2 deutlich höher als zum Meßzeitpunkt 1. Der MPC als Maß der Thrombozytenaktivierung korreliert sehr gut mit der Expression des α -Granula Proteins CD62P (P-Selektin) auf der Zelloberfläche gemessen mittels Durchflußzytometrie (47-51). Der höhere MPC-Wert zum Zeitpunkt 2 könnte für einen Verbrauch der Thrombozyten, vermutlich durch die Manipulation und den Blutverlust sprechen, da weniger aktivierte, degranulierte Blutplättchen vorhanden waren.

Im weiteren Verlauf sank die Anzahl der Thrombozyten und der Aggregate weiter ab.

Im Vergleich der Heparingruppen lag die Anzahl der Thrombozyten bei den zwei Gruppen mit Heparindauertropfinfusion im Vergleich zu den anderen beiden Kollektiven durchgehend wesentlich höher. Mit Fortschreiten der Untersuchungen wurde der Modus operandi immer mehr verfeinert. Der Blutverlust sowie die manipulationsbedingte Aktivierung der Thrombozyten mit folgendem Verbrauch konnte so vermindert werden. Dies könnte eine Ursache für die niedrigeren Thrombozytenzahlen der ersten beiden Gruppen darstellen.

8. Zusammenfassung

Arteriovenöse Malformationen (AVM) sind Mißbildungen mit Verbindung zwischen Arterien und Venen ohne zwischengeschaltetes Kapillarbett. Die Embolisation soll das Risiko einer nachfolgenden Operation vermindern. Das *rete mirabilis* des Schweins ähnelt der plexiformen AVM des Menschen, aus diesem Grund wird es als Modelltier zur Forschung und Ausbildung eingesetzt. Ein über die rechte *Arteria femoralis* eingebrachter Katheter, in der rechten *Arteria carotis communis* platziert, stellt dabei die arterielle Seite dar. Die venöse Drainage bildet die linke *Arteria carotis communis*, die distal des Zugang ligiert wird. Der Katheter wird in die linke *Arteria pharyngealis ascendens* bis über die Abzweigungen der *Arteria occipitalis*, *pharyngealis ascendens ramus muscularis* und *carotis externa* vorgeschoben. Der Druckgradient kommt über die Öffnung zur Atmosphäre zustande.

Das Risiko thromboembolischer Komplikationen macht eine Heparinisierung erforderlich, diese erhöht jedoch die Blutungsneigung. Mit der Thrombozytenaggregation nach Born und dem Hämatologiegerät ADVIA 120™ wurden die Aggregationsneigung und der Aktivierungsgrad der Thrombozyten untersucht, um Rückschlüsse auf das thromboembolische Risiko zu ziehen. Die Blutproben wurden vor Punktion der Gefäße, nach Punktion der Gefäße und Einbringen der Schleusen, 20 Minuten nach Heparinapplikation, nach Platzierung der Mikrokatheter im *rete mirabilis* sowie nach der Embolisation gewonnen. Bei Betrachtung der Thrombozytenaggregation fällt eine erhöhte Reaktivität nach Punktion der Gefäße auf. Dieser Schritt birgt das größte Risiko thromboembolischer Komplikationen. Die durch die Manipulation aktivierten Blutplättchen wurden, wie der MPC vermuten läßt verbraucht, die verbliebenen zeigten mit der Aggregation nach Born eine vergleichsweise erhöhte Aggregationsneigung. Im Folgenden wurden die Thrombozyten durch die Heparinisierung gehemmt. In Bezug auf die Induktoren zeigten die Aggregationskurven mit Kollagen eine deutlichere Dosisabhängigkeit. Die Aggregationsneigung der Thrombozyten betreffend waren die Unterschiede mit ADP als Induktor prägnanter.

