Durchflusszytometrie thrombozytärer Oberflächenantigene: Änderungen im Langzeitverlauf in einer Population gesunder Erwachsener

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Annette Fromm
aus Heilbad Heiligenstadt

Gießen 2006

Aus dem Medizinischen Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie
Neurologische Klinik

Direktor:
Prof. Dr. med. Manfred Kaps

des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: PD Dr. E. Stolz
Gutachter: PD Dr. H. Hölschermann

Tag der Disputation: 01. Juni 2006

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

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung..... 1

1.1 Thrombozyten..... 1

1.1.1 Histologie..... 1

1.1.2 Historische Entwicklung der Thrombozytendiagnostik..... 2

1.1.3 Thrombozytenfunktion..... 3

1.1.3.1 Rezeptor-Verhältnisse und Agonisten..... 3

1.1.3.2 Thrombozytenaktivierung und Aggregation..... 4

1.1.3.3 Agonisten der Signaltransduktion..... 7

1.1.3.4 Funktionsstörungen..... 8

1.1.3.5 Therapeutische Beeinflussbarkeit der Thrombozytenaggregation..... 9

1.1.3.6 Empfehlungen für die Sekundärprophylaxe des Hirninfarktes und der transitorischen ischämischen Attacke..... 13

1.2 Durchflusszytometrie..... 16

1.2.1 Allgemeines..... 16

1.2.2 Aufbau und Funktionsprinzip..... 16

1.2.3 Fluorochrome Reagenzien..... 18

1.2.4 Anwendungsgebiete..... 19

1.2.5 Durchflusszytometrie von Thrombozyten..... 20

1.2.5.1 Prinzip der Probenaufbereitung..... 21

1.2.5.2 Spezifische Antikörper und Aktivierungsmarker..... 21

1.2.5.3 Mikropartikel und Thrombozytenaggregate..... 23

1.3 Fragestellung der Arbeit..... 25

2. Material, Probanden und Methoden..... 26

2.1 Probanden und Untersuchungsplan..... 26

2.1.1 Probanden..... 26

2.1.2 Untersuchungsplan..... 27

2.2 Reagenzien..... 28

2.3 Messgeräte und Software..... 29

2.4 Verarbeitungszubehör..... 30

2.5 Spezielle Lösungen..... 31

2.5.1 Paraformaldehyd-Lösung..... 31

2.5.2 Fixations-Lösung……. 31
2.5.3 Verdünnungs-Lösung……... 31

2.6 Probenentnahme und –verarbeitung…… 31
2.6.1 Entnahme der Blutproben…… 31
2.6.2 Präparation zur CD62p-Bestimmung……... 32
2.6.3 Präparation zur PAC-1-Bestimmung……... 32
2.6.4 Präparation zur Bestimmung der ADIAflo-Messreihe…… 32

2.7 Messung am Durchflusszytometer…… 33
2.7.1 Grundeinstellungen…….. 33
2.7.2 Abgrenzung der Thrombozyten gegen andere Zellen…….. 34
2.7.3 Differenzierung der thrombozytären Strukturen…….. 34
2.7.4 Analyse CD62p- und PAC-1-positiver Thrombozyten…… 34
2.7.5 Analyse der ADIAflo-Messreihe: CD41, CD42b, CD61, CD62p sowie Isotyp…… 35
2.7.6 Berechnungen……... 37
2.7.6.1 CD62p- und PAC-1-positive Zellen……. 37
2.7.6.2 CD41-, CD42b-, CD61- sowie CD62p-Rezeptoren im Rahmen der ADIAflo-Messreihe…….. 37

2.8 Weitere Bestimmungen…….. 38
2.8.1 Blutbild……. 38

2.9 Statistische Auswertung…… 38

3 Ergebnisse…… 39

3.1 Thrombozytenzahlen…… 39
3.1.1 Vergleich sämtlicher Probanden…….. 39
3.1.2 Geschlechtsunterschiede…….. 40
3.1.3 Alterskorrelation…….. 41

3.2 CD 62p…… 41
3.2.1 Vergleich sämtlicher Probanden…….. 41
3.2.1.1 CD 62p-positive Thrombozyten (%)…… 41
3.2.1.2 Singuletten (single platelets) (%)…….. 42
3.2.1.3a Mikropartikel (%)……. 43
3.2.1.3b Mikropartikel / µl..... 43
3.2.1.4a Thrombozyten-Aggregate (%)..... 44
3.2.1.4b Thrombozyten-Aggregate / µl……... 45
3.2.1.5 Vergleich der verschiedenen Messvariablen miteinander…… 46
3.2.1.5a Vergleich mit CD62p……. 46

3.2.1.5b Vergleich mit den Singuletten……... 47
3.2.1.5c Vergleich mit den Mikropartikeln……. 49
3.2.1.5d Vergleich mit den Aggregaten……... 50
3.2.2 Geschlechtsunterschiede…….. 52
3.2.2.1 CD 62p-positive Thrombozyten (%)…… 52
3.2.2.2 Singuletten (single platelets) (%)…….. 53
3.2.2.3a Mikropartikel (%)……. 54
3.2.2.3b Mikropartikel / µl…….. 55
3.2.2.4a Thrombozyten-Aggregate (%)..... 56
3.2.2.4b Thrombozyten-Aggregate / µl..... 57
3.2.2.5 Geschlechtsunterschiede für alle Variablen gepoolt..... 58
3.2.3 Alterskorrelation..... 59

3.3 PAC-1…….. 60
3.3.1 Vergleich sämtlicher Probanden…….. 60
3.3.1.1 PAC-1-positive Thrombozyten (%)…….. 60
3.3.1.2 Singuletten (single platelets) (%)…….. 60
3.3.1.3a Mikropartikel (%)……. 61
3.3.1.3b Mikropartikel / µl…….. 62
3.3.1.4a Thrombozyten-Aggregate (%)…….. 62
3.3.1.4b Thrombozyten-Aggregate / µl……... 63
3.3.1.5 Vergleich der verschiedenen Messvariablen miteinander…… 64
3.3.1.5a Vergleich mit PAC 1…….. 64
3.3.1.5b Vergleich mit den Singuletten……..…… 65
3.3.1.5c Vergleich mit den Mikropartikeln…….……. 66
3.3.1.5d Vergleich mit den Aggregaten……..... 67
3.3.2 Geschlechtsunterschiede…….. 68
3.3.2.1 PAC 1-positive Thrombozyten (%)…….. 68
3.3.2.2 Singuletten (single platelets) (%)…….. 69
3.3.2.3a Mikropartikel (%)……. 70
3.3.2.3b Mikropartikel / µl..... 71
3.3.2.4a Thrombozyten-Aggregate (%)..... 72
3.3.2.4b Thrombozyten-Aggregate / µl..... 73
3.3.2.5 Geschlechtsunterschiede für alle Variablen gepoolt..... 74
3.3.3 Alterskorrelation…….. 75

3.4 ADIAflo-Messreihe……. 76
3.4.1 CD 41……... 76
3.4.1.1 Vergleich sämtlicher Probanden……..…… 76
3.4.1.2 Geschlechtsunterschiede……... 77
3.4.2 CD 42b……. 78
3.4.2.1 Vergleich sämtlicher Probanden……... 78
3.4.2.2 Geschlechtsunterschiede……... 79

3.4.3 CD 61……... 80
3.4.3.1 Vergleich sämtlicher Probanden……... 80
3.4.3.2 Geschlechtsunterschiede……... 81
3.4.4 CD 62p……. 82
3.4.4.1 Vergleich sämtlicher Probanden……... 82
3.4.4.2 Geschlechtsunterschiede……... 83
3.4.5 Vergleich der verschiedenen Rezeptoren miteinander……. 84
3.4.5a Vergleich mit CD 41……. 84
3.4.5b Vergleich mit CD 42b……... 85
3.4.5c Vergleich mit CD 61……. 86
3.4.5d Vergleich mit CD 62p……... 87
3.4.5e Gepoolter Vergleich aller Rezeptoren miteinander…….. 88
3.4.6 Geschlechtsunterschiede für alle Variablen gepoolt…… 88
3.4.7 Alterskorrelation…….. 89

4. Diskussion……. 90

4.1 Studiendesign……..... 91

4.2 Bewertung der Methodik……... 91
4.2.1 Probenentnahme……... 92
4.2.2 Probenlagerung……... 92
4.2.3 Antikoagulation und Fixierung…… 92
4.2.4 Laborchemische Genauigkeit……... 93

4.3 Bewertung der Versuchsergebnisse……..…… 95
4.3.1 Anzahl der Thrombozyten im Blutbild, Geschlechtsunterschiede und Abhängigkeit vom Alter…… 95
4.3.2 CD62p-Expression auf aktivierten Thrombozyten und anteiliges Vorliegen der Thrombozyten als singuläre Plättchen, Mikropartikel oder Aggregate……. 95
4.3.2.1 Quantitative Vergleiche aller Probanden im Verlauf bzgl. CD62p-Expression und Vorliegens der Thrombozyten in den verschiedenen Zellformen……. 95
4.3.2.2 Abhängigkeiten zwischen dem Vorliegen der verschiedenen Zellformen und der CD62p-Expression…… 96
4.3.2.3 Geschlechtsunterschiede……... 97
4.3.2.4 Abhängigkeit vom Alter…….. 97
4.3.3 Nachweis von PAC-1-Epitopen und anteilhaftes Vorliegen der Thrombozyten als singuläre Plättchen, Mikropartikel oder Aggregate... 98
4.3.3.1 Quantitative Vergleiche aller Probanden im Verlauf bzgl. GPIIb/IIIa-Markierung anhand PAC-1 und Vorliegens der Thrombozyten in den verschiedenen Zellformen……. 98
4.3.3.2 Abhängigkeiten des Vorliegens der verschiedenen Zellformen und der GP IIb/IIIa-Markierung anhand PAC-1… 98

4.3.3.3 Geschlechtsunterschiede……... 99
4.3.3.4 Abhängigkeit vom Alter……..... 99
4.3.4 ADIAflo-Messreihe: Quantitativer Nachweis von CD41, CD42b, CD61 und CD62p……..... 99
4.3.4.1 CD 41 (GP IIb/IIIa)…….…... 99
4.3.4.2 CD 42b (GP Ib)……..... 100
4.3.4.3 CD 61 (GP IIIa)…… 100
4.3.4.4 CD 62p (GMP-140)…….. 100
4.3.4.5 Verhältnis der Rezeptorzahl-Änderungen in Abhängigkeit der einzelnen Rezeptoren untereinander……. 101
4.3.4.6 Geschlechtsunterschiede für alle Variablen gepoolt……. 101
4.3.4.7 Abhängigkeit der jeweiligen Rezeptor-Anzahl vom Alter…... 101

4.4 Ausblick……... 102

5 Zusammenfassung…… 103

Summary…….. 106

6 Literatur……. 108

7 Anhang…….. 121

7.1 Versuchsprotokolle……. 121
7.1.1 ADIAflo-Messreihe…….. 121
7.1.2 CD 62p-Markierung (Fixierung nach Cyfix III-Protokoll)…….. 122
7.1.3 PAC-1-Markierung…….. 122

7.2 Abkürzungen…….. 123

Lebenslauf……... 126

Danksagung……. 128

1 EINLEITUNG

1.1 THROMBOZYTEN

1.1.1 Histologie

Thrombozyten entstehen als Abschnürungen des Zytoplasmas großer, vielkerniger Megakaryozyten des Knochenmarks[1,2,3,5], wobei durch die Abscherkräfte des zirkulierenden Blutes aus einer einzelnen dieser Knochenmarksriesenzellen bis etwa 1000 Blutplättchen geformt werden können. Bei diesen Prozessen nimmt insbesondere Thrombopoetin neben verschiedenen Zytokinen und Hormonen eine führende regulierende Stellung ein[6]. Thrombozyten zeigen sich im strömenden Blut mit ihrem Längsdurchmesser von 1-4 µm und einer Dicke von 0,5-0.75 µm in bikonvexer Scheibenform und stellen den kleinsten korpuskulären Bestandteil des Blutes dar[1,4]. Darüber hinaus bilden sie neben der weitaus größeren Fraktion der Erythrozyten und Leukozyten mit einer Anzahl von etwa 150.000-300.000/µl den geringsten Anteil des Hämatokrit und nur etwa 1% der gesamten Zellmasse des Blutes. Die Lebenszeit der für eine intakte Hämostase unentbehrlichen Plättchen beträgt im Blut etwa 8 bis 10 Tage[2,7].

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen erscheinen Thrombozyten reich an einer Vielzahl von Organellen, die bzw. deren Inhaltsstoffe (Tab. 1.1) für die Funktion der Zelle unabdingbar sind. Außerdem werden nach Aktivierung im Protoplasma Aktin-, Myosin- und Tropomyosin-Filamente sichtbar. Thrombozyten verfügen über Enzyme verschiedener Stoffwechselwege wie Glykolyse, Pentosephosphatzyklus, Citratzyklus, Atmungskette und darüber hinaus über ATPase[23].

α-Granula:	
- Thrombozyten-spezif. Proteine:	Plättchenfaktor 4 (Antiheparin), β-Thromboglobulin, Thrombospondin, PDGF (platelet-derived growth factor), GMP-140 (=CD62p)
- Plasmaproteine:	Fibrinogen, Fibronektin, vWF, Faktoren V/VIII, Plasminogen, Albumin, α2-Antiplasmin, α2-Makroglobulin, Kallikrein
δ-Granula:	Serotonin, ADP, ATP, GDP, GTP, Calcium, anorganische Phosphate
lysosomale Granula:	saure Hydrolasen, Gp53 (=CD63), LAMP-1, LAMP-2

Tab. 1.1: Granula der Thrombozyten mit Inhaltsstoffen

1.1.2 Historische Entwicklung der Thrombozytendiagnostik

Die Erforschung der Blutplättchen reicht bis ins 19. Jahrhundert zurück. Der Italiener Julius Bizzozero veröffentlichte bereits 1881 seine Beobachtungen „Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes“ in welchem er schon damals beschrieb, wie sich Thrombozyten zu weißen Thromben aneinanderlagern und dabei maßgeblich sowohl an der Hämostase als auch an der Entstehung von Thrombosen beteiligt sind[8]. Außerdem ergänzte er seine Beobachtungen durch einige Skizzen, welche aufgrund ihrer Genauigkeit bis heute Relevanz haben (Abb. 1).

Bereits 3 Monate später werden von Hayem Beobachtungen gleichen Inhalts veröffentlicht[9] und Eberth und Schimmelbusch publizieren 1886 ihre Forschungsergebnisse, „dass die Blutplättchen bei dem Zustandekommen der Thromben der integrierende Factor sind und die weissen wie die rothen Blutkörper nur accidentelle Einschlüsse repräsentieren“[10].

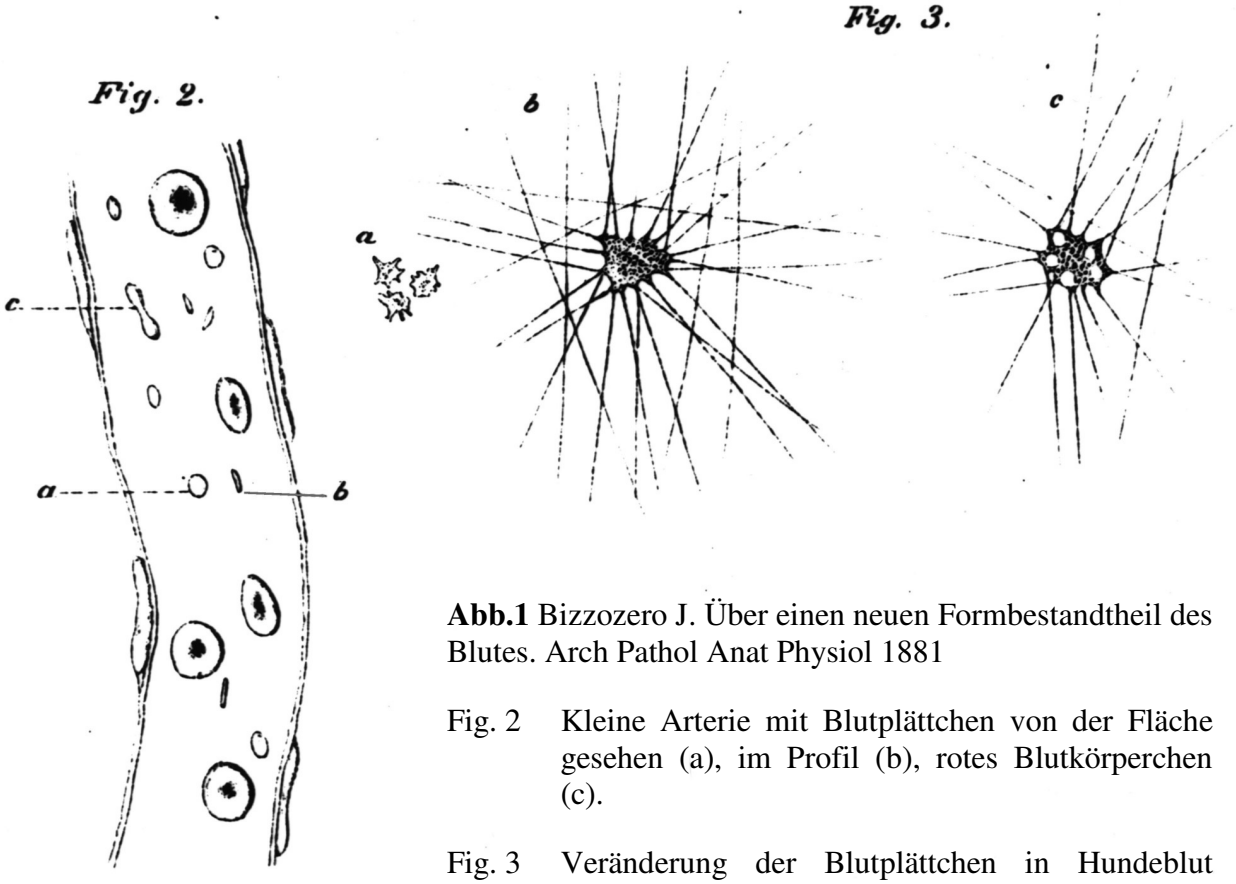

Abb.1 Bizzozero J. Über einen neuen Formbestandtheil des Blutes. Arch Pathol Anat Physiol 1881

Fig. 2 Kleine Arterie mit Blutplättchen von der Fläche gesehen (a), im Profil (b), rotes Blutkörperchen (c).

Fig. 3 Veränderung der Blutplättchen in Hundeblut gleich nach dem Austritt aus dem Gefäss (a), nach 8 Minuten (b), nach ½ Stunde (c).

Erst in den 50er und 60er Jahren des 20. Jahrhunderts machte die Erforschung der Thrombozyten weitere Fortschritte, als Hellem erkannte, dass Adhäsion und Aggregation dieser Zellen offenbar von einem Inhaltsstoff der Erythrozyten ausgelöst werden können[11] (welcher sich später als ADP identifizieren ließ) und Born[12], Jürgens[13] und O`Brien[14] die Methode der Thromboaggregometrie entwickelten.
1975 wird der Arachidonsäuremetabolit Thromboxan A_2 als aggregations-auslösende Substanz beschrieben[15], im selben Jahr folgt eine Veröffentlichung über die selbigen Stoffwechsel blockierende Wirkung von Acetylsalicylsäure[16]. Resultate dieser Erkenntnisse sind zahlreiche Arbeiten über die Hemmung der Thrombozytenfunktion und deren klinische Relevanz[17,18,19] sowie die Entwicklung neuer Techniken und Methoden, beispielsweise zur immunologischen Detektion von Thrombozyten-Oberflächenproteinen.

1.1.3 Thrombozytenfunktion

1.1.3.1 Rezeptorverhältnisse und Agonisten

In der Zellmembran der Blutplättchen sind verschiedene Glykoprotein-Rezeptoren enthalten, welche Schlüsselfunktionen im Ablauf der primären Hämostase einnehmen.
Eine besondere Position hierbei besitzt mit einer Anzahl von etwa 80.000/Zelle der ausschließlich auf Thrombozyten und Megakaryozyten zu findende *Glykoprotein (GP)-Komplex IIb/IIIa*[119] (= Integrin αIIbβ3 bzw. CD41/CD61), ein Rezeptor für von Willebrand-Faktor, Vitronektin u.a.[25], und nach Aktivierung des Thrombozyten (z.B. durch Thrombin) auch für Fibrinogen[20,21], welches wiederum den Wirkungseintritt eines der wichtigsten Agonisten für die Plättchen-Rekrutierung und –Aggregation, des Thrombins, vermittelt[22]. Die Konformationsänderung des GP IIb/IIIa ist die Voraussetzung für die Fibrinogen-Bindung, der ruhende Rezeptor ist dazu nicht in der Lage.
Integrine sind eine Klasse von zu den Adhäsionsmolekülen zählenden Glykoproteinen, welche per definitionem ihre Liganden auf der Zelloberfläche mit dem Zytoskelett im Zellinneren verbinden (integrieren)[23,24]. Solche finden sich auch auf Thrombozyten.
Die am besten untersuchte körpereigene Struktur mit Bindungsverhalten zu Thrombozyten ist wahrscheinlich Kollagen, welches seine Wirkung aufgrund seiner Adhäsion an GP IV[23] (neben Thrombospondin), an GP VI[245] und an den GP Ia/IIa-Komplex entfaltet[3,23,26] (=Integrin α2β1 bzw. CD49b/CD29).

Weiterhin finden sich spezifische Rezeptoren z.B. für von Willebrand-Faktor (*GP Ib-V-IX-Komplex*[3] = CD42a/CD42b) und Fibronektin (*GP Ic/IIa-Komplex*[26] = α5β1 bzw. CD49e/CD29).

Im aktivierten Zustand exprimieren Blutplättchen weitere Rezeptoren, nämlich *GP 53* (= CD63)[27] aus dem Bestand der Lysosomen sowie P-Selektin (= CD62p bzw. GMP 140), welches im ruhenden Zustand in den α-Granula gespeichert ist[28,29]. Selektine sind definiert als eine zu den Adhäsionsmolekülen zählende Gruppe lektinähnlicher Transmembranproteine (engl. lectin cell adhesion molecules, Abk. LEC-CAM), welche den Zell-zu-Zell-Kontakt vermitteln[30]. Im Falle von P-Selektin ist die genaue physiologische Funktion noch nicht vollständig geklärt. Man vermutet jedoch, dass diese Rezeptoren u.a. die Adhäsion von Monozyten und Granulozyten an Thrombozyten und Endothelzellen vermitteln[240,241,242,243,244].

Zusammenfassend gilt, dass die Membran-Glykoproteine der Thrombozyten die Adhäsion an subendotheliale Strukturen und die spätere Plättchenaggregation vermitteln, wodurch die Bildung eines initialen hämostatischen Plug eingeleitet wird.

1.1.3.2 Thrombozytenaktivierung und Aggregation

Innerhalb intakter Blutgefäße zirkulieren Thrombozyten in der für ruhende Plättchen typischen diskoiden Form und weisen nahezu keinerlei Ausstülpungen auf.

Stabilisiert wird dieser Zustand u.a. durch Prostacyclin und NO (= endothelium-derived relaxing factor, EDRF), welche vom vaskulären Endothelium gebildet und sezerniert werden, und aktiv eine Aktivierung verhindern[31]. Auch Thrombozyten selbst scheinen in der Lage zu sein, NO aus L-Arginin zu synthetisieren.

Ähnliche Auswirkungen hat innerhalb der Zelle das über ATP mittels Adenylatcyclase gebildete cAMP, welches ebenfalls die Aggregation, aber auch die Sekretion und Formänderung verhindert. Außerdem moduliert cAMP über weitere Schritte die ATP-abhängigen Calciumpumpen, welche zytosolisches Calcium entfernen.

Letztendlich tragen noch eine Reihe weiterer Stoffe zur Erhaltung des Ruhezustandes der Zellen bei, indem die verschiedenen Wirkungsweisen modulierend jeweils andere Mechanismen beeinflussen[53,58,59,60]. Somit aggregieren ruhende Thrombozyten weder miteinander, noch mit anderen Zellen.

Im Blutstrom trifft man sie aufgrund von Verdrängung durch die größeren Erythrozyten bevorzugt in der Peripherie der Blutsäule an, ihre Konzentration ist in den der Gefäßwand am nächsten gelegenen Schichten am höchsten[32,33]. Dies hat den Vorteil, dass sie unmittelbar mit Verletzungen bzw. mit Strukturen in Kontakt treten, welche bei Verletzungen der Gefäßwand vom Subendothel freigesetzt werden[34], und an den Bindegewebsfasern der Wundränder haften bleiben[1]. Zu den sezernierten Komponenten zählen u.a. Kollagen und Mikrofibrillen, aber auch von Willebrand-Faktor, eine Untereinheit des Faktor VIII der Blutgerinnung (syn.: Faktor-VIII-assoziiertes Antigen)[35]. Letzteren findet man sowohl in der subendothelialen Matrix, als auch als Bestandteil des Blutplasmas. Außerdem befinden sich Speicher dieses Stoffes in den α-Granula der Thrombozyten selbst und werden nach Aktivierung entleert[31].

Der initiale Kontakt zwischen Thrombozyt und Gefäßwand kommt über die Bindung von vWF an den GP Ib-V-IX-Komplex zustande[36,37] und wird verstärkt vom GP IIb/IIIa-Komplex[37,38,39] mit dem Ziel, durch Fibrinogen eine Schicht Plättchen fest mit der Oberfläche des bestehenden Defektes zu verbinden. vWF gilt hier als essenzieller Bestandteil der Thrombozyten-Adhäsion in vivo[43,44]. Zusätzlich kontrahieren sich die glatten Muskelzellen der Gefäßwand und führen so eine Querschnittsverkleinerung im verletzten Gefäßabschnitt herbei, welche wiederum eine Scherkraft-Verstärkung zwischen Blutstrom und Gefäßwand bewirkt[36]. In früheren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass schon allein jene hohen Scherkräfte ohne das Mitwirken weiterer Agonisten eine Aktivierung bei Thrombozyten hervorrufen können[40]. Darüber hinaus wird eine Konformationsänderung am vWF induziert, welcher hierdurch die Adhäsion an z.B. Kollagen ermöglicht[41,42].
Eine rasante Kaskade zahlreicher gleichzeitig ablaufender morphologischer und biochemischer Vorgänge, reguliert durch eine Vielzahl von Liganden-Rezeptor-Interaktionen wird ausgelöst, sobald der erste Kontakt des Thrombozyten mit einer Läsion hergestellt ist. Die Bindung von vWF an GP Ib-V-IX leitet das so genannte „rolling“ ein, während welchem die Plättchen aktiviert werden und mit der engen Adhäsion an die Gefäßoberfläche beginnen[45,46,47]. Dann kommt es zum „Shape Change“, d.h. typischen Formänderungen: Wird die diskoide Form der ruhenden Plättchen durch ein zirkumferenzielles Band von Mikrotubuli und deren Interaktion mit Mikrofilamenten aufrechterhalten, so wird bei Aktivierung über kontraktile Proteine (Actin, actinbindendes Protein, α-Actinin, Myosin) eine Pseudopodienbildung und Granula-Zentralisation vermittelt[48]. In experimentellen Untersuchungen anhand einer vWF-beschichteten Oberfläche zeigte sich, wie sich die Morphologie der Zellen während des Adhäsions-Prozesses verändert: Ballförmige

Thrombozyten mit Philopodien rollen auf der Oberfläche und verflachen allmählich zu einer hemisphärischen Form, bevor sie schließlich an die Oberfläche adhärieren. Ist dies geschehen, können sie sich innerhalb weniger Minuten enorm ausdehnen (Durchmesser >3µm) und nahezu „Spiegelei"-Form annehmen[49].

Folge der Organellen-Zentralisierung sind außerdem eine Sekretionsreaktion und Degranulierung[50]. Die Thrombozyten-Granula sind über ein offenes kanalikuläres System („surface connected canalicular system") mit der Zelloberfläche verbunden[1,7]. Bei Aktivierung kommt es zu einer Erhöhung der Konzentration zytoplasmatischen Calciums aufgrund Thrombinbindung an die Thrombozytenmembran (verstärkt durch ADP). Die Folge ist eine Fusion der Granula mit dem offenen kanalikulären System, wodurch die Granula-Inhaltsstoffe, nämlich u.a. verschiedene Thrombozytenaktivatoren, Gerinnungsfaktoren und Vasokonstriktoren (siehe Tab. 1.1), entleert werden[1,51,52,53].
Zu den bei Aktivierung exprimierten Strukturen zählt außerdem der Rezeptor CD62p (P-Selectin bzw. GMP 140), welcher in den α-Granula der ruhenden Thrombozyten gespeichert war[28,29].
Die calciumabhängige Bildung von Thromboxan A2 über zyklische Endoperoxide als Zwischenstufen wird gestartet[1,7], beide Substanzen bewirken ebenfalls die Aktivierung und Aggregation weiterer Plättchen. Thromboxan A2 fungiert darüber hinaus als potenter Vasokonstriktor[37].
Über ein so genanntes „Inside-Out"-Signal wird durch Ligandenbindung die GpIIb/IIIa-Konversion von einem Rezeptor mit geringer in einen Rezeptor mit hoher Affinität eingeleitet[22].
Von „Outside-In"-Signal spricht man bei der Aktivierung membranassoziierter Proteine anhand der Verbindung zwischen Subendothel und den jeweiligen Bindungsstellen der Plättchen[54].

Der genaue Aktivierungsablauf ist jedoch ausgesprochen umfangreich, so dass die aufgeführten Mechanismen nur einen Auszug der Vorgänge darstellen. Tatsache ist, dass zahlreiche verschiedene Vorgänge - ausgehend vom Endothel, den Thrombozyten selbst oder auch von weiteren Blutbestandteilen (z.B. Erythrozyten geben bei erhöhten Scherkräften aktivierendes ADP frei[55]) - die Aggregation weiter fördern. Zirkulierende Plättchen werden am sich bildenden Thrombus aktiviert und in dessen Aufbau einbezogen[56]. Die Vernetzung untereinander wird hauptsächlich über die Fibrinogen-Bindung an konformationsgeänderte

GpIIb/IIIa-Rezeptoren gewährleistet[57], aber auch die Adhäsivproteine vWF, Fibronektin und Vitronektin sind in geringerem Umfang an der Brückenbildung zwischen den Thrombozyten beteiligt. Insgesamt sind soviel Thrombozyten an diesem Prozess beteiligt, dass ein Gefäßwanddefekt durch ein auf die beschriebene Weise entstandenes Gerinnsel verschlossen werden kann[61,62].

Zusammenfassend bedarf es also dreier grundlegender Reaktionen, um einen ruhenden Thrombozyten in seine aktive Form zu überführen:

1. Absonderung von Signalen aus Blutbestandteilen oder der Gefäßwand, welche an die spezifischen Oberflächenrezeptoren der Plättchen binden,
2. intrazelluläre Signalübertragung (Rezeptoren → sekretorische Granula, Zytoskelett, Integrinrezeptoren),
3. Fibrinogen-Bindung mit daraufhin erneutem intrazellulärem Signal, welches die Aktivierung weiterer Thrombozyten initiiert[62].

Im Rahmen der sekundären Hämostase wird das verletzte Gefäß mit Hilfe anderer Zellen, wie Erythrozyten, in Form eines roten Abscheidungsthrombus endgültig verschlossen. Diesen Vorgängen der Blutgerinnung kann später eine Phase der Fibrinolyse folgen mit dem Ziel, das Gerinnsel aufzulösen und das Gefäß wieder durchgängig zu machen[1].

1.1.3.3 Agonisten der Signaltransduktion

Die stärksten Agonisten der Plättchenaktivierung sind Thrombin und Thromboxan A2, aber auch ADP, Adrenalin, PAF sowie Kollagen und weitere Komponenten der extrazellulären Matrix haben große Bedeutung.
Die Signalübertragung wird durch G-Proteine, Phospholipasen und Proteinkinasen gewährleistet. Diese Vorgänge regeln wichtige Prozesse, wie den Einstrom und die Mobilisierung ionisierten Calciums mit Konzentrationsanstieg im Zytoplasma, sie bewirken die Formänderung der Zelle mit Zentralisierung der Granula und Pseudopodienbildung und sind darüber hinaus für die Exposition und Formierung des Fibrinogen-Rezeptors auf der Zelloberfläche verantwortlich[58,62,63].

1.1.3.4 Funktionsstörungen

Als Normwert gelten beim Menschen 150.000-300.000 Blutplättchen/µl Blut, eine klinisch relevante Blutungsneigung hingegen ist in der Regel erst bei Thrombozytenzahlen unter 20.000/ µl zu erwarten[64].

Folge solcher Thrombozytopenien sind die charakteristischen Petechien: Kleine punktförmige Blutungen, welche bevorzugt an den herabhängenden Körperpartien entstehen und in besonders schweren Fällen in eine so genannte Purpura münden können. Das typische Krankheitsbild stellt hier die *Idiopathische Thrombozytopenie (M. Werlhof)* dar, derartige Zustände treten jedoch auch im Rahmen *medikamentöser* Therapieformen, z.B. nach Chemotherapie, auf.

Weitaus seltener sind Störungen der Hämostase aufgrund Beeinträchtigungen der Plättchenfunktion. Glykoprotein Ib/IX-Mangel bedingt das *Bernard-Soulier-Syndrom* (Adhäsionsstörung), Defizienz von Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorenkomplexen die *Glanzmann-Thrombasthenie* (Aggregationsstörung). Mangel oder Defekte der Speichergranula äußern sich als „*storage pool disease"* (Aggregationsstörung). Ein qualitativer oder quantitativer vWF-Defekt führt zum *von-Willebrand-(Jürgens)-Syndrom,* wodurch neben Störungen der Adhäsion aufgrund der mangelnden Interaktion mit Faktor VIII auch die plasmatische Gerinnung beeinträchtigt sein kann. Insgesamt aber stehen auch bei den Thrombozytopathien *medikamentöse Ursachen* im Vordergrund. Besonders gilt dies für nichtsteroidale Antiphlogistika, Antibiotika etc. In funktionellem Zusammenhang auftretende Erkrankungen können des Weiteren z.B. *myeloproliferativ* bedingt sein (infolge Stammzelldefekts) [64,65].

Die Plättchenzahl und -funktion kann im Gegensatz zu den bereits genannten Zuständen auch gesteigert sein, was mit einer erhöhten Tendenz zur Thrombus-Bildung einhergeht. Derartige Situationen treten im Rahmen von Entzündungen, nach Blutungen oder wiederum im Zusammenhang mit myeloproliferativen Syndromen auf[66,67], sind jedoch häufiger (bei gesteigerter Aktivierbarkeit unter normalen Thrombozytenzahlen) mit z.B. Diabetes[68,69], Atherosklerose[70,71], zerebralen Durchblutungsstörungen[72,73,74], Herzinsuffizienz[75], koronarer Herzkrankheit[76,77] und Tumorerkrankungen[66,78], aber auch der Idiopathischen Thrombozytopenie[79] assoziiert.

In Anbetracht der Tatsache, dass Thrombozytopenien relativ selten klinische Relevanz erreichen und während bestimmten Lebenssituationen sogar physiologisch auftreten (Gestationsthrombozytopenie), und Thrombozytopathien insgesamt sehr selten sind, ist Zuständen und Folgen einer erhöhten Reagibilität weitaus größere Bedeutung beizumessen. Die zu Krankheitsbildern wie Embolie, Thrombose oder Schlaganfall führende Bildung gefäßverschließender Gerinnsel über einem rupturierten atherosklerotischen Plaque unterscheidet sich nicht grundlegend von der Ausbildung von Thromben im Rahmen der physiologischen Hämostase nach Endothelverletzungen[80,81] (siehe Kap. A. 3.2).

1.1.3.5 Therapeutische Beeinflussbarkeit der Thrombozytenaggregation

In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von Substanzen entwickelt und auf ihre plättchenfunktionshemmende Wirksamkeit geprüft. Im klinischen Alltag allerdings haben sich nur wenige auch etabliert, da die Ansprüche an derartige Medikamente sehr hoch sind. Das „ideale“ Arzneimittel würde beispielsweise die Plättchenreaktion bezüglich der Bildung pathologischer Thromben hemmen, ohne die gleichzeitig sehr wichtige Blutstillungsfunktion störend zu beeinflussen.
Von pharmakologischer Seite sind hierzu verschiedene Angriffspunkte im Verlauf der Funktionskette denkbar. So kommen z.B. Antagonisten der spezifischen aggregationsauslösenden Substanzen in Frage, welche gezielt die entsprechenden Aktivierungswege blockieren. Eine weitere Möglichkeit stellen Eingriffe in die Signalübertragung innerhalb der Plättchen, eine Blockade der Calcium-Mobilisierung oder auch die Hemmung der cAMP/cGMP-Bildung dar. Hierbei bleibt jedoch besonders wichtig, dass neben den Vorteilen des therapeutischen Effektes die Funktionen und Stoffwechsel anderer Zellen möglichst unbeeinflusst bleiben.

Cyclooxygenase-Blockade: *Acetylsalicylsäure (ASS)* (Aspirin®) ist zweifellos das bekannteste Medikament unter den Thrombozytenaggregationshemmern. Als Hemmstoff der Cyclooxygenase verhindert es hochwirksam und irreversibel die Synthese von Thromboxan (TXA2) innerhalb der kernlosen Zelle, welche nicht zur Neusynthese des Enzyms in der Lage ist[84]. Die Aufgabe von TXA2 ist u.a. die Stimulation weiterer Plättchen, daher spielt das Enzym eine entscheidende Rolle als Modulator der Plättchenfunktion und ist gleichzeitig Ziel

deren pharmakologischer Hemmung[86]. Die Wirkungsdauer des Medikamentes korreliert entsprechend mit der Überlebenszeit der Thrombozyten.

Unbeeinflusst bleiben allerdings nach wie vor die Aktivierungswege, welche beispielsweise durch Thrombin direkt induziert werden[90], auch die plasmatische Gerinnung ist nicht von ASS betroffen.

Typische Indikationen zur Verabreichung dieses Medikamentes sind instabile Angina pectoris, der akute Myokardinfarkt, Stentimplantationen, die Sekundärprophylaxe von koronarer Herzkrankheit (KHK) und zerebralen Ischämien, sowie Rezidive der letzteren[82,83]. So wurde eine Reduzierung des Schlaganfall-Risikos unter täglicher Aspirin-Einnahme nachgewiesen, die Analyse von Sekundärprophylaxe-Studien wies eine Verminderung großer cerebro- und cardiovaskulärer Ereignisse um 23% unter Aspirin nach[85] und auch IST[108] (The International Stroke Trial) und CAST[109] (Chinese Acute Stroke Trial) bestätigten gute Ergebnisse bei Beginn einer Aspirin-Therapie innerhalb 48 Stunden nach einem Hirninfarkt. Die optimale Dosierung des Medikamentes bereitet nach wie vor Probleme[87]. Inzwischen macht man sowohl interindividuelle[88,90] als auch individuelle Variabilität im Laufe der Zeit[89,90] dafür verantwortlich, höhere Dosen scheinen jedoch grundsätzlich das Risiko eines erneuten ischemischen Ereignisses herabzusetzen[91,92].

Als Ursache für das Vorkommen so genannter *Aspirin-Nonresponder* werden derzeit fünf verschiedene Haupt-Mechanismen diskutiert[192]:

1. die inadäquate Blockade Erythrozyten-induzierter Plättchenaktivierung durch niedrige Dosen von ASS,
2. die Freisetzung von F2-isoprostane 8-iso-prostaglandine (PGF2α),
3. Stimulation der Plättchenaggregation durch Rauchen,
4. erhöhte Plättchenaggregation bei steigendem Katecholaminlevel sowie
5. gesteigerte Plättchensensibilität auf Kollagen.