9. Summary

Arteriovenous malformations (AVM) form anastomosis between arteries and veins without intermediary capillaries. Embolisation ought to minimize the risk of consecutive operation. The *rete mirabilis* of the swine resembles the human plexiform AVM and is therefore used as a model in research and training. A catheter inserted via the right *Arteria femoralis* and placed in the right *Arteria carotis communis* represents the arterial side. The venous drain is provided by the left *Arteria carotis communis*, ligated distal of the aortic arch. The catheter is fed forward into the left *Arteria pharyngealis ascendens* beyond the branching of the *Arteria occipitalis*, *pharyngealis ascendens ramus muscularis* and *carotis externa*. The pressure gradient is built by the opening to the atmosphere.

The risk of thromboembolic complications requires heparinization, raising bleeding tendency. Platelet aggregation according to Born and the hematologic analyzer ADVIA 120™ were used to study aggregation tendency and platelet activation to assess the risk of thromboembolic complications. Samples were taken previous to vascular puncture, following vascular puncture and insertion of locks, 20 minutes after application of heparin, following placement of microcatheters in the *rete mirabilis* and after embolisation was performed.

Considering platelet aggregation reactivity of thrombocytes was increased after puncture of the vessels. Hence this time point has the highest risk of thromboembolic complications. Platelets activated by manipulation were dissipated according to the MPC; the remaining ones showed comparatively an augmented reactivity according to Born aggregation. Further on activity of the thrombocytes was constrained by heparinization. Regarding the inducers, aggregation charts showed a stronger dose-related dependence with collagen as an activator. The differences in the affinity of platelets to aggregate were more concise with ADP as inducer.

10. Anhang

Thrombozytenaggregation

Kollagen: Thrombozytenaggregation Meßzeitpunkt 1 vs. 2				
Faktor		maximale Aggregation	maximaler Gradient	shape change
Induktorkonzentration	P	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Meßzeitpunkt	P	0,6805	0,4964	0,5238
Meßzeitpunkt x Induktorkonzentration	P	0,6282	0,9392	0,4230

Tabelle 3: Kollagen: Thrombozytenaggregation Meßzeitpunkt 1 vs. 2

Kollagen: Thrombozytenaggregation Meßzeitpunkt 2 - 5			
Faktor		maximale Aggregation	maximaler Gradient
Induktorkonzentration	P	< 0,0001	< 0,0001
Meßzeitpunkt	P	< 0,0001	< 0,0001
Meßzeitpunkt x Induktorkonzentration	P	< 0,0001	0,0010

Tabelle 4: Kollagen: Thrombozytenaggregation Meßzeitpunkt 2 - 5

Kollagen: Heparingruppen Meßzeitpunkt 2 – 5			
Faktor		maximale Aggregation	maximaler Gradient
Heparingruppe	P	0,3987	0,6356
Heparingruppe x Meßzeitpunkt	P	0,4871	0,3998
Heparingruppe x Induktorkonzentration	P	0,0105	0,0308
Heparingruppe x Meßzeitpunkt x Induktorkonzentration	P	0,7452	0,9891

Tabelle 5: Kollagen: Heparingruppen Meßzeitpunkt 2-5

Kollagen: maximale Aggregation (%)						
Induktor-konzentration		Meß-zeitpunkt 1	Meß-zeitpunkt 2	Meß-zeitpunkt 3	Meß-zeitpunkt 4	Meß-zeitpunkt 5
2,5 µg/ml	\bar{x}	53,589	60,518	51,576	54,327	47,725
	SD	10,152	11,831	18,299	18,156	16,372
1,25 µg/ml	\bar{x}	45,763	51,542	43,709	43,277	31,850
	SD	11,584	13,319	18,857	16,903	19,737
0,625 µg/ml	\bar{x}	21,039	25,289	17,055	16,420	6,2750
	SD	15,253	18,327	17,269	15,927	10,088
0,31 µg/ml	\bar{x}	5,2789	5,1864	2,7937	2,3017	1,9722
	SD	9,8560	11,410	3,5808	3,6803	3,7512

\bar{x} Mittelwert; SD Standardabweichung

Tabelle 6: Kollagen: maximale Aggregation (%)