Hemmung der ADP-abhängigen Aggregation: *Clopidogrel* (Iscover®, Plavix®) und *Ticlopidin* (Tiklyd®) wirken auf die primäre und sekundäre Plättchenaggregation, indem ihre aktiven Metaboliten durch Bindung an den ADP-Rezeptor einerseits die ADP-vermittelte GpIIb/IIIa-Aktivierung irreversibel hemmen und andererseits gleichzeitig die Mediator-Freisetzung aus den α- und δ-Granula beeinflussen. Letzteres unterbricht den sich selbst unterhaltenden Aktivierungsprozess der Zellen[93,94]. Die CAPRI-Studie (A randomized, blinded trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischemic events) belegte ein ausgezeichnetes Sicherheitsprofil für Clopidogrel gegenüber Aspirin[104]. Dabei ist die neuere

Substanz Clopidogrel etwa um das 5-7fache wirksamer als Ticlopidin, welches zusätzlich ein hohes Leukopenie-Risiko birgt, aber für beide gilt, dass sie ASS in der Sekundärprophylaxe nicht kardioembolischer Schlaganfälle[93] und in der Prävention cardiovaskulärer Ereignisse bei fortgeschrittener Atherosklerose[95] überlegen sind.
Die Wirksamkeit des Medikamentes korreliert mit der Lebensdauer der Thrombozyten, so dass bei einem täglich 10-15%igen Ersatz der Zellen[3] etwa 7 Tage nach Abbruch der Clopidogrel-Therapie mit einer voll wiederhergestellten Plättchenfunktion zu rechnen ist[96].
Medikamente dieser Substanzgruppe sind für die Sekundärprophylaxe von ischämischem Hirninfarkt und transitorisch ischämischer Attacke, nach Myokardinfarkt und bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) zugelassen. Ihre klinische Anwendung erfolgt bei ASS-Unverträglichkeit, aber auch in Kombination mit ASS nach Interventionen (Koronar-Stent) [82,83,93]. Diese Kombination erwies sich als wirkungspotenzierend[103]. Für den Hirninfarkt konnte die kürzlich abgeschlossene MATCH-Studie (Management of Atherothrombosis in High-risk Patients with Recent Transient Ischemic Attack or Ischemic Stroke) jedoch keinen Vorteil einer Kombinationstherapie von ASS und Clopidogrel gegenüber ASS als alleinigem Thrombozytenaggregationshemmer nachweisen.

Kombination von Cyclooxygenase-Hemmern und ADP-Rezeptor-Antagonisten: Verschiedene Studien (ISAR[97] (Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen), FANTASTIC[98] (The full anticoagulation versus aspirin and Ticlopidine), MATTIS[99] (The multicenter aspirin and Ticlopidine trial after intracoronary stenting), STARS[100] (Stent Anti-thrombotic Regimen Study)) zeigten, dass die Ticlopidin-ASS-Kombination das klinische Ergebnis hinsichtlich Thrombose- und Blutungskomplikations-Risiko nach Stent-Implantation gegenüber Monotherapie mit ASS oder ASS plus Antikoagulation mit Heparin oder Kumarin drastisch zu verbessern vermag. Eine weitere Steigerung dieses Ergebnisses konnte anhand der CLASSIC-Studie (the CLopidogrel ASpirin Stent International Cooperative Study) belegt werden, in welcher für Clopidogrel ein besseres Sicherheits-/Verträglichkeitsprofil gegenüber Ticlopidin herausgestellt wurde[101]. Einbußen in der Wirksamkeit konnten nicht festgestellt werden, was durch die Ergebnisse einer weiteren vergleichenden Studie bestätigt wird[102]. Insgesamt wurde anhand dieser Kombination eine Reduzierung von kardivaskulärem Tod, Myocardinfarkt und Schlaganfall um 20% erreicht[125].

Heparin: Heparin vermag neben der Inaktivierung diverser Gerinnungsenzyme (Thrombin, Xa, XIIa, XIa, IXa) aufgrund seiner Komplexbildung mit AT III darüber hinaus auch, die

Plättchenfunktion zu hemmen[105]. In vitro kann Heparin die Expression von GP Ib vermindern [106]. Ein positiver Effekt in der Sekundärprävention von Hirninfarkten konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

GpIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten: Diese effektivste antithrombotisch wirksame Substanz-Gruppe verhindert aufgrund der Besetzung und Blockade des GpIIb/IIIa-Rezeptors die Vernetzung der Thrombozyten, wobei jedoch der primäre Wundverschluss intakt bleibt, weil er über GpIb erfolgt[93,107]. Der monoklonale Antikörper *Abciximab* (ReoPro®) ist aufgrund seiner hohen Rezeptoraffinität in der Lage, Fibrinogen gar aus bereits bestehenden Bindungen zu verdrängen und wirkt daher auch thrombolytisch. Das Peptidomimetikum *Tirofiban* (Aggrastat®) und das niedermolekulare Peptid *Eptifibatid* (Integrilin®) dagegen lassen sich wegen der reversiblen Rezeptorbindung besser steuern, was mögliche Blutungskomplikationen besser beherrschbar macht[93]. Der insgesamt große Vorteil gegenüber anderen Substanzen besteht in der Endstrecken-Blockade der Plättchenaggregation, während Aspirin, Clopidogrel etc. nur einzelne Arme der Aktivierung hemmen und von anderen Agonisten umgangen werden können[120]. Die Plättchenaktivierung selbst kann jedoch nicht verhindert werden[124]. GpIIb/IIIa-Blockade reduziert die Thrombozyten-Ansammlung an Gefäßverletzungen, die Embolisation durch Plättchen-Fibrin-Debris in Gebieten der distalen Mikrozirkulation und die Freisetzung vasoaktiver Amine aus aktivierten Plättchen; all diese Vorgänge können z.B. unter koronarer Intervention verstärkt werden und letztendlich zum totalen Verschluss eines Gefäßes führen. Abciximab zeigte die meistversprechendsten Ergebnisse und als einziger GpIIb/IIIa-Blocker anhaltende Vorteile über einen Zeitraum bis zu 3 Jahren, auch bezüglich Reduzierung der Mortalität[120,121,122,123].

Entsprechend finden diese Medikamente Anwendung in der Prävention ischämischer Komplikationen bei perkutaner koronarer Intervention und in der Behandlung akuter Koronarsyndrome, nachdem zahlreiche Studien (EPIC[110] (Evaluation of c7E3 for the Prevention of Ischemic Complications), EPILOG[111] (Evaluation in Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty to Improve Long-Term Outcome with Abciximab GP IIb/IIIa blockade), CAPTURE[112] (c7E3 Fab Antiplatelet Therapy in Unstable Refractory Angina), EPISTENT[113] (Evaluation of Platelet IIb/IIIa Inhibition in Stenting), IMPACT-II[114] (Randomised placebo-controlled trial of effect of eptifibatide on complications of percutaneous coronary intervention: IMPACT-II), PURSUIT[115] (Platelet glycoprotein IIb/IIIa in unstable angina: receptor suppression using integrilin therapy), PRISM[116] (The Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management), PRISM-PLUS[117] (The Platelet

Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management in Patients Limited by Unstable Signs and Symptoms)) positive Ergebnisse lieferten, welche auch im Bereich des ischämisch bedingten Schlaganfalls neue Perspektiven eröffneten[118]: Abciximab könnte die Mikrozirkulation hinsichtlich der Ausdehnung von Mikrothrombosen positiv beeinflussen, über Kreuz-Reaktivität mit Mac-1-Integrinen die Entzündung einschränken und möglicherweise die Progression von Hirnödemen verzögern, was das Risiko für Reperfusionsschäden minimieren würde[120].

Andere Studien wiederum (OPUS-TIMI 16[126] (Oral glycoprotein IIb/IIIa inhibition with orbofiban in patients with unstable coronary syndromes trial), EXCITE[127] (Evaluation of Oral Xemilofiban in Controlling Thrombotic Events), SYMPHONY[128,129] (Sibrafiban versus aspirin to yield maximum protection from ischemic heart events post-acute coronary syndromes)) bieten enttäuschende Ergebnisse, welche von Newby et al zusammenfassend negativ bewertet wurden[130]. Die BRAVO-Studie[131,132] (Design of the blockade of the glycoprotein IIb/IIIa receptor to avoid vascular occlusion) wurde aufgrund steigender Mortalität abgebrochen, ebenso wurde die PURPOSE-Studie[133] nicht zu Ende geführt.

1.1.3.6 Empfehlungen für die Sekundärprophylaxe des Hirninfarktes und der transitorischen ischämischen Attacke

Die folgenden Ausführungen stützen sich auf die Empfehlungen zur Behandlung des Schlaganfalls der Europäischen Schlaganfall-Initiative (EUSI) für das Europäische Schlaganfall-Council (ESC), die Europäische Neurologische Gesellschaft (ENS) und die Europäische Föderation Neurologischer Gesellschaften (EFNS)[193].

Die Versorgung des Schlaganfalls und seiner Folgen bedarf besonderer Beachtung, stellt er doch die dritthäufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern (zwischen 63,5/100.000 in Europa (Männer/Schweiz) und 273,4/100.000 in Russland (Frauen/Russland)) sowie den wichtigsten Faktor für Morbidität und Langzeitbehinderung in Europa dar.

An erster Stelle der Kette von Maßnahmen steht bereits die Einweisung auf eine ***Schlaganfallstation***, was die Mortalität um 18-46%, Tod oder Abhängigkeit um 29% sowie die erforderliche Weiterbehandlung oder vollständige Pflege um 25% reduziert[195], unabhängig von Geschlecht oder Alter sowie Typ des Schlaganfalls[196].

Die ***apparative Diagnostik*** umfasst CCT, cMRT, Sonographie der extra-/ intrakraniellen Gefäße und des Herzens, Röntgen-Thorax, EKG sowie die Untersuchung allgemeiner sowie spezieller Laborparameter, welche Ausmaß und Ursache klären sollen.

Die ***akute Schlaganfallbehandlung*** besteht in der Behandlung *allgemein-medizinischer Parameter* (Vitalfunktionen, Blutzucker, Körpertemperatur, Elektrolytstatus, Blutdruck), der *Revaskularisationstherapie* und der Behandlung neurologischer (z.B. epileptische Anfälle) oder medizinischer *Komplikationen* (Pneumonie, Thrombose, Lungenembolie). Nachdem die Lysetherapie anhand Streptokinase mit einem deutlich erhöhten Blutungsrisiko sowie blutungsassoziierten Todesfällen vergesellschaftet war[197] und die intraarterielle Behandlung mit Pro-Urokinase (r-ProUK) aufgrund der aufwändigen angiographischen Technik nur spezialisierten Zentren vorbehalten ist[198], wird für ischämische Hirninfarkte die Thrombolyse anhand recombinant tissue plasminogen activator (rtPA), besonders innerhalb eines 3-Stunden-Zeitfensters[199], aber auch darüber hinaus[200], empfohlen.

Eine Aspirin-Behandlung innerhalb von 48 Stunden nach einem Schlaganfall vermindert Mortalität und Wiederauftretensrate[108,109] und kann daher allgemein empfohlen werden.

Eine Vollheparinisierung kann bei Vorliegen einer Emboliequelle indiziert sein, wie z.B. bei Vorhofflimmern, arteriellen Gefäßdissektionen oder hochgradigen arteriellen Stenosen.

Bereits vor dem Auftreten eines Schlaganfalls muss die Aufklärung der entsprechenden Personengruppen im Rahmen der ***primären Prävention*** verbessert werden. Dies betrifft verschiedene Risikofaktoren wie arteriellen Hypertonus, Herzinfarkt, Vorhofflimmern, Diabetes mellitus, erhöhte Cholesterinspiegel, Rauchen und Alkoholabusus, welche mit einem erhöhten Schlaganfallrisiko assoziiert sind und anhand entsprechender Medikamente und v.a. Änderung der Lebensumstände günstig beeinflusst werden können.

In der ***sekundären Prävention*** ist die *ASS*-Therapie in niedriger bis mittlerer Dosierung (50-325 mg täglich) als Mittel der ersten Wahl anzusehen, da eine Risikoreduktion um bis zu 25% nachgewiesen werden konnte[201,202], ggf. in Kombination mit Dipyrimidamol (Risiko-Reduktion um 37%)[202]. Ebenso kann *Clopidogrel* (75 mg) als Medikation erster Wahl empfohlen werden, hier bevorzugt für Hochrisikopatienten, wenn unter Aspirin erneut ischämische Ereignisse auftraten oder wenn Kontraindikationen für ASS vorliegen. Das Medikament verringerte das Auftreten von Gefäßereignissen gegenüber Aspirin nochmals signifikant[104]. Sollten weder Aspirin noch Clopidogrel toleriert werden, wird *Dipyrimidamol* empfohlen (Reduktion um 16,3%)[202].

Nach kardioembolischen Schlaganfällen infolge Vorhofflimmerns oder mit relevanten Emboliequellen ist eine *orale Antikoagulation* (INR 2-3) indiziert. Gleiches gilt für Patienten mit Herzklappenersatz (INR 3-4).

Weiterhin muss bei symptomatischen Carotis-Stenosen (70-99%) eine gefäßchirurgische Behandlung erwogen werden[203,204]. Endovaskuläre Gefäßbehandlungen mit oder ohne Stent-Applikation werden momentan noch als experimentelle Alternative angesehen, kontrollierte Studien mit Langzeitverläufen liegen noch nicht vor.

1.2 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

1.2.1 Allgemeines

Die Durchflusszytometrie ist eine schnelle Methode zur gleichzeitigen Analyse mehrerer miteinander in Zusammenhang stehender Parameter. Ursprünglich sollte die mikroskopische Zellanalyse mittels fluoreszierender Substrate verbessert werden, so dass die Durchflusszytometrie zum Zwecke der Zellsortierung bzw. des „flourescence-activated cell sorting“ (FACS) entwickelt wurde, welche inzwischen sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Anwendung einen hohen Stellenwert erreicht hat (siehe Kap. 1.2.4: Anwendungsgebiete). Der Entwicklungsprozess wurde deutlich vorangetrieben durch die Immunphänotypisierung der Leukämien und Lymphome, die Notwendigkeit zur CD4-Zählung im Rahmen der HIV-Infektion und der CD34-Stammzell-Bestimmung sowie Bewertung der Wiederherstellung immuner Kompetenz. Heute erfährt sie einen erneuten Aufschwung bezüglich der Detektion von antigen-spezifischen T-Zellen und dendritischen Zellen einerseits und zirkulierender metastatischer Tumorzellen auf der anderen Seite. Blut, Knochenmarks-Aspirate und Lymphknoten-Suspensionen stellen mittlerweile die für gewöhnlich am häufigsten untersuchten klinischen Materialien dar[134].

1.2.2 Aufbau und Funktionsprinzip

Ein Durchflusszytometer ist, vereinfacht ausgedrückt, ein automatisiertes Fluoreszenzmikroskop, welches auf Einzelzellebene morphologische Eigenschaften, aber auch Fluoreszenzen erfassen kann[135]. Morphologisch bedeutet dies, dass die relative Größe (Vorwärtsstreulicht – FSC) und die relative Granularität oder interne Komplexität (Seitwärtsstreulicht – SSC) der Partikel gemessen werden kann, sofern ihre Größe in den Bereich zwischen mindestens 5µm und maximal 70-75µm fällt[136].

Durchflusszytometer bestehen aus drei kombinierten Komponenten: dem *Flüssigkeitssystem* zur Zellzufuhr und -Fokussierung im Messpunkt (Abb.2), der *Optik*, bestehend aus einem luftgekühlten Laser (488nm), Linsen zur Laserstrahl-Formierung und -Fokussierung und der Sammeloptik (Sammellinse, System optischer Spiegel und Filter) (Abb.3) sowie der *Elektronik*, welche optische in relative elektronische Signale umwandelt (Abb.4) und eine Digitalisierung der Daten für die Computeranalyse vornimmt[136].

Der Vorteil gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie liegt besonders in der schnellen Messung sehr hoher Zellzahlen (10^7 in wenigen Sekunden) und der Analyse anhand von Computer und entsprechender Software begründet. Durch „gating“ können auch seltene Zellen (1 von 10^6) eines bestimmten Typs in kurzer Zeit detektiert und gemessen werden[135].

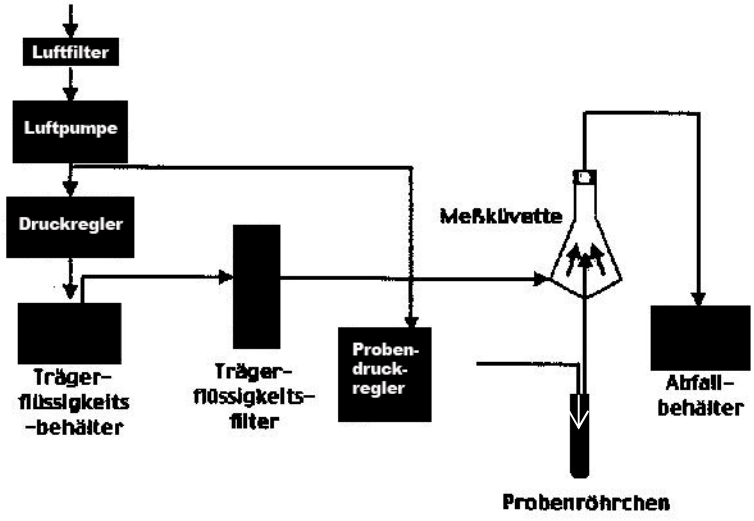

Abb. 2: Flüssigkeitssystem FACSCalibur™
(nach: Trainingshandbuch Durchflusszytometrie, 1999, BD Deutschland)

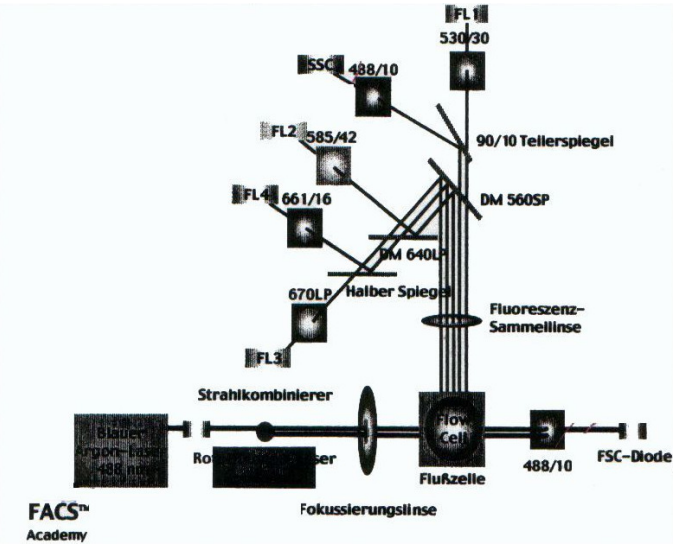

Abb. 3: Optisches System des FACSCalibur
(aus: Trainingshandbuch Durchflusszytometrie, 1999, BD Deutschland)

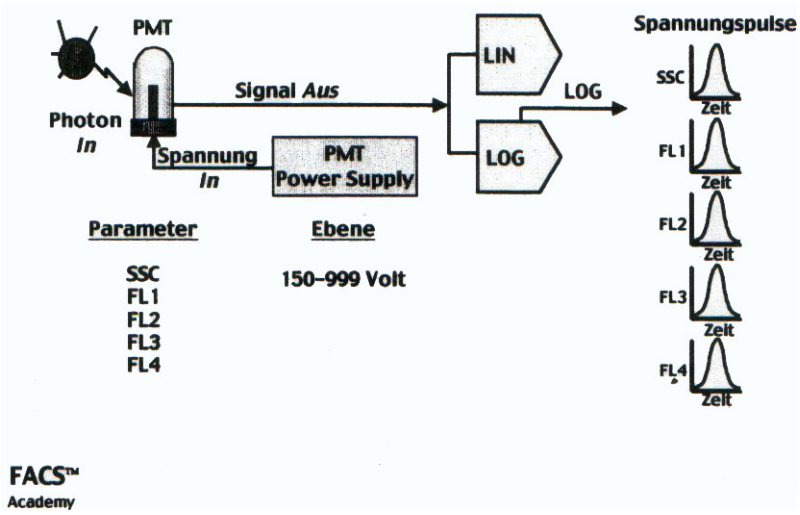

Abb. 4: Umwandlung optischer Signale in relative elektronische Signale (aus: Trainingshandbuch Durchflusszytometrie, 1999, BD Deutschland)

1.2.3 Fluorochrome Reagenzien

Fluorochrom absorbiert die Energie des einfallenden Laserlichtes und gibt sie unter freiwerdender Wärme und Emission eines Photons einer höheren Wellenlänge wieder frei[136].
Zu messende Proben können direkt (mit Fluorochrom-konjugierten, monoklonalen Antikörpern) oder indirekt (mit einem unbesetzten ersten Antikörper und später mit einem konjugierten zweiten) markiert werden. Entsprechend des für gewöhnlich genutzten Argonlasers mit einer Wellenlänge von 488 nm werden hierzu Fluorochrome verwendet, welche auf dieser Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden: Fluorescein Isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE), Propidium Iodide (PI), 7-Amino-Actinomycin D (7AAD), Peridin-Chlorophyl-A-Protein (PerCP) und Dimere von Thiazole Orange (TOTO-1). Der Einsatz anderer Fluoreszenzen bedarf der Nutzung zusätzlicher Laser.
Sollen Proben mit zwei oder mehr Fluorochromen markiert werden, stellt sich das Problem der Fluoreszenz-Überstrahlung. Die einzelnen Farbstoffe überlagern sich teilweise in ihren Emissionsspektren (Abb.5), was eine Subtraktions-Kompensation notwendig macht[137].

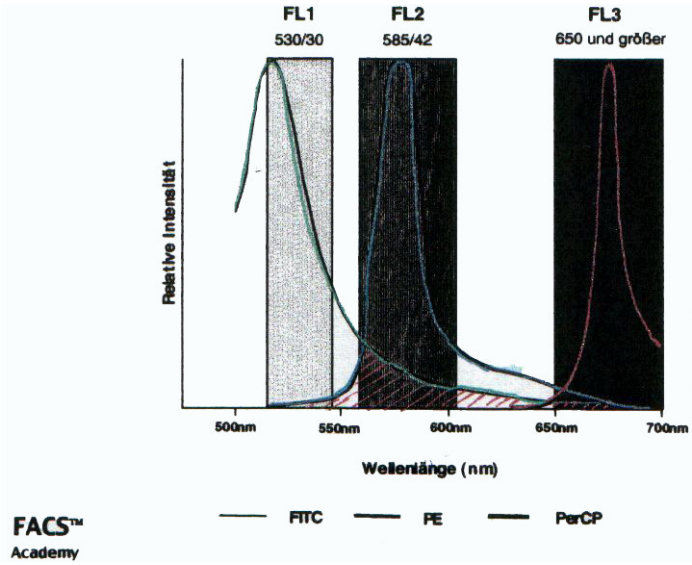

Abb. 5: Emissionsspektren (Fluoreszenz)
(aus: Trainingshandbuch Durchflusszytometrie, 1999, BD Deutschland)

1.2.4 Anwendungsgebiete

Das Gros der Anwendungsmöglichkeiten wird mit dem Bereich der **Immunphänotypisierung** (Erfassung bestimmter Antigene bzw. deren Expressionsmuster) abgedeckt. Beispielsweise können durch Untersuchung zellulärer Bestandteile des Immunsystems primäre und sekundäre *Immundefizienzen* diagnostiziert werden. Die Bestimmung der Absolutanteile bestimmter Zellpopulationen spielt bei der Stadieneinteilung und Verlaufsbeurteilung z.B. einer HIV-Erkrankung eine entscheidende Rolle.

Neben der konventionellen Zytologie, Zytogenetik und den molekularbiologischen Methoden hat die Durchflusszytometrie einen hohen Stellenwert in der Differentialdiagnostik zahlreicher *hämatologischer Erkrankungen* (Klassifikation von Leukämien u.a.) und kann auch zur Remissionskontrolle oder Diagnose von Rezidiven eingesetzt werden. Stammzell-Quantifizierungen und die Bestimmung zellulärer Bestandteile machen die Bedeutung für *Onkologie*, *Pulmonologie* und *Rheumatologie* aus, das Erkennen von Leukozytenverunreinigungen hat sich im Rahmen der *Qualitätskontrolle* von Blutprodukten bewährt und speziellen Veränderungen im Spermiogramm kann zur *Infertilitätsabklärung* nachgegangen werden.

Erst seit relativ kurzer Zeit nutzt man die Durchflusszytometrie für die Untersuchung von Thrombozyten, besonders mit dem Schwerpunkt der Risikobestimmung im Bereich der *kardiovaskulären und neurologischen Erkrankungen* (siehe Kap. 1.3.4 Funktionsstörungen)

anhand Immunphänotypisierung. Hierbei bietet sich die Durchflusszytometrie einerseits speziell zur Verlaufskontrolle von Hirn- und Myokardinfarktpatienten, bei Zuständen nach gefäßchirurgischen Eingriffen und unter Aggregationshemmer-Therapie an, ist aber andererseits ebenso geeignet zur Differentialdiagnostik der verschiedenen *Thrombozyten-Funktionsstörungen*.

Weitere Routineanwendungen beziehen sich auf die Gebiete der **HLA-Typisierung** (DD Autoimmunerkrankungen; Transplantationsmedizin), der **DNA-/RNA-Analyse** (Aneuploidie, Zellzyklusanalysen) und verschiedene **funktionelle Tests** (LDL-Rezeptoren, Zytokin-Nachweis, Phagozytose u.a.) [26,134,135].

1.2.5 Durchflusszytometrie von Thrombozyten

Zwar existieren schon seit längerem verschiedene Ansätze, die Funktion der Blutplättchen genauer zu erforschen (Untersuchungen von Plättchenfaktor 4, β-Thromboglobulin und P-Selektin im Plasma[138,139,140]; Thromboxan A_2-Metaboliten in Plasma und Urin[148,149]; Wu und Hoak –Methode zur Detektion zirkulierender Plättchen-Aggregate[151]), aber nur wenige Thrombozyten-Funktionstests haben Bedeutung für den klinischen Alltag, so z.B. die Bestimmung der Blutungszeit und die Plättchen-Aggregometrie. Beide haben jedoch größere Einschränkungen[141,142].

Auch die Durchflusszytometrie war in klinischen Studien über die Untersuchung gewaschener Plättchen bzw. plättchenreichen Plasmas[143,144] aufgrund artifizieller in vitro-Aktivierung zunächst nicht überzeugend, aber die Einführung der Verarbeitung von Vollblut durch Shattil et al[145] brachte einen großen Fortschritt: Aktivierungsstadien können anhand aktivierungsabhängiger monoklonaler Antikörper bestimmt werden und die Verwendung exogener Agonisten ermöglicht die Analyse der Reagibilität der ohne große Manipulation des Präparates in vitro.

Da Plättchen auf die Detektion und Reaktion auf geringste Veränderungen im physiologischen Gefäßmilieu spezialisiert sind, ist es außerdem sehr schwierig, die Zellen zu analysieren, ohne eine Funktionsänderung herbeizuführen. Durchflusszytometrisch können die Zellen elektronisch „isoliert“ werden, wodurch Manipulationen des Blutes vermieden werden[152].

Weiterhin machte diese Analysemethode eine größere Anzahl von Objekten sichtbar, welche leicht mit Thrombozyten verwechselt werden können. Darunter fallen Fragmente roter

Blutkörperchen oder der Plättchen selbst, Teile von Leukozyten, Immunkomplexe und Mikroorganismen[153,154,155]. Das Zytometer ist in der Lage, die meisten dieser Partikel zu identifizieren und von Plättchen zu unterscheiden.

Zusammenfassend heißt das, dass viele Plättchen-Funktionen von klinischem Interesse anhand der Durchflusszytometrie quantifiziert werden können: die Zellzahl im Vollblut, die Messung der Produktion, die Entfernung aus der Zirkulation, die Aggregation in Vollblut, individuelle Aktivierungsschritte (Konformationsänderungen an Rezeptoren, Degranulation) oder Interaktionen mit anderen Zelltypen[152].

1.2.5.1 Prinzip der Probenaufbereitung

Die Aufbereitung der Vollblut-Proben folgt einem typischen Schema: Als Antikoagulans eignet sich Citrat, die Probe wird zur Minimierung der Aggregatbildung verdünnt, die monoklonalen Antikörper werden in sättigender Konzentration zugefügt. Fixierungen können anhand 1%iger Paraformaldehyd-Lösung vorgenommen werden[146] (genaue Protokolle: Michelson and Shattil[147]).

1.2.5.2 Spezifische Antikörper und Aktivierungsmarker

Als Aktivierungsmarker gelten Antigene, welche im aktivierten Zustand der Thrombozyten quantitativ in einem anderen Verhältnis nachweisbar sind, als im ruhenden Zustand der Zellen.
Zur Messung der Expression etwaiger Antigene auf der Thrombozyten-Oberfläche werden für Vollblut-Analysen bevorzugt monoklonale Antikörper gegen die entsprechenden Rezeptoren verwendet, um unspezifische Antikörper-Bindungen durch polyklonale Antikörper zu minimieren. Bei der Nutzung direkt-konjugierter Antikörper wird auf die anschließende Besetzung mit Zweitantikörpern verzichtet und den Zellen eine Traumatisierung durch zusätzliches Waschen der Proben oder Zentrifugation erspart, was eine ungewollte Aktivierung in vitro zur Folge hätte.

Für die Untersuchung von Plättchen bietet sich die Zwei-Farben-Analyse an, anhand derer durch die Verwendung aktivierungs-unabhängiger, aber Plättchen-spezifischer Antikörper die Abgrenzung gegen rote und weiße Blutkörperchen ermöglicht wird[150].

Zur Identifizierung der Thrombozyten im Vollblut eignen sich Antikörper gegen GpIIb/IIIa[106] oder GpIb[150].
Die Plättchen-Aktivierung kann basierend auf der Quantifizierung der Oberflächenexpression von CD62p[146,152] oder CD63[152] bestimmt werden, welche im Ruhezustand der Zelle innerhalb der Granula liegen und erst nach Aktivierung exprimiert werden. CD63 stellte sich hier zwar als weniger sensitiv für den Nachweis einer Aktivierung heraus[164], sein Antikörper ist jedoch für den Nachweis von α-Storage-Pool-Defekten („Gray Platelet Syndrome"), gemeinsam verwendet mit CD62p-Antikörpern, durchaus gut geeignet[165,166].
Marker wie PAC-1 und LIBS (Ligand-induced Binding Sites) erkennen Epitope, welche im Zusammenhang mit Konformationsänderungen ebenfalls erst unter der Aktivierung auftreten[152] (siehe Kap. 1.1.3.2 Thrombozytenaktivierung und Aggregation).
Weitere Antikörper erkennen Konformationsänderungen des Liganden (Fibrinogen), welche Rezeptor-induziert sind (RIBS =Receptor-Induced Binding Sites) [146, 150].
Außerdem gelten die Erhöhung der intrazellulären F-Aktin-[167] und Calcium-Konzentration[168,169], die Bindung von Annexin V[170] und Fluorochrom-markiertem Fibrinogen[171] und andere als Nachweise der Aktivierung. Aber die wenigsten der genannten Marker sind kommerziell in größeren Mengen erhältlich oder zur Präparation von Vollblut verwendbar.

Der große Vorteil der Aktivitäts-Messung anhand immunologischer Marker liegt insbesondere in der hohen Sensitivität, auch bei sehr niedrigem Aktivierungs-Level. Konstitutionell exprimierte Antigene können nach Stimulation quantitativ vermehrt (z.B. GpIV, GpIIb/IIIa) oder vermindert (z.B. GpIb) präsentiert und zum Aktivierungsnachweis herangezogen werden[172,173,174]. Speziell im Falle von GpIb gibt es hierzu jedoch kontroverse Ansichten[175,176,177].

1.2.5.3 Mikropartikel und Thrombozytenaggregate

Die Thrombozyten-Durchflusszytometrie hat die Erklärung und Quantifizierung eines früher weitgehend unbekannten Phänomens ermöglicht: die Fragmentierung unter Aktivierung in verschiedenen Situationen[156,157,158].
Diese so genannten Mikropartikel sind zwar kleiner als reguläre Blutplättchen (ø 0,02[181] bis 0,5µm[182]), tragen jedoch ebenfalls spezifische Oberflächenmarker wie GpIIb/IIIa und GpIb/IX, und werden bei Immunthrombozytopenie, Thrombotisch Thrombozytopenischer Purpura, Heparin-induzierter Thrombozytopenie und anderen Erkrankungen nachgewiesen[159,160,161,162]. Ihre Bedeutung für thrombembolische oder atherosklerotische Prozesse ist jedoch noch weitgehend ungeklärt. Sie dienen als Katalysatoroberfläche für den Prothrombinase-Komplex. Ob sie aufgrund ihrer Oberflächenstruktur wie reguläre Thrombozyten in entstehende Aggregate einbezogen werden und ob sie über lokale Funktionen hinaus wirksam sind, steht zur Diskussion.

Auch Plättchenaggregate gelten als zusätzliche Aktivierungsmarker[163]. Patienten mit arterieller Gefäßerkrankung führen diese vermehrt im Blutstrom[178], die Aggregate sind aber auch prinzipiell nachweisbar und korrelieren mit dem erhöhten Risiko von Gefäßverschlüssen[73]. Seit den 80er Jahren weiß man, dass winzige Aggregate bereits entstehen, bevor ein Anstieg von CD62p oder β-Thromboglobulin überhaupt nachweisbar ist[179,180].

Das Vorliegen beider Zustände kann einfach anhand ihres Profils im FSC erfasst werden (Abb.6). Automatische Analysegeräte sind hierzu nicht in der Lage.

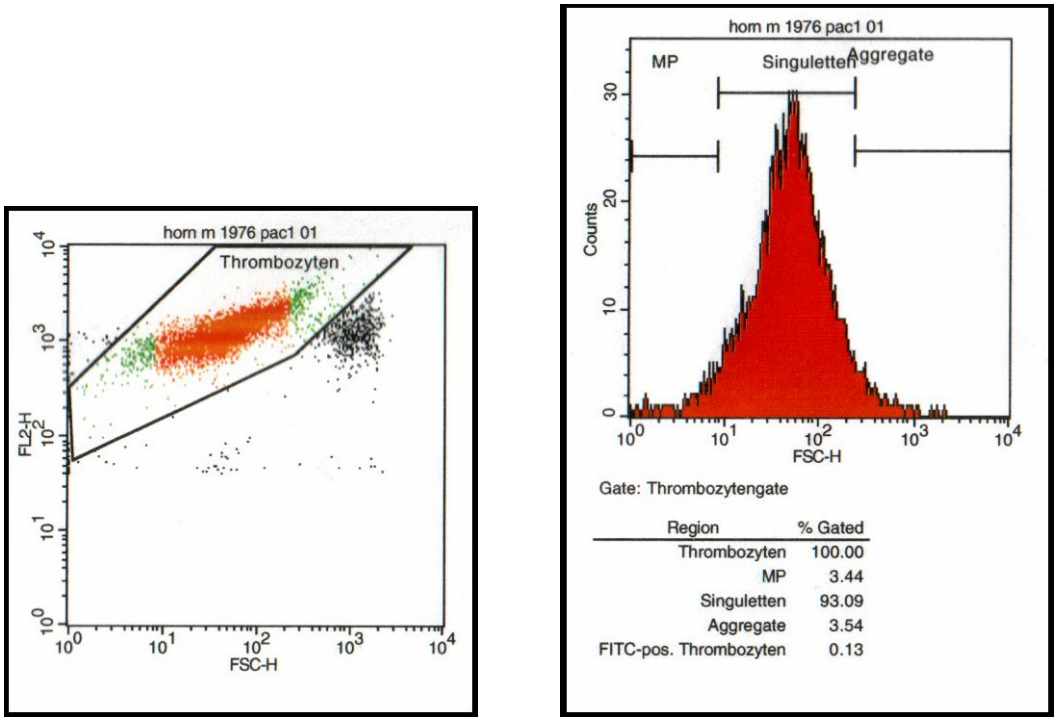

Abb. 6: Trennung der Thrombozyten von anderen Zellen (schwarz: Eryhtrozyten-Thrombozyten-Koinzidenz-Ereignisse) und Einteilung der Thrombozyten in Single Platelets, Mikropartikel und Aggregate durch Gating

1.3 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

In dieser Studie soll die Aktivität von Thrombozyten bei einer gesunden Probandengruppe im Längsschnitt untersucht werden.

Diese Studie ist ein wichtiger Bestandteil einer Gesamtstudie, in welcher neben gesunden Probanden auch neurologische Patienten mit hochgradigen Karotisstenosen, die eine thrombozytenaggregationshemmende Therapie mit ASS oder Clopidogrel in Monotherapie und ASS plus Clopidogrel in Kombination im Rahmen eines individuellen Therapieversuchs bei Indikation zur Antikoagulation, jedoch schwerwiegenden Kontraindikationen dagegen, und nach endovaskulärer, stentgeschützter Ballonangioplastie untersucht werden sollen.

Bislang ist unbekannt, wie stark die Thrombozytenaktivierung bei diesen Patienten im zeitlichen Verlauf schwankt, obwohl gerade in dieser Patientengruppe ein sehr hoher Anteil aktivierter Thrombozyten vorliegt, der mit dem Grad der Stenose zunimmt[191]. Von großem Interesse ist weiterhin die Frage nach Therapie-Nonrespondern, die nach Literaturangaben für ASS bei über 20% liegen (Grotemeyer et al.) und für Clopidogrel oder die Kombinationstherapie unbekannt ist. Die Durchflusszytometrie von Thrombozyten könnte bezüglich dieser Frage einen prädiktiven Wert besitzen.

Da aber selbst bei Gesunden unbekannt ist, mit welcher Fluktuation an aktivierten Thrombozyten im Längsschnitt zu rechnen ist, ist gerade diese Information wichtig für die Interpretation der Patientendaten.

2 PROBANDEN, MATERIAL UND METHODEN

2.1 PROBANDEN UND UNTERSUCHUNGSPLAN

2.1.1 Probanden

Die Probanden wurden 4 vor Versuchsbeginn festgelegten Gruppen zugeordnet:

- männlich, Alter 20-35 Jahre
- weiblich, Alter 20-35 Jahre
- männlich, Alter ≥ 45 Jahre
- weiblich, Alter ≥ 45 Jahre

Die Gruppenstärke betrug jeweils 10 Personen, bis auf die Gruppe „männlich, ≥ 45 Jahre“, welche 8 Personen beinhaltete. Das Probandenalter wurde wie angegeben gewählt, um sowohl ein junges als auch ein älteres Kollektiv zu untersuchen und auf Altersunterschiede vergleichen zu können.

Vor der Probanden-Rekrutierung wurden folgende *Ausschlusskriterien* festgelegt:

- Alter,
- Einnahme von Medikamenten, welche sich auf die Thrombozytenfunktion auswirken,
- bekannte Gefäßkrankheiten,
- beginnende oder manifeste Atherosklerose der A. carotis communis und interna sowie der A. vertebralis bei der extrakraniellen Farbduplexsonographie.

Zur Beurteilung der Gefäßverhältnisse der extrakraniellen, hirnversorgenden Arterien wurden alle Probanden an der Neurologischen Universitätsklinik Gießen farbduplexsonographisch untersucht und insbesondere eine beginnende Atherosklerose anhand der Messung der Intima-Media-Dicke in der A. carotis communis oder in Form atherosklerotischer Plaques, Stenosen oder von Gefäßokklusionen ausgeschlossen.
Darüber hinaus wurden alle Probanden dazu angehalten, innerhalb von mindestens 7 Tagen vor dem nächstfolgenden Blutentnahmetermin keine die Thrombozytenfunktion beeinträchtigenden Medikamente einzunehmen.

Die vorliegende Untersuchung wurde von der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität geprüft; diese hatte keine ethischen Bedenken bezüglich der Durchführung. Alle Probanden wurden vor Einschluss eingehend über die Studie aufgeklärt und stimmten der Teilnahme zu.

2.1.2 Untersuchungsplan

Die Untersuchungen erfolgten zu definierten Zeitpunkten innerhalb eines Zeitraumes von 3 Monaten nach Untersuchungsbeginn am Tag 1, Tag 4, Tag 14, Tag 30 sowie Tag 90 und umfassten jeweils die Bestimmungen zur CD62p-Expression, der PAC-1-Epitope, der gesamten ADIAflo-Messreihe sowie des Blutbildes.