Kollagen: maximaler Gradient der Aggregation (%/min)						
Induktor-konzentration		Meß-zeitpunkt 1	Meß-zeitpunkt 2	Meß-zeitpunkt 3	Meß-zeitpunkt 4	Meß-zeitpunkt 5
2,5 µg/ml	\bar{x}	61,769	69,075	62,207	64,149	56,002
	SD	11,979	14,842	19,965	19,663	17,025
1,25 µg/ml	\bar{x}	54,601	60,208	53,751	53,013	39,040
	SD	14,358	15,587	20,622	19,188	22,080
0,625 µg/ml	\bar{x}	27,508	30,117	21,505	20,685	7,1161
	SD	17,633	20,287	19,390	17,810	10,915
0,31 µg/ml	\bar{x}	6,4095	6,7603	3,5344	2,9420	1,8304
	SD	11,599	12,702	4,6692	4,6098	3,0687
\bar{x} Mittelwert; SD Standardabweichung						

Tabelle 7: Kollagen: maximaler Gradient der Aggregation (%/min)

Kollagen: „shape change“ (%sec)						
Induktor-konzentration		Meß-zeitpunkt 1	Meß-zeitpunkt 2	Meß-zeitpunkt 3	Meß-zeitpunkt 4	Meß-zeitpunkt 5
2,5 µg/ml	\bar{x}	8,1992	7,0364	8,9232	8,0636	7,9950
	SD	9,7218	7,4834	11,314	8,4453	11,333
1,25 µg/ml	\bar{x}	18,898	18,095	16,949	17,479	13,687
	SD	29,494	19,715	19,702	19,755	9,0701
0,625 µg/ml	\bar{x}	22,331	31,547	23,906	25,180	15,196
	SD	23,111	31,275	28,198	32,015	16,889
0,31 µg/ml	\bar{x}	19,360	13,698	31,683	43,735	60,400
	SD	26,272	12,586	30,067	30,092	0,000
\bar{x} Mittelwert; SD Standardabweichung						

Tabelle 8: Kollagen: „shape change“ (%/sec)

Kollagen: ED₅₀ (µg/ml)					
	Meß-zeitpunkt 1	Meß-zeitpunkt 2	Meß-zeitpunkt 3	Meß-zeitpunkt 4	Meß-zeitpunkt 5
\bar{x}	0,8492	0,9064	1,071	1,108	1,322
SD	0,2636	0,2836	0,3280	0,3276	0,3333
\bar{x} Mittelwert; SD Standardabweichung					

Tabelle 9: Kollagen: ED₅₀ (µg/ml)

ADP: Thrombozytenaggregation Meßzeitpunkt 1 vs. 2				
Faktor		maximale Aggregation	maximaler Gradient	shape change
Induktorkonzentration	P	0,0007	0,0028	0,3829
Meßzeitpunkt	P	0,0010	0,0003	0,1167
Meßzeitpunkt x Induktorkonzentration	P	0,6120	0,6048	0,9070

Tabelle 10: ADP: Thrombozytenaggregation Meßzeitpunkt 1 vs 2

ADP: Thrombozytenaggregation Meßzeitpunkt 2 – 5			
Faktor		maximale Aggregation	maximaler Gradient
Induktorkonzentration	P	< 0,0001	0,0002
Meßzeitpunkt	P	< 0,0001	< 0,0001
Meßzeitpunkt x Induktorkonzentration	P	0,3933	0,1565

Tabelle 11: ADP: Thrombozytenaggregation Meßzeitpunkt 2-5

ADP: Heparingruppen Meßzeitpunkt 2 - 5			
Faktor		maximale Aggregation	maximaler Gradient
Heparingruppe	P	0,1719	0,2058
Heparingruppe x Meßzeitpunkt	P	0,0474	0,0810
Heparingruppe x Induktorkonzentration	P	0,3767	0,2889
Heparingruppe x Meßzeitpunkt x Induktorkonzentration	P	0,9195	0,8574