2.2 REAGENZIEN

• ADIAflo™ Platelet Gp, Product No. 674 · Reagent 1 – Concentrated diluent, 15 ml · Reagent 2a – Negative Control · Reagent 2b – Anti GpIIb/IIIa (CD 41) · Reagent 2c – Anti GpIb (CD 42b) · Reagent 2d – Anti GpIIIa (CD 61) · Reagent 2e – Anti GMP 140 (CD 62p) · Reagent 3 – Calibrator · Reagent 4 – Anti IgG-FITC (· Reagent 5 – Freeze dried TRAP)	**american diagnostica inc.**, Greenwich, CT, USA
• PAC-1 – FITC, monoklonaler, fluorochrom-markierter Antikörper	**Becton Dickinson Immunocytometry Systems**, San Jose, CA, USA
• CD 42b – PE, monoklonaler, fluorochrom-markierter Antikörper	**Immunotech**, Marseille, France
• CD 62p – FITC, monoklonaler, fluorochrom-markierter Antikörper	**Immunotech**, Marseille, France
• Mouse IgG – FITC, monoklonaler, fluoro-chrommarkierter Antikörper	**Immunotech**, Marseille, France
• CaliBRITE Beads	**Becton Dickinson Immunocytometry Systems**, San Jose, CA, USA
• FACS-Clean/ FACS-Flow/ FACS-Rinse	**Becton Dickinson Immunocytometry Systems**, San Jose, CA, USA
• Aqua ad iniectabilia, 1000 ml	**Baxter S.A.**, Lessines, Belgien **Pharmacia**, Erlangen
• Aqua bidest.	
• PBS Dulbecco´s, 500 ml w/o calcium and magnesium w/o sodium bicarbonate	**GIBCO™, Invitrogen Corporation**, Auckland, N.Z., Paisley, U.K., Grand Island, NY, USA

• Glyoxal ($C_2H_2O_2$), 40%ige Lsg. in Wasser	**MERCK-Schuchardt**, Hohenbrunn
• Glycine ($C_2H_5NO_2$), gelöst in PBS	**SERVA** Electrophoresis GmbH, Heidelberg
• Paraformaldehyd Pulver	**Sigma**, MO, USA
• Natronlauge (NaOH), 1N Lösung	**MERCK**, Darmstadt
• Sysmex Manoresh MR-50	**Sysmex** Deutschland GmbH
• Sysmex Cellpack CPK-310A	**Sysmex** Deutschland GmbH

2.3 MESSGERÄTE UND SOFTWARE

• FACSCalibur Durchflusszytometer	**Becton Dickinson Immunocytometry Systems**, San Jose, CA, USA
• Power Macintosh G3	**Apple Computer GmbH**, München
• CellQuest™, Software zur Datenaufnahme und –Analyse in Verbindung mit einem Durchflusszytometer	**Becton Dickinson Immunocytometry Systems**, San Jose, CA, USA
• Sysmex Mikrocellcounter CC-170	**Sysmex** Deutschland GmbH
• Sysmex Auto Dilutor AD-241	**Sysmex** Deutschland GmbH
• Lichtmikroskop	**Zeiss**, Germany
• MS1 Minishaker	**IKA® Werke GmbH & Co. KG,** Staufen, Germany

2.4 VERARBEITUNGSZUBEHÖR

• Probenröhrchen mit Citrat-Antikoagulans, KABEVETTE, Natriumcitrat 0,1 M,	**KABE-Labortechnik**, Nümbrecht-Elsenroth
• Probenröhrchen mit EDTA-Antikoagulans, KABEVETTE, K_2-EDTA (1,5 mg/ml)	**KABE-Labortechnik**, Nümbrecht-Elsenroth
• Thrombo Plus (REF 51.334)	**Sarsted**t AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
• Butterfly 21 G grün mit Adapter	**KABE-Labortechnik**, Nümbrecht-Elsenroth
• Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 200-1000 µl, Multipette)	**Eppendorf** AG, Hamburg
• Pipettenspitzen (2,5 ml, 5,0 ml, 12,5 ml für Multipette)	**Eppendorf** AG, Hamburg
• Polystyrene Round-Bottom Tube, 5 ml	**FALCON, Becton Dickinson**
• Polystyrene Round-Bottom Tube, 5 ml, nonpyrogenic	**FALCON, Becton Dickinson**
• Blue Cap (15 ml, 50 ml)	**FALCON, Becton Dickinson**
• Zählkammer: Neubauer Improved bright-line, Tiefe 0,1mm)	**Brand** GmbH & Co KG, Wertheim
• Deckgläser: Haemacytometer, 20x26 mm	**Menzel-Gläser,** Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig

2.5 SPEZIELLE LÖSUNGEN

2.5.1 Paraformaldehyd-Lösung

Paraformaldehyd Pulver wurde in Aqua bidest. suspendiert (10% w/v). Die Suspension wurde auf 70-90°C erwärmt und tropfenweise mit 1N Natronlauge versetzt, bis die Lösung klar erschien. Die Lösung wurde bei Zimmertemperatur max. 1 Monat gelagert.

2.5.2 Fixations-Lösung

Die Fixations-Lösung wurde an jedem Versuchstag frisch hergestellt. 8 Teile 10%ige Paraformaldehyd-Lösung und ein Teil 40%ige Glyoxal-Lösung wurden mit Phosphatpuffer zu 200 Teilen gemischt (Endkonzentration: 0,4% Paraformaldehyd, 0,2% Glyoxal) und mit einem 0,22 µm Filter filtriert.

2.5.3 Verdünnungs-Lösung

Glycine wurde in Phosphatpuffer gelöst (0,2% w/v). Die Lösung wurde bei 5-8°C max. 1 Monat aufbewahrt. An jedem Versuchstag wurde die Verdünnungslösung mit einem 0,22 µm Filter filtriert.

2.6 PROBENENTNAHME UND –VERARBEITUNG

2.6.1 Entnahme der Blutproben

Zur Blutentnahme dienten die V. cubitalis bzw. die V. basilica der Probanden. Die Blutentnahme erfolgte nach einer fünfminütigen Ruhezeit, im Sitzen und mit einer Butterfly-Kanüle der Größe 21 G ohne Oberarmkompression. Das Blut wurde in drei Medien aspiriert: In Fixations-Lösung für die CD62p-Messung, in Citrat-Lösung sowohl für die Messung von PAC-1 als auch die ADIAflo™-Messreihe sowie in EDTA-Lösung zur Bestimmung des Blutbildes und der Thrombozytenzahl.

2.6.2 Präparation zur CD 62p - Bestimmung

Für die Bestimmung von CD62p wurde Vollblut im Verhältnis 1:1 mit Fixations-Lösung (siehe Kap. 2.5.2) versetzt (Endkonzentration: 0,2% Paraformaldehyd, 0,1% Glyoxal), 10 min in dieser Mischung belassen und anschließend im Verhältnis 1:10 mit Verdünnungslösung (siehe Kap. 2.5.3) verdünnt. Je 50 µl dieser fixierten und verdünnten Probe wurden mit jeweils 10 µl der monoklonalen, fluorochrom-markierten Antikörper CD 42b – PE und IgG-Mouse Isotyp – FITC bzw. CD 42b – PE und CD 62p – FITC gemischt und 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die letzte Verdünnung wurde im Verhältnis 1:5 durchgeführt. Jede Probe wurde zur Durchführung einer Doppelbestimmung zweifach angesetzt.
Dieses Fixierungsprotokoll basiert auf dem „Cyfix III-Protokoll“ einer Karlsruher Arbeitsgruppe, welches den von der Arbeitsgruppe für Durchflusszytometrie von Thrombozyten der Gesellschaft für Thrombose und Hämostase erarbeiteten Kriterien entspricht[205].

2.6.3 Präparation zur PAC-1 – Bestimmung

Zur Bestimmung von PAC-1 wurden 50 µl unfixierten Citratblutes im Verhältnis 1:20 mit Phosphatpuffer verdünnt. Wiederum 50 µl dieser verdünnten Probe wurden mit jeweils 10 µl der monoklonalen, fluorochrom-markierten Antikörper CD 42b – PE und PAC-1 – FITC in doppelter Ausführung gemischt und 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die letzte Verdünnung wurde im Verhältnis 1:5 durchgeführt.

2.6.4 Präparation zur Bestimmung der ADIAflo-Messreihe

Entsprechend der den Reagenzien beiliegenden Anleitung wurden die Proben folgendermaßen präpariert:
Zur Bestimmung der ADIAflo-Messreihe wurden 50 µl unfixierten Citratblutes mit 500 µl Puffer (mit Aqua ad iniectabilia verdünntes Reagenz 1) verdünnt. Je 20 µl IgG-Mouse, anti GpIIb/IIIa Mab (CD 41a), anti GpIb Mab (CD 42b), anti GpIIIa Mab (CD 61) und anti GMP 140 Mab (CD 62p) wurden in je eines von 5 Messgefäßen pipettiert. Anschließend wurden jedem Aliquot je 20 µl der verdünnten Blutprobe hinzugefügt, gut vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Markierung der Proben erfolgte mit je 20 µl IgG – FITC

(Reagenz 4), welche nach gutem Vermischen wiederum für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die letzte Verdünnung wurde mit 2 ml des verdünnten Reagenz 1 durchgeführt. Nach Durchführung dieser Schritte ist eine Lagerung der Proben bis zu 4 Stunden bei 2-8°C möglich.
Die zur späteren Rezeptorberechnung benötigte mittlere Fluoreszenz (Mean Fluorescence) wurde mit den der Originalpackung beiliegenden Kalibrierungskügelchen (Beads; Reagenz 3) bestimmt.

2.7 MESSUNG AM DURCHFLUSSZYTOMETER

2.7.1 Grundeinstellungen

Sämtliche Testreihen wurden am FACSCalibur Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Das Gerät arbeitet mit einem luftgekühlten 488nm Argon-Laser. Zur Erfassung der Fluoreszenzen dienen ein 530/30 Bandpassfilter für Fluoreszenz 1 (FITC), ein 585/42 Bandpassfilter für Fluoreszenz 2 (PE), ein 670 Longpassfilter für Fluoreszenz 3 (PerCP) und ein 661/16 Bandpassfilter für Fluoreszenz 4 (APC).
Sowohl die Vorwärtslichtstreuung (Forward Angle Light Scatter, FSC) als auch die Seitwärtslichtstreuung (Side Angle Light Scatter, SSC) sowie sämtliche Fluoreszenzkanäle wurden logarithmisch verstärkt.
Die Grundeinstellungen des Zytometers wurden anhand fluoreszierenden Standardkalibrierungskügelchen (CaliBRITE Beads) regelmäßig überprüft und justiert[183].
Frühere Untersuchungen zeigten, dass mit der Flussrate auch die Zahl der Koinzidenz-Ereignisse im Zytometer zunimmt[184]. Daher wurde eine maximale Flussrate von 3000 Ereignissen/s festgelegt und die Einstellung am Zytometer gegebenenfalls manuell reguliert.
Die Proben zur CD 62p- sowie zur PAC-1-Analyse wurden in Doppelbestimmung angesetzt und gemessen. Hierbei wurden jeweils 2000 Ereignisse registriert. In der ADIAflo-Testreihe wurden je Probe 5000 Ereignisse registriert.

2.7.2 Abgrenzung der Thrombozyten gegen andere Zellen

Thrombozytäre Strukturen, d.h. Singuletten, Aggregate und Mikropartikel, können im Zytometer anhand Kopplung an thrombozytenspezifische PE-markierte CD 42b-Antikörper identifiziert und im so genannten „Dot Plot“[185] von anderen Zellen oder Partikeln abgegrenzt werden. Es wurde ein Schwellenwert definiert, welcher sämtliche CD 42b-negativen Zellen und Partikel (Erythrozyten, Leukozyten etc.) von der weiteren Analyse ausschloss.

2.7.3 Differenzierung der thrombozytären Strukturen

Einzelne Thrombozyten (Singuletten), Thrombozyten-Aggregate und Thrombozyten-Mikropartikel stellen sich aufgrund verschiedener Lichtstreuung im Forward Scatter unterschiedlich dar und können daher differenziert werden. Als Vorgehensweise wurde die Methodik anderer Arbeitsgruppen angewandt[186,187,188]: Die beiden notwendigen Grenzwerte hierfür wurden mit nicht aktivierten Proben von 15 gesunden Probanden arbiträr so festgelegt, dass sich >95% aller Thrombozytenereignisse innerhalb der Grenzwerte befinden. Alle Ereignisse mit einem FSC oberhalb des oberen Grenzwertes galten von nun an als Aggregate, alle Ereignisse mit einem FSC unterhalb des unteren Grenzwertes als Mikropartikel (siehe Abb. 6).

2.7.4 Analyse CD62p- und PAC-1-positiver Thrombozyten

Die aktivierungsgekoppelte Expression von CD62p wird anhand der Fluoreszenzintensität gebundener FITC-anti-CD62p erfasst. Diese ist zwar im Vergleich zu einer PE-Markierung relativ schwächer, jedoch ist der FITC-Kanal (= FL1-Kanal) des Zytometers für Überstrahlung durch die PE-Fluoreszenz wenig empfindlich. Somit können Artefakte durch Änderung der PE-Fluoreszenz minimiert werden. Dieses Vorgehen orientiert sich an den Empfehlungen der European Working Group on Clinical Cell Analysis [189].

Für die Bestimmung der Aktivierung anhand CD62p wurde ein arbiträrer Schwellenwert anhand nicht aktivierter Proben von 15 gesunden Probanden so festgelegt, dass sich >95% aller Thrombozyten mit ihrer anti-CD62p-Fluoreszenz unter diesem befinden. Alle Thrombozyten mit

anti-CD62p-Fluoreszenz-Werten über diesem Schwellenwert werden operational als „CD62p-positiv“ oder „aktiviert“ definiert (Abb. 7).

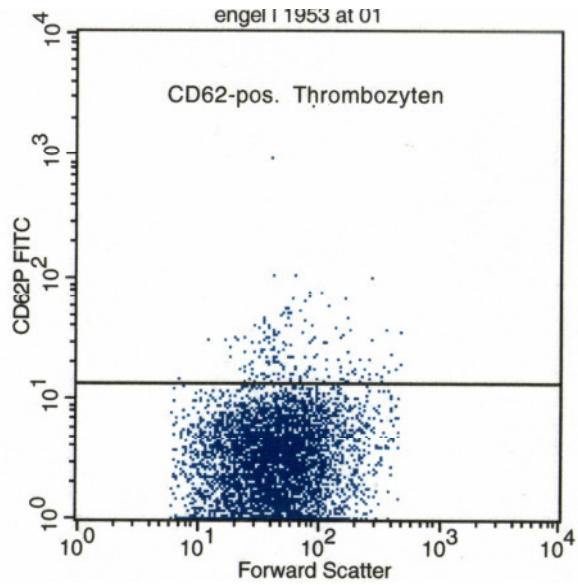

Abb.7: Graphische Darstellung eines FSC/FITS-anti CD 62p-Dot-Plots mit definiertem Schwellenwert für „aktivierte“, CD 62p-positive Thrombozyten

Die gleiche Vorgehensweise gilt auch für die Analyse der Aktivierung anhand PAC-1: Anhand nicht aktivierter Proben von 15 gesunden Probanden wurde ein arbiträrer Schwellenwert so definiert, dass sich >95% aller Thrombozyten mit ihrer anti-PAC-1-Fluoreszenz unter diesem befinden. Alle Thrombozyten mit anti-PAC-1-Fluoreszenz-Werten über diesem Schwellenwert werden operational als „PAC-1-positiv“ oder „aktiviert“ definiert.

Zur Kontrolle und Ergebnissicherung wurden je Proband und Messtag Isotyp-Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.7.5 Analyse der ADIAflo-Messreihe: CD 41, CD 42b, CD 61, CD 62p sowie Isotyp

Die Rezeptorantikörper der ADIAflo-Messreihe wurden im Rahmen der Präparation mit der Fluoreszenz FITC gekoppelt. Es handelte sich um eine Einfarben-Analyse.
Im FSC und SSC gegeneinander auftragenden Dot Plot konnte die Population der Thrombozyten durch Gating von anderen Zellformen differenziert werden (Abb.8).

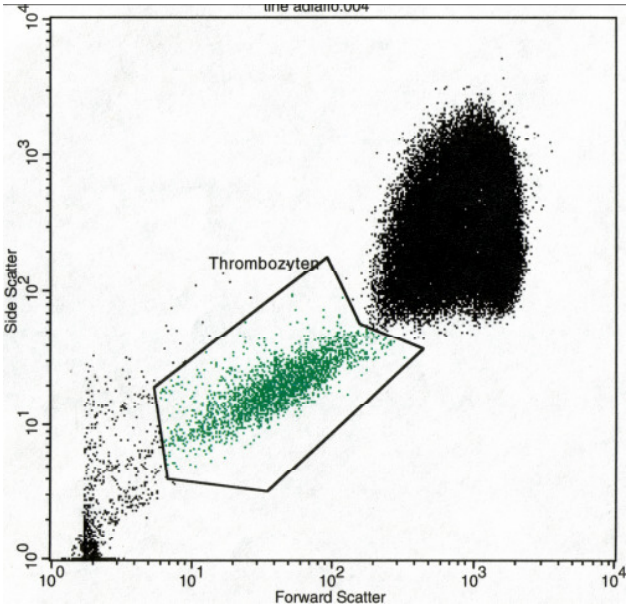

Abb.8: Graphische Darstellung eines FSC/SSC-Dot-Plots zur Identifizierung von Thrombozyten aus der Vollblutprobe am Beispiel CD 42b (ADIAflo-Messreihe)

Diese als „FITC-Marker-positive Thrombozyten“ identifizierte Population wurde in einen weiteren Plot übernommen, in welchem die so ermittelte Thrombozytenmenge jeweils gegen einen der Fluoreszenz-besetzten Rezeptor-Antikörper aufgetragen wurde (Abb.9).

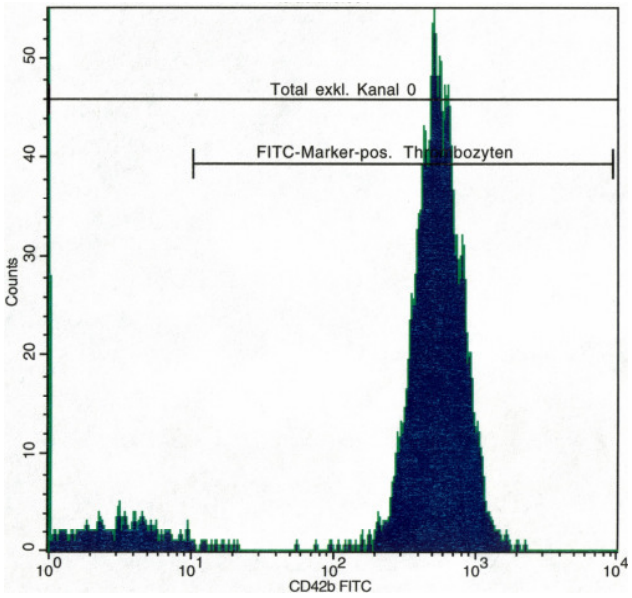

Abb.9: Rezeptorcount am Bsp. CD 42b (ADIAflo-Messreihe)

2.7.6 Berechnungen

2.7.6.1 CD 62p- und PAC-1-positive Zellen

Aufgrund Differenzierung durch Gating (siehe Kap. 2.7.3: Differenzierung thrombozytärer Strukturen) ist es möglich, anhand entsprechender Einstellungen am Durchflusszytometer sowohl die Plättchenaktivierung als auch den Anteil der Singuletten, Mikropartikel und Thrombozyten-Aggregate prozentual darzustellen. Hiermit war es möglich, anhand der ebenfalls bestimmten Thrombozytenzahl die Anzahl der positiven Zellen je µl Vollblut zu ermitteln, welche anti-CD62p bzw. anti-PAC-1 gebunden hatten. Dazu wurde für jede Zellgruppe jeweils der Mittelwert aus der Doppelbestimmung berechnet und nach den folgenden Formeln vorgegangen:

$$\text{Mikropartikel / µl} = \frac{\text{gezählte Thrombozytenzahl}}{\text{Anteil der Singuletten in \%}} \times \text{Anteil der Mikropartikel in \%}$$

$$\text{Aggregate / µl} = \frac{\text{gezählte Thrombozytenzahl}}{\text{Anteil der Singuletten in \%}} \times \text{Anteil der Aggregate in \%}$$

Diese Berechnungen erfolgten individuell für jeden Probanden sowie jeden Messtag neu.

2.7.6.2 CD 41-, CD 42b-, CD 61- sowie CD 62p-Rezeptoren im Rahmen der ADIAflo-Messreihe

Auf der ADIAflo-Originalpackung war die Anzahl der Binding Sites für den jeweiligen Rezeptor-Antikörper angegeben. Außerdem wurde anhand der beiliegenden Beads (Reagenz 3) die zur Auswertung benötigte Mean Fluorescence ermittelt. Diese Werte dienten als Datenquelle für die Erstellung eines Graphen mit der Gleichung

$$y=ax+b.$$

Neben den oben angegebenen Rezeptoren-Proben wurde je Proband und Messtag eine Isotyp-Kontrolle angesetzt und gemessen. Die resultierenden Werte wurden jeweils von der Mean Fluorescence der verschiedenen Rezeptormessungen subtrahiert.
So erfolgte die Berechnung der Rezeptorzahlen folgendermaßen:

$$\text{Rezeptorzahl} = a\,(\text{Mean Fluorescence} - \text{Isotyp}) + b.$$

Diese Berechnungen erfolgten individuell für jeden Probanden sowie jeden der 4 verschiedenen Rezeptoren pro Messtag neu.