Tabelle 12: ADP: Heparingruppen Meßzeitpunkt 2-5

ADP: maximale Aggregation (%)						
Induktor-konzentration		Meß-zeitpunkt 1	Meß-zeitpunkt 2	Meß-zeitpunkt 3	Meß-zeitpunkt 4	Meß-zeitpunkt 5
20 µmol/ml	\bar{x}	51,005	56,939	53,331	55,271	50,781
	SD	9,6264	11,327	18,279	15,970	13,947
10 µmol/ml	\bar{x}	54,068	58,021	53,276	54,787	49,993
	SD	10,290	9,2378	15,753	15,731	18,624
5 µmol/ml	\bar{x}	46,026	53,627	48,979	48,818	42,131
	SD	9,1303	9,7981	15,529	15,148	13,543
2,5 µmol/ml	\bar{x}	47,626	55,391	46,482	46,357	43,265
	SD	7,7760	11,271	19,052	16,522	17,932

\bar{x} Mittelwert; SD Standardabweichung

Tabelle 13: ADP: maximale Aggregation (%)

ADP: maximaler Gradient der Aggregation (%/min)						
Induktor- konzentration		Meß- zeitpunkt 1	Meß- zeitpunkt 2	Meß- zeitpunkt 3	Meß- zeitpunkt 4	Meß- zeitpunkt 5
20 µmol/ml	\bar{x}	60,494	68,948	67,865	68,592	65,238
	SD	12,517	12,641	21,056	15,864	13,103
10 µmol/ml	\bar{x}	67,846	73,606	72,354	73,153	62,638
	SD	14,135	13,359	16,917	17,758	21,931
5 µmol/ml	\bar{x}	58,787	69,528	62,845	62,480	55,942
	SD	14,018	13,091	17,605	16,984	16,563
2,5 µmol/ml	\bar{x}	64,078	74,995	64,699	64,633	59,589
	SD	11,563	13,963	25,406	21,573	23,786
\bar{x} Mittelwert; SD Standardabweichung						

Tabelle 14: maximaler Gradient der Aggregation (%/min)

ADP: „shape change“ (%sec)						
Induktor- konzentration		Meß- zeitpunkt 1	Meß- zeitpunkt 2	Meß- zeitpunkt 3	Meß- zeitpunkt 4	Meß- zeitpunkt 5
20 µmol/ml	\bar{x}	3,5967	2,8912	3,2989	3,5150	2,3900
	SD	3,3265	2,2028	2,8236	3,5152	2,4128
10 µmol/ml	\bar{x}	3,0586	3,8300	2,2344	2,6664	0,59000
	SD	3,1920	4,6665	1,9979	2,4426	0,19079
5 µmol/ml	\bar{x}	7,9467	2,6780	2,4767	2,7744	1,9960
	SD	15,173	1,8587	2,0617	2,3548	1,1876
2,5 µmol/ml	\bar{x}	9,5975	3,2080	2,5350	2,1960	2,4900
	SD	14,635	2,1153	1,7737	1,6106	0,31113
\bar{x} Mittelwert; SD Standardabweichung						

Tabelle 15: ADP: „shape change“ (%/sec)

ADP: ED₅₀ (µmol/ml)					
	Meß- zeitpunkt 1	Meß- zeitpunkt 2	Meß- zeitpunkt 3	Meß- zeitpunkt 4	Meß- zeitpunkt 5
\bar{x}	4,203	3,171	4,866	4,179	3,886
SD	1,018	1,024	2,425	1,595	0,8873
\bar{x} Mittelwert; SD Standardabweichung					

Tabelle 16: ADP: ED₅₀ (µmol/l)

ADVIA 120™

ADVIA 120™ Meßzeitpunkt 1 vs. 2				
	PCDW (g/dl)	Thrombozyten (x10 ⁹ /L)	Aggregate (x10 ⁹ /L)	MPC (g/dl)
P	0,1815	< 0,0001	0,2432	0,0018
\bar{x}	- 0,2642	94,2632	- 0,0738	- 1,1579
SD	0,1951	71,6518	0,2566	1,1758
PCDW: platelet component distribution width; MPC: mean platelet component concentration; \bar{x} Mittelwert; SD Standardabweichung				

Tabelle 17: Meßzeitpunkt 1 vs 2

ADVIA 120™ Meßzeitpunkt 2 - 5				
	PCDW (g/dl)	Thrombozyten (x10 ⁹ /L)	Aggregate (x10 ⁹ /L)	MPC (g/dl)
P	0,5779	< 0,0001	0,0240	0,4325
PCDW: platelet component distribution width; MPC: mean platelet component concentration				

Tabelle 18: Meßzeitpunkt 2-5

ADVIA 120™ Heparingsgruppen Meßzeitpunkt 2 - 5					
		PCDW (g/dl)	Thrombozyten (x 10 ⁹ /L)	Aggregate (x 10 ⁹ /L)	MPC (g/dl)
Heparingsgruppe	P	0,3411	0,0361	0,8079	0,1390
Meßzeitpunkt x Heparingsgruppe	P	0,5226	0,9077	0,0324	0,2655
PCDW: platelet component distribution width; MPC: mean platelet component concentration					

Tabelle 19: Heparingsgruppen Meßzeitpunkt 2-5

11. Abkürzungsverzeichnis

ACT: activated clotting time

ADP: Adenosindiphosphat

AMP: Adenosinmonophosphat

ATP: Adenosintriphosphat

AVM: arteriovenöse Malformation

bzw.: beziehungsweise

clumps: Anzahl Thrombozytenaggregate

CT: Computertomographie

DTI : Dauertropfinfusion

ED₅₀ : effektive Dosis 50%

GP: Glykoproteinrezeptor

h: Stunde

i.a.: intraarteriell

I. E.: internationale Einheit

i.v.: intravenös

LZ: Lagerungszeit

max. Agg.: maximale Aggregation

max. Grad: maximaler Gradient der Aggregation

min: Minuten

MPC: mean platelet component concentration

PAF: plättchenaktivierender Faktor

PAI-1: Plasminogenaktivator-Inhibitor-1

PAP: plättchenarmes Plasma

PCDW: platelet component distribution width

PLT: Thrombozytenzahl

PRP: plättchenreiches Plasma

RTG: Resonanzthrombelastographie

sc: shape change

sec.: Sekunden

TEG: Thrombelastographie

TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor

t-PA: tissue-type plasminogen activator

u-PA: urokinase-type plasminogen activator

vWF: von Willebrand Faktor

12. Geräte- und Firmenverzeichnis

ADP: Chrono-Log Corporation, Kordia, Leiden, Niederlande

ADVIA 120™ : Siemens, Fernwald, Deutschland

APACT 4: Labitec, Ahrensburg, Deutschland

Atropin: B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Dräger Tiberius 19: Drägerwerk AG & Co KG, Lübeck, Deutschland

Fentanyl: Fentanyl® Janssen, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland

Glyceroltrinitrat: Nitrolingual® G.Pohl-Boskamp GmbH&CoKG, Hohenlockstedt, Deutschland

Heparin: Heparin ratiopharm®, Ulm, Deutschland

Infusionslösungen / -bestecke: B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Isofluran: Isofluran CP, CP Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland

Katheter: Cordis® Medizinische Apparate GmbH, Johnson & Johnson company, Miami, USA

Kollagen: mölab, Hilden, Deutschland

Pancuroniumbromid: Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland

Probengefäße: Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Schleusen: Cordis® Medizinische Apparate GmbH, Johnson&Johnson company, Miami, USA

Suprarenin: Suprarenin®, Hoechst, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt

Venenverweilkanülen: Vasofix® Braunüle®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Zentrifugen:

Rotanta/P: Hettich, Tuttlingen, Deutschland; mini spin plus: Eppendorf, Hamburg, Deutschland