2.8 WEITERE BESTIMMUNGEN

2.8.1 Blutbild

Die Bestimmung des Blutbildes beinhaltete die Zählung der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten sowie die Messung des Hämoglobins und des Hämatokrits. Außer der Plättchenzählung, welche mikroskopisch durchgeführt wurde, wurden alle Werte automatisch an einem Gerät der Firma „Sysmex“ bestimmt.

2.9 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Zur Auswertung des Datenmaterials wurden verschiedene Tests angewandt:
Der zeitliche Verlauf der verschiedenen Parameter wurde mit einem *Friedman-Tests* untersucht. Im Falle eines signifikanten Unterschieds wurden dann die Daten mit einem *Wilcoxon matched-pairs signed-rank test* zweiseitig/ paarweise analysiert. Für die Überprüfung eventueller Verbindungen der Ergebnisse zum jeweiligen Alter der Probanden und hinsichtlich Geschlechtsunterschieden wurde ein *Mann-Withney-U-Test* genutzt.

3 ERGEBNISSE

3.1 THROMBOZYTENZAHLEN

3.1.1 Vergleich sämtlicher Probanden

Die Anzahl der Thrombozyten betrug in der gesamten Probandenpopulation, sämtliche Messzeitpunkte gemeinsam betrachtet, zwischen 120.000/ µl (Minimum; ♂ 25J.; Tag 90) und 420.000/ µl (Maximum, ♀ 26J.; Tag 1).
Im Mittel ergab sich die geringste Zellzahl am Tag 90 mit 241.111 Plättchen/ µl, die höchste mit 264.444 Zellen/ µl am Tag 14.
Der Median betrug zwischen 242.500 Plättchen/ µl (Tag 30) und 262.500/ µl (Tag 04).

Thrombozytenzahl				
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabweichung **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**
Tag 01	259.167	62.261	247.500	36
Tag 04	262.222	45.268	262.500	36
Tag 14	264.444	53.729	247.500	36
Tag 30	246.806	61.005	242.500	36
Tag 90	241.111	56.380	245.000	36

Tab. 3.1: Thrombozytenzahlen/ µl aller Probanden insgesamt (nur kompl. Datensätze)

Im Friedman-Test konnten keine signifikanten Unterschiede der Thrombozytenzahlen zu den verschiedenen Messzeitpunkten belegt werden ($p = 0{,}21$).

3.1.2 Geschlechtsunterschiede

Im Vergleich von Frauen und Männern ergeben sich folgende Werte:

Thrombozytenzahl					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Menge **n**	Wilcoxon **p**
Tag 01 ♂	242.778	57.323	245.000	18	
♀	268.250	64.793	257.500	20	0,31
Tag 04 ♂	244.444	54.121	247.500	18	
♀	278.250	31.551	280.000	20	**< 0,05**
Tag 14 ♂	238.611	47.179	225.000	18	
♀	283.250	50.713	280.000	20	**< 0,01**
Tag 30 ♂	229.722	49.867	227.500	18	
♀	263.250	66.556	260.000	20	0,1073
Tag 90 ♂	217.059	53.650	205.000	17	
♀	262.632	50.864	245.000	19	**< 0,05**
alle ♂	234.719	52.301	230.000	89	
♀	271.212	53.928	260.000	99	**< 0,01**

Tab. 3.2: Thrombozytenzahlen nach Geschlecht getrennt

Insgesamt wiesen Männer etwas geringere Thrombozytenzahlen als Frauen auf.

Die geringste Plättchenzahl bei Frauen betrug 160.000/ µl (♀ 27J.; Tag 01), die höchste 420.000/ µl (♀ 26J.; Tag 01). Die Mittelwerte der weiblichen Probanden lagen zwischen 262.632/ µl am Tag 90 und 283.250/ µl am Tag 14. Der Median lag zwischen 245.000/ µl (Tag 90) und 280.000/ µl (Tag 04 und Tag 14)

Im männlichen Geschlecht fand sich ein Minimum von 120.000/ µl (♂ 25J.; Tag 90) und ein Maximum von 360.000/ µl (♂ 48J.; Tag 01). Die Mittelwerte zeigten hier mit Zellzahlen zwischen 217.059/ µl (Tag 90) und 244.444/ µl (Tag 04) insgesamt etwas niedrigere Thrombozytenzahlen als bei den weiblichen Probanden.
Das gleiche Phänomen kann bezüglich der Mediane zu den einzelnen Messzeitpunkten beobachtet werden: Hier bewegen sich die Zellzahlen zwischen 205.000/ µl (Tag 90) und 247.500/ µl (Tag 04).

Im zweiseitigen U-Test zeigen sich signifikante Geschlechtsunterschiede an den Messtagen 04 (p=0,03) und 90 (p=0,03), am Tag 14 (p=0,01) fiel der Test sogar hochsignifikant aus.
Ebenfalls hochsignifikant fällt der Geschlechtsunterschied aus, betrachtet man sämtliche Messzeitpunkte zusammengenommen.

3.1.3 Alterskorrelation

		Thrombozytenzahl / µl MW ± SD
Alter	≤ 35 Jahre	255.400 ± 62.17
	≥ 45 Jahre	252.273 ± 48.5
p		0,67

Tabelle 3.3: Altersunterschiede bzgl. der Thrombozytenzahlen / µl.

Der Vergleich der verschiedenen Altersgruppen zeigte keinen signifikanten Zusammenhang von Alter und Thrombozytenzahlen im untersuchten Kollektiv.

3.2 CD 62p

3.2.1 Vergleich sämtlicher Probanden

3.2.1.1 CD 62p-positive Thrombozyten (%)

Im Vergleich sämtlicher Probanden anhand der Beobachtungszeitpunkte findet man „aktivierte“, d.h. CD62p-positive Thrombozyten, d.h. prozentuale Anteile der Gesamt-Plättchenzahl, welche über einen definierten Schwellenwert hinaus gehen (siehe Kap. 2.7.4: Analyse CD62p- und PAC-1-positiver Thrombozyten). Diese Werte bewegen sich zwischen 0,25% (Minimum, ♂ 31J., Tag 01) und 21,83% (Maximum ♀ 47J., Tag 14).
Im Mittel zeigen zwischen 0,82% (Tag 90) und 2,24% dieser Zellen (Tag 14) eine Aktivierung. Der Median liegt zwischen 0,69% an den Tagen 30 und 90 und 1,21% am Tag 01.

CD 62p-positive („aktivierte“) Thrombozyten (%)				
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabweichung **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**
Tag 01	1,90	1,83	1,21	37
Tag 04	1,55	2,43	0,83	37
Tag 14	2,24	3,98	1,01	37
Tag 30	1,54	2,23	0,69	37
Tag 90	0,82	0,45	0,69	37

Tab. 3.4: CD 62p-positive (“aktivierte“) Thrombozyten (%) aller Probanden insgesamt (nur kompl. Datensätze)

Im Friedman-Test konnten keine signifikanten Unterschiede herausgestellt werden (p = 0,11).

3.2.1.2 Singuletten (single platelets) (%)

Der Anteil der einzeln vorliegenden Thrombozyten betrug im geringsten Fall 86,07% (Minimum, ♀ 25J., Tag 30), der größte Anteil lag bei 98,01% (Maximum, ♀ 25J., Tag 14). Die Mittelwerte lassen sich zwischen 95,37% (Tag 30) und 96,18% (Tag 90) einordnen.
Der Median ist jeweils zwischen 95,85% (Tag 30) und 96,21% (Tag 01) angesiedelt.

Singuletten (single platelets) (%)				
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabweichung **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**
Tag 01	95,72	1,54	96,21	37
Tag 04	95,77	1,68	96,08	37
Tag 14	95,78	1,46	96,04	37
Tag 30	95,37	2,00	95,85	37
Tag 90	96,18	0,72	96,15	37

Tab. 3.5: Singuletten (%) aller Probanden insgesamt (nur kompl. Datensätze)

Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten wurden im Friedman-Test nicht gefunden (p = 0,16).

3.2.1.3a Mikropartikel (%)

Zwischen 0,24% (Minimum, ♀ 25J., Tag 04) und 4,93% (Maximum, ♀ 49J., Tag 14) der Thrombozytenpopulation konnten als Mikropartikel identifiziert werden.
Die Mittelwerte betragen hier zwischen 1,52% (Tag 14) und 1,70% (Tag 30).
Der Median liegt zwischen 1,34% (Tag 04) und 1,64% (Tag 30).

Mikropartikel (%)				
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabweichung **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**
Tag 01	1,63	0,83	1,37	37
Tag 04	1,52	0,82	1,34	37
Tag 14	1,52	0,83	1,43	37
Tag 30	1,70	0,78	1,64	37
Tag 90	1,58	0,54	1.51	37

Tab. 3.6: Mikropartikel (%) aller Probanden insgesamt (nur kompl. Datensätze)

Auch die Zahl der Mikropartikel unterschied sich im Friedman-Test beim Vergleich der Zeitpunkte nicht signifikant (p = 0,06).

3.2.1.3b Mikropartikel / µl

Bezogen auf einen µl Vollblut bedeutet dies, dass im geringsten Fall 642 Mikropartikel (Minimum, ♀ 25J., Tag 04) gezählt wurden, die größte Anzahl betrug 11.906/ µl (Maximum, ♀ 49J., Tag 14).
Der Mittelwert bewegt sich innerhalb der Beobachtungszeitpunkte zwischen 3.962 (Tag 90) und 4.432 Mikropartikeln/ µl (Tag 30).
Der Median liegt jeweils bei Werten zwischen 3.404 (Tag 14) und 4.242 Partikeln/ µl (Tag 01).

Mikropartikel / µl				
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabweichung **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**
Tag 01	4.333	2.242,80	4.242	36
Tag 04	4.014	2.091,09	3.806	36
Tag 14	4.154	2.334,36	3.404	36
Tag 30	4.432	2.325,35	3.900	36
Tag 90	3.962	1.805,20	3.842	36

Tab. 3.7: Mikropartikel / µl aller Probanden insgesamt (nur kompl. Datensätze)

Signifikante Unterschiede fanden sich im Friedman-Test nicht (p = 0,77).

3.2.1.4a Thrombozyten-Aggregate (%)

Als bereits aggregierte Thrombozyten konnten zwischen 1,25% (Minimum, ♀ 53J., Tag 14) und 11,62% (Maximum, ♀ 25J., Tag 30) der Thrombozyten identifiziert werden.
Die Mittelwerte der verschiedenen Beobachtungszeitpunkte lagen zwischen 2,27% (Tag 90) und 3,12% (Tag 30). Der Median lag jeweils zwischen 2,18% (Tag 90) und 2,53% (Tag 14).

Thrombozyten-Aggregate (%)				
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabweichung **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**
Tag 01	2,70	1,11	2,40	37
Tag 04	2,75	1,21	2,50	37
Tag 14	2,75	1,26	2,53	37
Tag 30	3,12	1,98	2,50	37
Tag 90	2,27	0,66	2,18	37

Tab. 3.8: Aggregate (%) aller Probanden insgesamt (nur kompl. Datensätze)

Der Friedman-Test ergab einen signifikanten Unterschied (p = 0,003) der verschiedenen Messzeitpunkte, im paarweisen Vergleich durch Vorzeichen-Rangtest erwies sich die Messung am Tag 90 hochsignifikant gegenüber den anderen Messzeitpunkten erniedrigt (siehe 3.2.1.4c).

3.2.1.4b Thrombozyten-Aggregate / µl

Es wurden zwischen 2.084 (Minimum, ♂ 25J., Tag 90) und 29.234 Aggregate/ µl Vollblut (Maximum, ♂ 52J., Tag 04) gezählt. Als Mittelwerte lassen sich Zahlen zwischen 5.601 (Tag 90) und 7.961 Aggregaten/ µl (Tag 30) berechnen.
Der Median lag entsprechend zwischen 5.558 Aggregaten/ µl am Tag 90 und 6.931 Aggregaten/ µl am Tag 14.

Thrombozyten-Aggregate/ µl				
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabweichung **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**
Tag 01	7.050	2.807,31	6.623	36
Tag 04	7.545	3.942,96	6.863	36
Tag 14	7.650	3.656,65	6.931	36
Tag 30	7.961	5.064,52	6.733	36
Tag 90	5.601	1.681,49	5.558	36

Tab. 3.9: Aggregate/ µl aller Probanden insgesamt (nur kompl. Datensätze)

Der signifikante Unterschied in der prozentualen Untersuchung am Tag 90 bestätigte sich sowohl im Friedman-Test ($p = 0{,}002$), als auch im Vorzeichen-Rangtest bei der Betrachtung der totalen Anzahl von Aggregaten/ µl.

3.2.1.5 Vergleich der verschiedenen Messvariablen miteinander

3.2.1.5a Vergleich mit CD62p

Spearman ρ									
	CD62p Tag 1		CD62p Tag 4		CD62p Tag 14		CD62p Tag 30		CD62p Tag 90
% Sing – Tag 1	-0,27		-0,16		-0,21		-0,03		-0,24
% Sing – Tag 4	-0,11		-0,16		-0,29		-0,09		-0,16
% Sing – Tag 14	-0,13		-0,41	+	-0,31		-0,05		-0,26
% Sing – Tag 30	-0,44	x	-0,42	+	-0,35	+	-0,47	x	0,01
% Sing – Tag 90	-0,20		-0,11		-0,04		-0,07		-0,16
% MP - Tag 1	0,12		0,03		0,18		-0,19		0,15
% MP - Tag 4	-0,01		0,09		0,20		-0,01		0,13
% MP - Tag 14	-0,11		0,07		0,14		-0,12		0,03
% MP - Tag 30	0,36	+	0,34	+	0,20		0,27		-0,04
% MP - Tag 90	-0,20		-0,21		-0,13		-0,30		-0,04
MP/ µl - Tag 1	0,04		-0,04		0,12		-0,28		0,09
MP/ µl - Tag 4	-0,09		0,08		0,11		-0,12		0,11
MP/ µl - Tag 14	-0,17		0,04		0,06		-0,22		0,00
MP/ µl - Tag 30	0,27		0,43	x	0,24		0,19		-0,07
MP/ µl - Tag 90	-0,41	+	-0,35	+	-0,25		-0,55	x	-0,11
% Aggr. - Tag 1	0,28		0,22		0,17		0,20		0,09
% Aggr. - Tag 4	0,21		0,28		0,17		0,27		0,01
% Aggr. - Tag 14	0,19		0,35	+	0,16		0,03		0,21
% Aggr. - Tag 30	0,24		0,25		0,18		0,30		0,14
% Aggr. - Tag 90	0,44	x	0,35	+	0,08		0,40	+	0,16
Aggr./ µl - Tag 1	0,22		0,16		0,14		0,02		-0,03
Aggr./ µl - Tag 4	0,06		0,32		0,02		0,10		-0,14
Aggr./ µl - Tag 14	0,02		0,29		0,04		-0,14		0,09
Aggr./ µl - Tag 30	0,28		0,54	x	0,34	+	0,38	+	0,12
Aggr./ µl - Tag 90	0,13		0,19		0,03		-0,04		0,07

Tab. 3.10a: Vergleich der verschiedenen Variablen mit CD62p (Spearman`sche Rangkorrelation).
CD62p: „aktivierte" Thrombozyten, **Sing.**: Singuletten (single platelets), **MP**: Mikropartikel, **Aggr**.: Aggregate; **+**: signifikant ($p<0,05$) **x**: hoch-signifikant ($p<0,01$)

Im Vergleich zwischen *Singuletten* und der Expression des CD62p-Rezeptors lassen sich negative Zusammenhänge erahnen, signifikant bzw. hoch signifikant wurden diese jedoch lediglich in 5 von 25 Vergleichen. Hierbei zeigt sich eine hochsignifikante Korrelation für denselben Messzeitpunkt am Tag 30.

Für den Vergleich zwischen CD62p-positiven Thrombozyten und dem prozentualen Anteil der *Mikropartikel* sind nur für 2 Gegenüberstellungen eindeutige Zusammenhänge zu erkennen, die Ergebnisse deuten hier signifikant auf eine positive Korrelation hin. Hingegen zeigt der Vergleich mit dem Anteil der Mikropartikel/ µl sowohl signifikant positive als auch negative Zusammenhänge.

Die Gegenüberstellung der CD62p-Expression und der Bildung von *Thrombozytenaggregaten* zeigt mehrfach mindestens signifikant positive Zusammenhänge.

3.2.1.5b Vergleich mit den Singuletten

Spearman ρ										
	% Sing. Tag 1		% Sing. Tag 4		% Sing. Tag 14		% Sing. Tag 30		% Sing. Tag 90	
CD62p – Tag 1	-0,27		-0,11		-0,13		-0,44	**x**	-0,20	
CD62p – Tag 4	-0,16		-0,16		-0,41	**+**	-0,42	**+**	-0,11	
CD62p – Tag 14	-0,21		-0,29		-0,31		-0,35	**+**	-0,04	
CD62p – Tag 30	-0,03		-0,09		-0,05		-0,47	**x**	-0,07	
CD62p – Tag 90	-0,24		-0,16		-0,26		0,012		-0,16	
% MP - Tag 1	-0,63	**x**	-0,58	**x**	-0,44	**x**	-0,15		-0,41	**+**
% MP - Tag 4	-0,54	**x**	-0,71	**x**	-0,52	**x**	-0,18		-0,41	**+**
% MP - Tag 14	-0,40	**+**	-0,56	**x**	-0,62	**x**	-0,20		-0,39	**+**
% MP - Tag 30	-0,36	**+**	-0,43	**x**	-0,43	**x**	-0,64	**x**	-0,32	
% MP - Tag 90	-0,37	**+**	-0,41	**+**	-0,38	**+**	-0,01		-0,52	**x**
MP/ µl - Tag 1	-0,53	**x**	-0,44	**x**	-0,38	**+**	-0,01		-0,36	**+**
MP/ µl - Tag 4	-0,44	**x**	-0,55	**x**	-0,51	**x**	-0,10		-0,32	
MP/ µl - Tag 14	-0,28		-0,40	**+**	-0,60	**x**	-0,10		-0,34	**+**
MP/ µl - Tag 30	-0,31		-0,41	**+**	-0,53	**x**	-0,56	**x**	-0,25	
MP/ µl - Tag 90	-0,18		-0,17		-0,31		0,16		-0,27	
% Aggr. - Tag 1	-0,65	**x**	-0,41	**+**	-0,28		-0,45	**x**	-0,40	**+**
% Aggr. - Tag 4	-0,43	**x**	-0,59	**x**	-0,24		-0,50	**x**	-0,25	
% Aggr. - Tag 14	-0,33		-0,23		-0,57	**x**	-0,28		-0,24	
% Aggr. - Tag 30	-0,11		-0,15		-0,18		-0,71	**x**	-0,14	
% Aggr. - Tag 90	-0,40	**+**	-0,23		-0,25		-0,47	**x**	-0,64	**x**
Aggr./ µl - Tag 1	-0,48	**x**	-0,23		-0,23		-0,22		-0,31	
Aggr./ µl - Tag 4	-0,17		-0,19		-0,21		-0,25		-0,09	
Aggr./ µl - Tag 14	-0,03		0,06		-0,41	**+**	0,01		-0,10	
Aggr./ µl - Tag 30	-0,11		-0,22		-0,43	**x**	-0,71	**x**	-0,16	
Aggr./ µl - Tag 90	-0,22		-0,09		-0,30		-0,16		-0,40	**+**

Tab. 3.10b: Vergleich der verschiedenen Variablen mit den Singuletten (Spearman`sche Rangkorrelation).
CD62p: „aktivierte" Thrombozyten, **Sing.**: Singuletten (single platelets), **MP**: Mikropartikel, **Aggr.**: Aggregate; **+**: signifikant ($p<0,05$) **x**: hoch-signifikant ($p<0,01$)

Der Vergleich von Singuletten *CD62p-positiven Zellen* lässt negative Zusammenhänge erahnen, signifikant bzw. hoch signifikant wurden diese jedoch lediglich in 5 von 25 Vergleichen. Hierbei zeigt sich eine hochsignifikante Korrelation für denselben Messzeitpunkt am Tag 30.

Bezüglich des prozentualen Anteils von *Mikropartikeln* zeigen sich im Vergleich mit den Singuletten in 20 von 25 Gegenüberstellungen signifikant negative Zusammenhänge. Diese Korrelation bestätigt sich auch im Vergleich der Mikropartikel/ µl.

Ähnlich sieht das Ergebnis den Vergleich zwischen *Aggregaten* und Singuletten betreffend aus, auch hier zeigen sich signifikant negative Zusammenhänge.

3.2.1.5c Vergleich mit den Mikropartikeln

Spearman ρ										
	% MP Tag 1		% MP Tag 4		% MP Tag 14		% MP Tag 30		% MP Tag 90	
CD62p – Tag 1	0,12		-0,01		-0,11		0,36	+	-0,20	
CD62p – Tag 4	0,03		0,09		0,07		0,34	+	-0,21	
CD62p – Tag 14	0,18		0,20		0,14		0,20		-0,13	
CD62p – Tag 30	-0,19		-0,01		-0,12		0,27		-0,30	
CD62p – Tag 90	0,15		0,13		0,03		-0,04		-0,04	
% Sing – Tag 1	-0,63	x	-0,54	x	-0,40	+	-0,36	+	-0,37	+
% Sing – Tag 4	-0,58	x	-0,71	x	-0,56	x	-0,43	x	-0,41	+
% Sing – Tag 14	-0,44	x	-0,52	x	-0,62	x	-0,43	x	-0,38	+
% Sing – Tag 30	-0,15		-0,18		-0,20		-0,64	x	-0,01	
% Sing – Tag 90	-0,41	+	-0,41	+	-0,39	+	-0,32		-0,52	x
MP/ µl - Tag 1	0,91	x	0,65	x	0,71	x	0,36	+	0,55	x
MP/ µl - Tag 4	0,75	x	0,95	x	0,82	x	0,59	x	0,67	x
MP/ µl - Tag 14	0,69	x	0,70	x	0,94	x	0,54	x	0,69	x
MP/ µl - Tag 30	0,50	x	0,61	x	0,67	x	0,91	x	0,39	+
MP/ µl - Tag 90	0,58	x	0,57	x	0,76	x	0,32		0,78	x
% Aggr. - Tag 1	-0,05		-0,02		-0,16		0,04		-0,17	
% Aggr. - Tag 4	-0,08		-0,02		-0,14		0,07		-0,24	
% Aggr. - Tag 14	-0,09		-0,10		-0,16		-0,03		-0,20	
% Aggr. - Tag 30	-0,28		-0,28		-0,32		0,06		-0,38	+
% Aggr. - Tag 90	-0,08		-0,08		-0,14		0,10		-0,20	
Aggr./ µl - Tag 1	-0,01		-0,08		-0,11		-0,07		-0,22	
Aggr./ µl - Tag 4	-0,22		-0,20		-0,18		-0,09		-0,40	+
Aggr./ µl - Tag 14	-0,20		-0,20		-0,16		-0,09		-0,22	
Aggr./ µl - Tag 30	-0,11		-0,01		0,06		0,26		-0,17	
Aggr./ µl - Tag 90	0,04		-0,02		0,09		0,01		-0,16	

Tab. 3.10c: Vergleich der verschiedenen Variablen mit den Mikropartikeln (Spearman`sche Rangkorrelation). **CD62p**: „aktivierte" Thrombozyten, **Sing.**: Singuletten (single platelets), **MP**: Mikropartikel, **Aggr**.: Aggregate; **+**: signifikant ($p<0,05$) **x**: hoch-signifikant ($p<0,01$)

Für den Vergleich zwischen *CD62p-positiven Thrombozyten* und dem prozentualen Anteil der Mikropartikel sind nur für 2 Gegenüberstellungen eindeutige Zusammenhänge zu erkennen, die Ergebnisse deuten hier signifikant auf eine positive Korrelation hin.

Bezüglich des Vergleiches mit den *Singuletten* zeigen sich überwiegend signifikant negative Zusammenhänge.

Zwischen *Aggregaten* und Mikropartikeln lassen sich negative Zusammenhänge erahnen, jedoch nur je einmalig beim Vergleich mit dem prozentualen Anteil bzw. dem Anteil der Aggregate/ µl nachweisen.

3.2.1.5d Vergleich mit den Aggregaten

Spearman ρ										
	% Aggr. Tag 1		% Aggr. Tag 4		% Aggr. Tag 14		% Aggr. Tag 30		% Aggr. Tag 90	
CD62p – Tag 1	0,28		0,21		0,19		0,24		0,44	**x**
CD62p – Tag 4	0,22		0,28		0,35	**+**	0,25		0,35	**+**
CD62p – Tag 14	0,17		0,17		0,16		0,18		0,08	
CD62p – Tag 30	0,20		0,27		0,03		0,30		0,40	**+**
CD62p – Tag 90	0,09		0,01		0,21		0,14		0,16	
% Sing – Tag 1	-0,65	**x**	-0,43	**x**	-0,33		-0,11		-0,40	**+**
% Sing – Tag 4	-0,41	**+**	-0,59	**x**	-0,23		-0,15		-0,23	
% Sing – Tag 14	-0,28		-0,24		-0,57	**x**	-0,18		-0,25	
% Sing – Tag 30	-0,45	**x**	-0,50	**x**	-0,28		-0,71	**x**	-0,47	**x**
% Sing – Tag 90	-0,40	**+**	-0,25		-0,24		-0,14		-0,64	**x**
% MP - Tag 1	-0,05		-0,08		-0,09		-0,28		-0,06	
% MP - Tag 4	-0,02		-0,02		-0,10		-0,28		-0,08	
% MP - Tag 14	-0,16		-0,14		-0,16		-0,32		-0,14	
% MP - Tag 30	0,04		0,07		-0,03		0,06		0,10	
% MP - Tag 90	-0,17		-0,24		-0,20		-0,38	**+**	-0,20	
MP/ µl - Tag 1	-0,13		-0,16		-0,06		-0,39	**+**	-0,06	
MP/ µl - Tag 4	-0,15		-0,18		-0,10		-0,35	**+**	-0,19	
MP/ µl - Tag 14	-0,26		-0,22		-0,13		-0,36	**+**	-0,16	
MP/ µl - Tag 30	-0,01		0,01		0,001		-0,02		0,05	
MP/ µl - Tag 90	-0,30		-0,17	**x**	-0,24		-0,51	**x**	-0,31	
Aggr./ µl - Tag 1	0,69	**x**	0,50	**x**	0,47	**x**	0,29		0,52	**x**
Aggr./ µl - Tag 4	0,41	**+**	0,71	**x**	0,54	**x**	0,37	**+**	0,36	**+**
Aggr./ µl - Tag 14	0,18		0,16		0,74	**x**	0,13		0,18	
Aggr./ µl - Tag 30	0,38	**+**	0,43	**x**	0,37	**+**	0,73	**x**	0,43	**x**
Aggr./ µl - Tag 90	0,31		0,04		0,34	**+**	0,07		0,65	**x**

Tab. 3.10d: Vergleich der verschiedenen Variablen mit den Aggregaten (Spearman`sche Rangkorrelation). **CD62p**: „aktivierte" Thrombozyten, **Sing.**: Singuletten (single platelets), **MP**: Mikropartikel, **Aggr**.: Aggregate; **+**: signifikant ($p<0,05$) **x**: hoch-signifikant ($p<0,01$)

Die Gegenüberstellung der *CD62p-Expression* und der Bildung von Thrombozytenaggregaten zeigt mehrfach mindestens signifikant positive Zusammenhänge.

Für den Vergleich mit dem Anteil an *Singuletten* zeigen sich wiederholt meist hochsignifikante negative Zusammenhänge.
Der Vergleich von *Mikropartikeln* und Aggregaten deutet ebenfalls auf negative Zusammenhänge, wird aber nur in einigen direkten Gegenüberstellungen auch signifikant.

3.2.2 Geschlechtsunterschiede

3.2.2.1 CD 62p-positive Thrombozyten (%)

Betrachtet man den Anteil „aktivierter“ Plättchen im männlichen und weiblichen Geschlecht getrennt voneinander, ergeben sich folgende Werte:

CD 62p-positive (“aktivierte“) Thrombozyten (%)					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Menge **n**	U-Test **p**
Tag 01 ♂	1,71	1,71	1,28	18	
♀	1,99	1,95	1,13	20	0,60
Tag 04 ♂	1,87	3,29	0,82	18	
♀	1,27	1,15	0,93	20	0,95
Tag 14 ♂	1,76	2,82	0,99	18	
♀	2,61	4,75	1,16	20	0,63
Tag 30 ♂	1,11	0,91	0,68	18	
♀	1,91	2,90	0,73	20	0,83
Tag 90 ♂	0,78	0,36	0,69	17	
♀	0,86	0,52	0,74	20	0,88
Alle ♂	1,45	2,13	0,82	89	
♀	1,73	2,71	0,91	100	0,49

Tab. 3.11: CD 62p-positive (“aktivierte“) Thrombozyten (%) nach Geschlecht getrennt

Der geringste Anteil „aktivierter“ Thrombozyten findet sich unter den weiblichen Probanden bei einem Wert von 0,27% (Minimum,♀ 26J., Tag 30), der höchste bei 21,83% (Maximum,♀ 47J., Tag 14).
Die Mittelwerte liegen bei den Probandinnen zwischen 0,86% (Tag 90) und 2,61% (Tag 14).
Der Median liegt jeweils im Intervall zwischen 0,73% (Tag 30) und 1,16% (Tag 14).

Beim männlichen Probandengut findet sich ein Minimum von 0,25% (♂ 31J.,Tag 01) und ein Maximum von 14,45% (♂ 52J., Tag 04) „aktivierter“ Zellen.
Die Mittelwerte der einzelnen Beobachtungszeitpunkte befinden sich im Intervall zwischen 0,78% (Tag 90) und 1,87% (Tag 04).
Der Median liegt jeweils zwischen 0,68% (Tag 30) und 1,28% (Tag 01).

Im zweiseitigen U-Test konnten keine signifikanten Geschlechtsunterschiede aufgezeigt werden.

3.2.2.2 Singuletten (single platelets) (%)

In der Betrachtung des weiblichen und des männlichen Geschlechts unabhängig voneinander bezüglich des Anteils singulärer Thrombozyten, kann man folgende Beobachtungen machen:

Singuletten (single platelets) (%)					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Menge **n**	U-Test **p**
Tag 01 ♂	95,18	1,93	95,97	18	
♀	96,22	0,80	96,41	20	**p < 0,05**
Tag 04 ♂	95,23	2,16	95,89	18	
♀	96,28	0,77	96,47	20	**p < 0,05**
Tag 14 ♂	95,49	1,50	95,91	18	
♀	96,04	1,38	96,39	20	0,10
Tag 30 ♂	95,20	1,33	95,46	18	
♀	95,51	2,44	96,05	20	0,10
Tag 90 ♂	95,94	0,63	95,85	17	
♀	96,39	0,73	96,55	20	**p < 0,05**
Alle ♂	95,40	1,60	95,85	89	
♀	96,09	1,40	96,38	100	**p < 0,001**

Tab. 3.12: Singuletten (single platelets) (%) nach Geschlecht getrennt

Bei den weiblichen Probanden haben die einzeln vorliegenden Blutplättchen einen Anteil zwischen 86,07% (Minimum, ♀ 25J., Tag 30) und 98,01% der gesamten Plättchenmenge (Maximum, ♀ 25J., Tag 14). Der Mittelwert liegt hier jeweils zwischen 95,51% (Tag 30) und 96,39% (Tag 90).
Als Mediane werden zu den einzelnen Beobachtungszeitpunkten Werte zwischen 96,05% (Tag 30) und 96,55% (Tag 90) berechnet.

Für das männliche Geschlecht wurden Singuletten-Anteile zwischen 87,55% (Minimum, ♂ 52J.,Tag 04) und 97,30% (Maximum, ♂ 26J., Tag 90) bestimmt, was etwa den Ergebnissen der weiblichen Probandinnen entspricht.

Die Mittelwerte können zwischen 95,18% am Tag 01 und 95,94% am Tag 90 festgelegt werden.
Der Median umfasst ein Intervall zwischen 95,46% (Tag 30) und 95,97% (Tag 01).

Im zweiseitigen U-Test konnten signifikante Geschlechtsunterschiede zu den Beobachtungszeitpunkten Tag 01, Tag 04, Tag 90 und für die Gesamtkohorte nachgewiesen werden.

3.2.2.3a Mikropartikel (%)

Beobachtet man den Anteil der Mikropartikel nach Geschlechtern getrennt, kann man folgendes sehen:

Mikropartikel (%)					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Menge **n**	U-Test **p**
Tag 01 ♂	1,79	0,89	1,62	18	
♀	1,49	0,74	1,35	20	0,33
Tag 04 ♂	1,69	0,92	1,43	18	
♀	1,39	0,67	1,17	20	0,43
Tag 14 ♂	1,51	0,51	1,46	18	
♀	1,53	1,04	1,33	20	0,53
Tag 30 ♂	1,84	0,88	1,58	18	
♀	1,59	0,67	1,72	20	0,40
Tag 90 ♂	1,69	0,51	1,53	17	
♀	1,49	0,56	1,49	20	0,27
Alle ♂	1,71	0,76	1,49	89	
♀	1,50	0,74	1,39	100	0,07

Tab. 3.13: Mikropartikel (%) nach Geschlecht getrennt

Zwischen 0,24% (Minimum, ♀ 25J., Tag 04) und 4,93% der gesamten Thrombozytenpopulation (Maximum, ♀ 49J., Tag 14) liegen bei den weiblichen Probanden in Form von Mikropartikeln vor.
Die Mittelwerte liegen hier zwischen 1,39% (Tag 04) und 1,59% (Tag 30).

Der Median befindet sich jeweils in einem Bereich zwischen 1,17% (Tag 04) und 1,72% (Tag 30)

Die männlichen Probanden zeigten einen Anteil von zwischen 0,65% (Minimum, ♂ 26J., Tag 14) und 4,13% Mikropartikeln (Maximum, ♂ 27J., Tag 01). Als Mittelwerte lassen sich Anteile zwischen 1,51% am Tag 14 und 1,84% am Tag 30 bestimmen.
Der Median liegt jeweils bei Werten zwischen 1,43% (Tag 04) und 1,62% (Tag 01).

Signifikante Geschlechtsunterschiede konnten nicht aufgezeigt werden.

3.2.2.3b Mikropartikel / µl

Der absolute Anteil Mikropartikel je µl beträgt nach Geschlechtern getrennt:

Mikropartikel / µl					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Menge **n**	U-Test **p**
Tag 01 ♂	4.432	2.042,64	4.242	18	
♀	4.164	2.359,72	3.793	20	0,60
Tag 04 ♂	4.216	2.346,76	3.806	18	
♀	4.004	1.957,18	3.851	20	0,98
Tag 14 ♂	3.781	1.493,54	3.404	18	
♀	4.409	2.814,84	3.594	20	1,00
Tag 30 ♂	4.529	2.297,78	4.365	18	
♀	4.447	2.341,29	3.900	20	0,88
Tag 90 ♂	3.901	1.868,55	3.844	17	
♀	4.016	1.796,20	3.839	19	0,84
Alle ♂	4.175	2.010,3	3.844	89	
♀	4.210	2.247,1	3838	99	0,919

Tab. 3.14: Mikropartikel / µl nach Geschlecht getrennt

Bei den weiblichen Probanden wurden zwischen 642 (Minimum, ♀ 25J., Tag 04) und 11.906 Zellen/ µl (Maximum, ♀ 49J., Tag 14) als Mikropartikel identifiziert. Die Mittelwerte umfassen Partikelzahlen zwischen 4.004/ µl am Tag 04 und 4.447/ µl am Tag 30. Der Median ist jeweils zwischen 3.594 Zellen/ µl (Tag 14) und 3.900 Zellen/ µl (Tag 30) gelegen.

Zwischen 1.266 (Minimum, ♂ 27J., Tag 30) und 11.606 Mikropartikel/ µl Vollblut (Maximum, ♂ 52J., Tag 04) konnten bei den männlichen Probanden gezählt werden. Die Mittelwerte wurden für einen Bereich zwischen 3.781 (Tag 14) und 4.529 Partikeln/ µl (Tag 30) berechnet. Der Median beträgt zwischen 3.404 (Tag 14) und 4.365 Mikropartikeln/ µl (Tag 30).

Im zweiseitigen U-Test konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Probanden verschiedenen Geschlechts festgestellt werden.

3.2.2.4a Thrombozyten-Aggregate (%)

Der Anteil der aggregierten Blutplättchen betrug in den einzelnen Geschlechtern wie folgt:

Thrombozyten-Aggregate (%)					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Menge **n**	U-Test **p**
Tag 01 ♂	3,07	1,32	2,54	18	
♀	2,34	0,73	2,34	20	0,06
Tag 04 ♂	3,13	1,57	2,58	18	
♀	2,38	0,54	2,32	20	**< 0,05**
Tag 14 ♂	3,04	1,53	2,56	18	
♀	2,48	0,86	2,43	20	0,12
Tag 30 ♂	3,28	1,65	2,78	18	
♀	2,96	2,23	2,29	20	**< 0,05**
Tag 90 ♂	2,42	0,62	2,41	17	
♀	2,15	0,68	1,94	20	0,06
Alle ♂	2,99	1,40	2,59	89	
♀	2,46	1,19	2,24	100	**< 0,001**

Tab. 3.15: Thrombozyten-Aggregate (%) nach Geschlecht getrennt

Im weiblichen Geschlecht betrug der minimale Anteil von Aggregaten an der Gesamtmenge der Thrombozyten 1,25% (Minimum, ♀ 53J., Tag 14), der maximale Anteil betrug 11,62% (Maximum, ♀ 25J., Tag 30). Die Mittelwerte der jeweiligen Beobachtungszeitpunkte sind zwischen 2,15% (Tag 90) und 2,96% (Tag 30) einzuordnen. Beim Median handelt es sich um Bereiche zwischen 1,94% (Tag 90) und 2,43% (Tag 14).

Die männlichen Probanden wiesen einen Anteil von zwischen 1,35% (Minimum, ♂ 25J., Tag 90) und 9,17% Aggregate (Maximum, ♂ 52J., Tag 30) auf. Die Mittelwerte bewegten sich zwischen 2,42% am Tag 90 und 3,28% am Tag 30. Für den Median gilt ein Intervall zwischen 2,41% (Tag 90) und 2,78% (Tag 30).

Statistisch ergaben sich signifikante Geschlechtsunterschiede zwischen dem männlichen und dem weiblichen Geschlecht an den Tagen 04, 30 und für alle Messwerte.

3.2.2.4b Thrombozyten-Aggregate / µl

Die nach Geschlechtern getrennte Untersuchung der totalen Anzahl von Aggregaten/ µl ergab folgende Ergebnisse:

Thrombozyten-Aggregate/ µl					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Menge **n**	U-Test **p**
Tag 01 ♂	7.625	3.045,99	6.886	18	
♀	6.509	2.471,65	5.992	20	0,26
Tag 04 ♂	8.126	5.441,03	7.173	18	
♀	6.794	1.364,54	6.682	20	0,43
Tag 14 ♂	7.601	4.194,98	6.465	18	
♀	7.409	3.115,20	7.207	20	0,77
Tag 30 ♂	7.974	5.046,92	6.733	18	
♀	7.814	4.968,72	6.579	20	0,73
Tag 90 ♂	5.364	1.444,96	5.650	17	
♀	5.812	1.881,91	5.466	19	0,81
Alle ♂	7.36	4.147,8	6.459	89	
♀	6.88	3.059,7	6.270	99	0,57

Tab. 3.16: Thrombozyten-Aggregate/ µl nach Geschlecht getrennt

Die weiblichen Probanden zeigten zwischen 3.042 (Minimum, ♀ 53J., Tag 14) und 26.316 Aggregate/ µl Vollblut (Maximum, ♀ 25J., Tag 30). Die Mittelwerte betreffend ergab sich ein Bereich zwischen 5.812 (Tag 90) und 7.814 Aggregaten/ µl Vollblut (Tag 30). Der Median liegt mit 5.466 Aggregate/ µl Vollblut am Tag 90 am niedrigsten, den höchsten Wert erreicht er mit 7.207 Aggregaten/ µl Vollblut am Tag 14.

Beim männlichen Geschlecht wurden zwischen 2.084 (Minimum, ♂ 25J., Tag 90) und 29.234 Aggregate/ µl Vollblut (Maximum, ♂ 52J., Tag 04) gemessen.
Die Mittelwerte lagen im Bereich zwischen 5.364 (Tag 90) und 8.126 Aggregaten/ µl Vollblut (Tag 04). Der Median liegt jeweils zwischen 5.650 (Tag 90) und 7.173 Aggregaten/ µl Vollblut (Tag 04).