LITERATUR

1. Anonymous **Leitlinien zur Behandlung zerebraler Arteriovenöser Malformationen** . Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neuroradiologie 2003;
2. Anonymous **Endovaskuläre Behandlung zerebraler AV-Malformationen.** Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neuroradiologie 2004;
3. Gobin Y.P., Murayama Y., Milanese K., Chow K., Gonzalez N.R., Duckwiler G.R., Vinuela F. **Head and neck hypervascular lesions: Embolization with ethylene vinyl alcohol copolymer - laboratory evaluation in swine and clinical evaluation in humans.** Radiology 2001; 221: 309-317.
4. Siekmann R, Wakhloo AK, Lieber BB, Gounis M, Divani AA, Hopkins LN. **Modification of a previously described Arteriovenous Malformation Model in the swine: Endovascular and combined surgical/Endovascular construction and Haemodynamics** . American Journal of Neuroradiology 2000; 21: 1722-1725.
5. Massoud T.F., Ji C., Vinuela F., Turjman F., Guglielmi G., Duckwiler G.R., Gobin Y.P. **Laboratory simulations and training in endovascular embolotherapy with a swine arteriovenous malformation model** . American Journal of Neuroradiology 1996; 17: 271-279.
6. Rosas AL. **Anesthesia for Interventional Neuroradiology.** The Internet Journal of Anesthesiology 1997; 1:
7. Kraft, Dürr. **Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.**1999;
8. Höhle P. **Zur Übertragbarkeit tierexperimenteller endovaskulärer Studien: Unterschiede der Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systeme bei häufig verwendeten Tierspezies im Vergleich zum Menschen.**2000;
9. Anonymous **Physiologie der Haustiere.**2005;
10. Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke. **Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.**2005;
11. Löffler G., Petrides P.E. **Biochemie und Pathobiochemie.**1998;
12. Pötzsch B., Madlener K. **Gerinnungskonsil.**2002;
13. Schmidt, Thews. **Physiologie des Menschen.**1997;
14. Mischke R. **Praktische Hämatologie bei Hund und Katze.**2003;
15. Mosimann W., Kohler T. **Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere.**1990;
16. Pelagalli A., Belisario M.A., Tafuri S., Lombardi P., d'Angelo D., Avallone L., Staiano N. **Adhesive Properties of platelets from different animal species.** Journal of comparative pathology 2003; 128: 127-131.

17. Reed G.L., Fitzgerald M.L., Polgár J. **Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insight into the "secret life of thrombocytes.** Blood 2000; 96: 3334-3342.
18. Jahan R., Murayama Y., Gobin P.Y., Duckwiler G.R., Vinters H.V., Vinuela F. **Embolisation of Arteriovenous Malformations with Onyx: Clinicopathological Experience in 23 Patients.** Neurosurgery 2001; 48: 984-997.
19. Chuhan J., Zhongxue W., Zhongcheng W., Youxiang L., Weiguo Q., Ke Y. **A Nonadhesive Liquid Embolic Material; Cellulose Acetate Polymer (CAP) for Embolization of Cerebral Arteriovenous Malformations A experimental study.** Chinese Medical Journal 2001; 9: 79-88.
20. Kallmes D.F., McGraw J.K., Evans A.J., Cloft H.J., Mathis J.M., Hergenrother R., Jensen M.E., Dion J.E. **Effects of systemic heparinization on the thrombogenicity of hydrophilic and nonhydrophilic catheters in a swine model.** interventional Neuroradiology 1998; 40: 530-535.
21. Breddin H.K., Harder S. **Wertigkeit von Plättchenfunktionstests.** VASA 2003; 32: 123-129.
22. Müller M.R., Salat A., Pulaki S., Stangl P., Ergun E., Schreiner W., Losert U. WE. **Influence of Hematocrit and Platelet Count on Impedance and Reactivity of Whole Blood for Electrical Aggregometry.** Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 1995; 17-22.
23. Ozaki Y. **Measurement of Platelet Aggregation and attempts for standardization.** Sysmex Journal International 1998; 8: 15-22.
24. Reynolds L.A., Tansey E.M. **The recent history of platelets in thrombosis and other disorders.**2003; 23:
25. Born G.V.R. **Light on platelets.** Journal of Physiology 2005;
26. Budde U. **Diagnose von Funktionsstörungen der Thrombozyten mit Hilfe der Aggregometrie.** Journal of laboratory medicin 2002; 26: 564-571.
27. Reuter H.D., Schenne J. **Grundlagen und Praxis der Thrombozytenfunktionsdiagnostik.** 2000.
28. Kurata M., Ishizuka N., Matsuzawa M., Haruta K., Takeda K. **A comparative study of whole-blood platelet aggregation in laboratory animals: its species differences and comparison with turbidimetric method.** Comparative Biochemical Physiology 1995; 112: 359-365.
29. Sakariassen K.S., Hanson S.R., Cadroy Y. **Methods and models to evaluate shear-dependent and surface reactivity-dependent antithrombotic efficacy.** Thrombosis Research 2001; 104: 149-174.
30. Softeland E., Framstad T., Nordvik A., Bakken A.M., Punwani C., Morild I., Tor H., Thorsen T., Holmsen H. **Evaluation of a porcine model to study in vivo platelet activation.** Thrombosis Research 2006; 118: 341-352.

31. Metzler M.A. **Studie zur Bedeutung der In-vitro-Blutungszeitmessung mit dem PFA 100™ für die Vorhersage peri- und postoperativer Blutungskomplikationen in der Gynäkologie.** Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, 2001.
32. Mischke R., Keidel A. **präklinische Untersuchungen zur Anwendung des Plättchenfunktionsanalysegerätes PFA-100 mit der Kollagen/ADP-Messzelle beim Hund.** Deutsche tierärztliche Wochenschrift 2002; 109: 235-238.
33. Lehner J., Greve B., Cassens U. **Automatisierte hämatologische Analytik in kleinen, mittleren und großen Laboratorien sowie in der Transfusionsmedizin.** Journal of laboratory medicine 2008; 32: 78-91.
34. Püsch M. **Hämatologiesystem ADVIA 120, Softwareadaptation und Evaluation bei den Tierarten Schaf und Ziege.** Medizinische und Gerichtliche Veterinärklinik, Innere Medizin der Kleintiere und klinische Laboratoriumsdiagnostik und Klinik für Wiederkäuer und Schweine der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2002.
35. Heidt M.C., Siekmann R., Schneider M., Vogt P.R. **Interventionelle Untersuchungen am rete mirabile des Hausschweines: Entwicklung eines differenzierten Narkoseverfahrens zur Gewährleistung stabiler Herz-Kreislaufverhältnisse bei cerebralen Gefäßinterventionen.**
36. Jancinova V., Nosal R., Petrikova M. **Dose-response Aggregometry - Contribution to the precise platelet function evaluation.** Thrombosis Research 1992; 65: 1-11.
37. Beck K.-H. **Quality control of platelets during storage by the PFA-100: A comparison to platelet aggregation.** Transfusion and Apheresis science 2002; 27: 247-253.
38. Boldt J., Schindler E., Osmer C., Wittstock M., Stertmann W.A., Hempelmann G. **Influence of different anticoagulation regimes on platelet function during cardiac surgery.** British Journal of Anaesthesia 1994; 73: 639-644.
39. Hayes P.D., Box H., Tull S., Bell P.R.F., Goodall A., Naylor A.R. **patient's thromboembolic potential after carotid endarterectomy is related to the platelets sensitivity to adenosine diphosphat.** Journal of Vascular Surgery 2003; 38: 1226-1231.
40. Mani H., Luxembourg B., Kläffing C., Erbe M., Lindhoff-Last E. **Use of native or platelet count adjusted platelet rich plasma for platelet aggregation measurements.** Journal of clinical Pathology 2005; 58: 747-750.
41. Poston R., Gu J., Manchio J., Lee A., Brown J., Gammie J., White C., Griffith B.P. **Platelet function tests predict bleeding and thrombotic events after off-pump coronary bypass grafting.** European Journal of Cardio-thoracic Surgery 2005; 27: 584-591.
42. Zurbano M.J., Heras M., Rigol M., Roig E., Epelde F., Miranda F., Sanz G., Escolar G., Ordinas A. **Cocaine administration enhances platelet reactivity to subendothelial components: studies in a pig model.** European Journal of Clinical Investigation 1997; 27: 116-120.

43. Hézard N., Metz D., Nazeyrollas P., Droullé C., Potron G., Nguyen P. **PFA-100 and flow cytometry: can they challenge aggregometry to assess antiplatelet agents, other than GPIIb/IIIa blockers, in coronary angioplasty?** *Thrombosis Research* 2002; 108: 43-47.
44. Maurer-Spurej E., Devine D.V. **Platelet Aggregation is not initiated by platelet shape change.** *Laboratory Investigation* 2001; 81: 1517-1525.
45. Laga S., Bollen H., Arnout J., Holyaerts M., Meyns B. **Heparin influences human platelet behavior in cardiac surgery with or without cardiopulmonary bypass.** *Artificial Organs* 2005; 7: 541-546.
46. Muriithi E.W., Belcher P.R., Day S.P., Menys V.C., Wheatley D.J. **Heparin-induced platelet dysfunction and cardiopulmonary bypass.** *The Society of Thoracic Surgeons* 2000; 69: 1827-1832.
47. Ahnadi C.E., Chapman E.S., Lépine M., Okrongly D., Pujol-Moix N., Hernández A., Boughrassa F., Grant A.M. **Assessment of platelet activation in several different anticoagulants by the ADVIA 120 Hematology System, fluorescence flow cytometry, and electron microscopy.** *Thromb Haemost* 2003; 90: 940-948.
48. Brummitt D.R., Barker H.F., Pujol-Moix N. **A new platelet parameter, the mean platelet component, can demonstrate abnormal platelet function and structure in myelodysplasia.** *Clin Lab Haem* 2003; 25: 59-62.
49. Chapman E.S., Sorette M., Hetherington E., Zelmanovic D., Kling G., Dugailliez J., Pujol-Moix N., Okrongly D. **A rapid, automated flow cytometric method to measure activated degranulated platelets by density determination.** *Thromb Haemost* 2003; 89: 1004-1015.
50. Macey M.G., Carty E., Webb L., Chapman E.S., Zelmanovic D., Okrongly D., Rampton D.S., Newland A.C. **Use of mean platelet component to measure platelet activation on the ADVIA 120 haematology system.** *Cytometry* 1999; 38: 250-255.
51. Moritz A., Walcheck B.K., Weiss D.J. **Evaluation of flow cytometric and automated methods for detection of activated platelets in dogs with inflammatory disease.** *American Journal of Veterinary Research* 2005; 66: 325-329.

Danksagung

Wem die Dankbarkeit geniert,
der ist übel dran,
denke, der dich erst geführt,
wer für dich getan!
(Johann Wolfgang von Goethe)

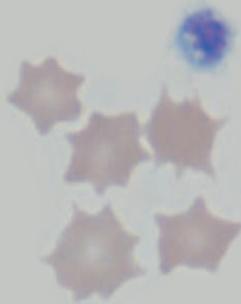
Prof. Dr. A. Moritz
Betreuer

Dr. N. Bauer
Betreuerin

Dr. R. Siekmann und Dr. M. Heidt
Leiter der Arbeitsgruppe

Dr. K. Failing und M. Sparenberg
AG Biomathematik und Datenverarbeitung

E. Jüngst-Carter und S. Scheld
medizinisch technische Assistenten



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5598888 Fax: -5598890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5357-5



9 783835 953574