Signifikante Unterschiede zwischen dem männlichen und dem weiblichen Geschlecht konnten nicht nachgewiesen werden.

3.2.2.5 Geschlechtsunterschiede für alle Variablen gepoolt

Geschlechtsunterschiede					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Menge **n**	U-Test **p**
CD62p(%) ♂	1,45	2,13	0,82	89	
♀	1,73	2,71	0,91	100	0,49
Sing.(%) ♂	95,40	1,60	95,85	89	
♀	96,09	1,40	96,38	100	**<0,0001**
MP (%) ♂	1,71	0,76	1,49	89	
♀	1,50	0,74	1,39	100	0,07
MP/ µl ♂	4.175	2.010	3.844	89	
♀	4.210	2.247	3.839	99	0,92
Aggr.(%) ♂	2,99	1,40	2,59	89	
♀	2,46	1,19	2,24	100	**<0,0001**
Aggr./ µl ♂	7.360	4.148	6.460	89	
♀	6.878	3.058	6.271	99	0,57

Tab. 3.17: Geschlechtsunterschiede, gepoolt für alle Variablen
CD62p: „aktivierte" Thrombozyten, **Sing.**: Singuletten (single platelets), **MP**: Mikropartikel, **Aggr**.: Aggregate

Im Gesamt-Vergleich zwischen Männern und Frauen stellten sich hochsignifikante Unterschiede sowohl im prozentualen Anteil der einzeln vorliegenden Zellen (single platelets) als auch im prozentualen Anteil der Thrombozytenaggregate heraus.

3.2.3 Alterskorrelation

		% CD62p MW ± SD	% Sing. MW ± SD	% MP MW ± SD	% Aggr. MW ±SD	MP/ µl MW ± SD	Aggr./ µl MW ± SD
Alter	≤ 35 Jahre	1,30 ± 1,67	96,0 ± 1,6	1,36 ± 0,73	2,71 ± 1,21	3554 ± 1924	7057 ± 2970
	≥ 45 Jahre	1,94 ± 3,09	95,5 ± 1,4	1,85 ± 0,70	2,72 ± 1,43	4919 ± 2134	7162 ± 4244
p		**< 0,01**	**< 0,01**	**< 0,01**	0,22	**< 0,01**	0,30

Tab. 3.18: Beziehung der angegebenen Komponenten zum Alter der Probanden;
CD62p: „aktivierte" Thrombozyten, **Sing.**: Singuletten (single platelets), **MP**: Mikropartikel, **Aggr**.: Aggregate
n. s.: nicht signifikant

Ein hochsignifikant Zusammenhang bestand im U-Test zwischen dem Alter der Probanden und dem Prozentsatz von aktivierten Plättchen sowie von Singuletten und Mikropartikeln. Zusammenhänge zwischen Alter und dem Anteil der Aggregate wurden nicht signifikant.

3.3 PAC-1

3.3.1 Vergleich sämtlicher Probanden

3.3.1.1 PAC-1-positive Thrombozyten (%)

Im Verlauf der 90-tägigen Beobachtungszeit traten im Rahmen der PAC 1-Untersuchungen Thrombozytenaktivierungen zwischen 0,02% (Minimum, ♀ 47J., Tag 01) und bis zu 22,39% (Maximum, ♂ 51J., Tag 30) auf. Die Mittelwerte umfassen lediglich ein Spektrum zwischen 1,38% (Tag 14) und 2,51% (Tag 30). Der Median liegt jeweils zwischen 0,43% (Tag 14) und 0,73% (Tag 30).

PAC 1-positive „aktivierte" Thrombozyten (%)				
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabweichung **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**
Tag 01	1,89	2,96	0,64	37
Tag 04	1,49	2,18	0,51	37
Tag 14	1,38	1,57	0,43	37
Tag 30	2,51	5,08	0,73	37
Tag 90	1,87	2,31	0,68	37

Tab. 3.19: PAC 1-positive „aktivierte" Thrombozyten (%) aller Probanden insgesamt (nur kompl. Datensätze)

Im Friedman-Test konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Messtagen gefunden werden ($p = 0,72$).

3.3.1.2 Singuletten (single platelets) (%)

Der minimale Anteil einzeln zirkulierender Thrombozyten betrug 81,12% (Minimum, ♀ 24J., Tag 30), der größte Anteil wurde mit 96,96% (Maximum, ♂ 29J., Tag 90) gemessen. Die Mittelwerte konnten für die einzelnen Beobachtungszeitpunkt zwischen 93,27% (Tag 04) und 93,63% (Tag 14) festgelegt werden. Der Median bewegte sich jeweils zwischen 94,48% am Tag 14 und 94,73% am Tag 04.

Singuletten (single platelets) (%)				
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabweichung **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**
Tag 01	93,46	3,00	94,50	37
Tag 04	93,27	3,56	94,73	37
Tag 14	93,63	2,80	94,48	37
Tag 30	93,62	3,17	94,52	37
Tag 90	93,57	3,24	94,70	37

Tab. 3.20: Singuletten (%) aller Probanden insgesamt (nur kompl. Datensätze)

Der Friedman-Test ergab keine signifikanten Unterschiede (p = 0,86).

3.3.1.3a Mikropartikel (%)

Mikropartikel konnten zu Anteilen zwischen 0,58% (Minimum, ♀ 25J., Tag 30) und 5,40% der Gesamt-Thrombozyten (Maximum, ♂ 47J., Tag 04) identifiziert werden. Die Mittelwerte lagen entsprechend zwischen 1,88% (Tag 30) und 2,17% (Tag 01). Für den Median ergab dies eine Spanne zwischen 1,80% an den Tagen 30 und 90 und 2,03% am Tag 04.

Mikropartikel (%)				
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabweichung **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**
Tag 01	2,17	0,98	1,96	37
Tag 04	2,14	1,08	2,03	37
Tag 14	1,97	0,87	1,83	37
Tag 30	1,88	0,80	1,80	37
Tag 90	1,93	0,84	1,80	37

Tab. 3.21: Mikropartikel (%) aller Probanden insgesamt (nur kompl. Datensätze)

Im Friedman-Test konnten die Ergebnisse nicht als signifikant verschieden identifiziert werden (p = 0,33).

3.3.1.3b Mikropartikel / µl

Bezogen auf einen µl Vollblut bedeutet dies, dass im geringsten Fall 1.230 Mikropartikel (Minimum, ♀ 25J., Tag 30) gezählt wurden, die größte Anzahl betrug 14.814/ µl (Maximum, ♂ 48J., Tag 04). Der Mittelwert bewegt sich innerhalb der Beobachtungszeitpunkte zwischen 5.011 (Tag 90) und 5.947 Mikropartikeln/ µl (Tag 04). Der Median liegt jeweils bei Werten zwischen 4.292 (Tag 90) und 5.705 Partikeln/ µl (Tag 01).

Mikropartikel / µl				
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabweichung **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**
Tag 01	5.863	2.858,29	5.705	36
Tag 04	5.947	3.089,52	5.339	36
Tag 14	5.486	2.757,17	4.946	36
Tag 30	5.036	2.659,17	4.459	36
Tag 90	5.011	2.814,86	4.292	36

Tab. 3.22: Mikropartikel / µl aller Probanden insgesamt (nur kompl. Datensätze)

Der Friedman-Test lieferte keine signifikanten Ergebnisse (p = 0,02).

3.3.1.4a Thrombozyten-Aggregate (%)

Als bereits aggregierte Thrombozyten konnten zwischen 1,40% (Minimum, ♀ 51J., Tag 30 sowie ♂ 29J.,Tag 90) und 18,09% (Maximum, ♀ 24J., Tag 30) der Thrombozyten beobachtet werden. Als Mittelwerte der verschiedenen Beobachtungszeitpunkte wurden Werte zwischen 4,53% (Tag 14) und 4,72% (Tag 04) bestimmt. Der Median lag jeweils zwischen 3,23% (Tag 90) und 3,80% (Tag 04).

Thrombozyten-Aggregate (%)				
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabweichung **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**
Tag 01	4,54	3,19	3,70	37
Tag 04	4,72	3,72	3,80	37
Tag 14	4,53	3,15	3,67	37
Tag 30	4,62	3,57	3,72	37
Tag 90	4,63	3,58	3,23	37

Tab. 3.23: Aggregate (%) aller Probanden insgesamt (nur kompl. Datensätze)

Im Friedman-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Messzeitpunkten (p = 0,86).

3.3.1.4b Thrombozyten-Aggregate / µl

Es wurden zwischen 3.321 (Minimum, ♀ 53J., Tag 30) und 58.485 Aggregate/ µl Vollblut (Maximum, ♀ 24J., Tag 01) gezählt. Die Mittelwerte lagen zwischen 11.304 (Tag 90) und 13.394 Aggregaten/ µl (Tag 04). Der Median liegt entsprechend zwischen 8.414 Aggregaten/ µl am Tag 30 und 10.105 Aggregaten/ µl am Tag 04.

Thrombozyten-Aggregate/ µl				
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabweichung **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**
Tag 01	12.494	10.212,49	9.509	36
Tag 04	13.394	11.647,55	10.105	36
Tag 14	12.704	9.329,44	9.653	36
Tag 30	11.811	9.992,46	8.414	36
Tag 90	11.304	8.316,28	8.800	36

Tab. 3.24: Aggregate/ µl aller Probanden insgesamt (nur kompl. Datensätze)

Auch hier stellte der Friedman-Test keine Signifikanz heraus (p = 0,18).

3.3.1.5 Vergleich der verschiedenen Messvariablen miteinander

3.3.1.5a Vergleich mit PAC 1

Spearman ρ					
	PAC 1 Tag 1	PAC 1 Tag 4	PAC 1 Tag 14	PAC 1 Tag 30	PAC 1 Tag 90
% Sing – Tag 1	-0,10	-0,04	0,09	-0,11	-0,21
% Sing – Tag 4	-0,04	0,00	0,20	0,04	-0,09
% Sing – Tag 14	0,03	0,15	0,22	-0,07	-0,13
% Sing – Tag 30	-0,13	0,02	0,13	0,02	-0,12
% Sing – Tag 90	0,01	0,09	0,22	-0,02	-0,12
% MP - Tag 1	-0,12	-0,24	0,11	0,06	0,22
% MP - Tag 4	-0,28	-0,07	-0,14	-0,03	0,09
% MP - Tag 14	-0,30	-0,12	-0,02	0,07	0,01
% MP - Tag 30	-0,03	-0,01	0,23	0,09	0,16
% MP - Tag 90	-0,19	-0,12	0,15	0,08	-0,01
MP/ µl - Tag 1	-0,06	-0,15	0,13	-0,04	0,12
MP/ µl - Tag 4	-0,24	-0,04	-0,12	-0,09	0,05
MP/ µl - Tag 14	-0,23	-0,19	-0,01	-0,03	-0,17
MP/ µl - Tag 30	-0,06	0,10	0,27	-0,02	0,06
MP/ µl - Tag 90	-0,09	-0,09	0,17	0,04	-0,03
% Aggr. - Tag 1	0,16	0,15	-0,13	0,09	0,12
% Aggr. - Tag 4	0,11	0,06	-0,18	-0,01	0,13
% Aggr. - Tag 14	0,10	-0,02	-0,17	-0,08	0,14
% Aggr. - Tag 30	0,07	0,01	-0,22	-0,05	0,08
% Aggr. - Tag 90	0,03	-0,01	-0,28	-0,02	0,12
Aggr./ µl - Tag 1	0,18	0,17	-0,13	0,05	0,07
Aggr./ µl - Tag 4	0,16	0,15	-0,16	-0,03	0,13
Aggr./ µl - Tag 14	0,10	-0,08	-0,22	-0,11	-0,03
Aggr./ µl - Tag 30	0,07	0,10	-0,22	-0,15	0,03
Aggr./ µl - Tag 90	0,08	0,07	-0,28	-0,01	0,02

Tab. 3.25a: Vergleich der verschiedenen Variablen mit PAC 1 (Spearman`sche Rangkorrelation).
PAC 1: „aktivierte" Thrombozyten, **Sing.**: Singuletten (single platelets), **MP**: Mikropartikel, **Aggr**.: Aggregate; **+**: signifikant ($p<0,05$) **x**: hoch-signifikant ($p<0,01$)

Signifikantes Verhalten zwischen den PAC 1-positiven Zellen und dem Vorliegen der Thrombozyten in den verschiedenen beschriebenen Zellformen lässt sich nicht herausstellen. Im Hinblick auf die *Mikropartikel* mag sich ein eher negativer Trend abzeichnen, die *Aggregate* betreffend liegen möglicherweise eher positive Zusammenhänge vor. Bezüglich der *Singuletten* ist kein Trend zu erahnen.

3.3.1.5b Vergleich mit den Singuletten

Spearman ρ										
	% Sing Tag 1		% Sing, Tag 4		% Sing, Tag 14		% Sing, Tag 30		% Sing, Tag 90	
PAC 1 – Tag 1	-0,10		-0,04		0,03		-0,13		0,01	
PAC 1 – Tag 4	-0,04		0,00		0,15		0,02		0,09	
PAC 1 – Tag 14	0,09		0,20		0,22		0,13		0,22	
PAC 1 – Tag 30	-0,11		0,04		-0,07		0,02		-0,02	
PAC 1 – Tag 90	-0,21		-0,09		-0,13		-0,12		-0,12	
% MP - Tag 1	0,01		0,31		0,11		0,24		0,10	
% MP - Tag 4	0,23		0,08		0,14		0,24		0,19	
% MP - Tag 14	0,25		0,38	+	0,18		0,45	x	0,33	+
% MP - Tag 30	0,23		0,50	x	0,30		0,39	+	0,32	
% MP - Tag 90	0,19		0,47	x	0,24		0,37	+	0,30	
MP/ µl - Tag 1	0,11		0,43	x	0,23		0,36	+	0,21	
MP/ µl - Tag 4	0,28		0,08		0,19		0,27		0,21	
MP/ µl - Tag 14	0,39	+	0,52	x	0,32		0,57	x	0,45	x
MP/ µl - Tag 30	0,31		0,54	x	0,37	+	0,49	x	0,41	+
MP/ µl - Tag 90	0,33		0,55	x	0,35	+	0,51	x	0,38	+
% Aggr. - Tag 1	-0,83	x	-0,81	x	-0,79	x	-0,87	x	-0,80	x
% Aggr. - Tag 4	-0,80	x	-0,96	x	-0,78	x	-0,88	x	-0,81	x
% Aggr. - Tag 14	-0,79	x	-0,83	x	-0,81	x	-0,87	x	-0,79	x
% Aggr. - Tag 30	-0,77	x	-0,84	x	-0,77	x	-0,89	x	-0,78	x
% Aggr. - Tag 90	-0,80	x	-0,84	x	-0,80	x	-0,85	x	-0,88	x
Aggr./ µl - Tag 1	-0,74	x	-0,64	x	-0,68	x	-0,73	x	-0,70	x
Aggr./ µl - Tag 4	-0,70	x	-0,78	x	-0,68	x	-0,78	x	-0,72	x
Aggr./ µl - Tag 14	-0,65	x	-0,68	x	-0,71	x	-0,77	x	-0,71	x
Aggr./ µl - Tag 30	-0,72	x	-0,73	x	-0,72	x	-0,77	x	-0,70	x
Aggr./ µl - Tag 90	-0,69	x	-0,73	x	-0,69	x	-0,70	x	-0,81	x

Tab. 3.25b: Vergleich der verschiedenen Variablen mit den Singuletten (Spearman`sche Rangkorrelation).
PAC 1: „aktivierte" Thrombozyten, **Sing.**: Singuletten (single platelets), **MP**: Mikropartikel, **Aggr**.: Aggregate; **+**: signifikant ($p<0,05$) **x**: hoch-signifikant ($p<0,01$)

Zwischen *PAC 1-Positiven* und Singuletten lassen sich in etwa gleichen Anteilen positive als auch negative Zusammenhänge erahnen, werden aber in keinem der direkten Vergleiche signifikant.

Mikropartikel und Singuletten zeigen wiederholt signifikant positive Zusammenhänge.

Der Vergleich der Aggregate mit den Singuletten fiel in allen Gegenüberstellungen hochsignifikant negativ aus.

3.3.1.5c Vergleich mit den Mikropartikeln

Spearman ρ										
	% MP Tag 1		% MP Tag 4		% MP Tag 14		% MP Tag 30		% MP Tag 90	
PAC 1 – Tag 1	-0,12		-0,28		-0,30		-0,03		-0,19	
PAC 1 – Tag 4	-0,24		-0,07		-0,12		-0,01		-0,12	
PAC 1 – Tag 14	0,11		-0,14		-0,02		0,23		0,15	
PAC 1 – Tag 30	0,06		-0,03		0,067		0,09		0,08	
PAC 1 – Tag 90	0,22		0,09		0,00		0,16		-0,01	
% Sing – Tag 1	0,01		0,23		0,25		0,23		0,19	
% Sing – Tag 4	0,31		0,08		0,38	+	0,50	x	0,47	x
% Sing – Tag 14	0,11		0,14		0,18		0,30		0,24	
% Sing – Tag 30	0,24		0,24		0,45	x	0,39	+	0,37	+
% Sing – Tag 90	0,10		0,19		0,33	+	0,32		0,29	
MP/ µl - Tag 1	0,86	x	0,47	x	0,62	x	0,70	x	0,71	x
MP/ µl - Tag 4	0,39	+	0,95	x	0,50	x	0,38	+	0,33	+
MP/ µl - Tag 14	0,66	x	0,49	x	0,88	x	0,74	x	0,76	x
MP/ µl - Tag 30	0,65	x	0,45	x	0,72	x	0,91	x	0,75	x
MP/ µl - Tag 90	0,76	x	0,51	x	0,81	x	0,86	x	0,90	x
% Aggr. - Tag 1	-0,48	x	-0,45	x	-0,58	x	-0,59	x	-0,60	x
% Aggr. - Tag 4	-0,45	x	-0,45	x	-0,60	x	-0,62	x	-0,61	x
% Aggr. - Tag 14	-0,42	+	-0,42	+	-0,63	x	-0,59	x	-0,56	x
% Aggr. - Tag 30	-0,46	x	-0,37	+	-0,63	x	-0,69	x	-0,62	x
% Aggr. - Tag 90	-0,40	+	-0,36	+	-0,56	x	-0,64	x	-0,61	x
Aggr./ µl - Tag 1	-0,45	x	-0,45	x	-0,57	x	-0,55	x	-0,56	x
Aggr./ µl - Tag 4	-0,53	x	-0,44	x	-0,67	x	-0,69	x	-0,72	x
Aggr./ µl - Tag 14	-0,47	x	-0,42	+	-0,69	x	-0,60	x	-0,57	x
Aggr./ µl - Tag 30	-0,43	x	-0,36	+	-0,61	x	-0,60	x	-0,60	x
Aggr./ µl - Tag 90	-0,43	x	-0,29		-0,51	x	-0,61	x	-0,63	x

Tab. 3.25c: Vergleich der verschiedenen Variablen mit den Mikropartikeln (Spearman`sche Rangkorrelation). **PAC 1**: „aktivierte" Thrombozyten, **Sing.**: Singuletten (single platelets), **MP**: Mikropartikel, **Aggr**.: Aggregate; **+**: signifikant ($p<0,05$) **x**: hoch-signifikant ($p<0,01$)

Beim Vergleich der Mikropartikel mit den *PAC 1-positiven Zellen* zeigen sich keine signifikanten Zusammenhänge.

Singuletten und Mikropartikel stehen mehrfach in signifikant positivem Zusammenhang.

Im Vergleich mit den *Thrombozytenaggregaten* finden sich in nahezu allen Gegenüberstellungen größtenteils sogar hochsignifikante Zusammenhänge.

3.3.1.5d Vergleich mit den Aggregaten

Spearman ρ										
	% Aggr. Tag 1		% Aggr. Tag 4		% Aggr. Tag 14		% Aggr. Tag 30		% Aggr. Tag 90	
PAC 1 – Tag 1	0,16		0,11		0,10		0,07		0,03	
PAC 1 – Tag 4	0,15		0,06		-0,02		0,00		-0,01	
PAC 1 – Tag 14	-0,13		-0,18		-0,17		-0,22		-0,28	
PAC 1 – Tag 30	0,09		-0,01		-0,03		-0,05		-0,02	
PAC 1 – Tag 90	0,12		0,13		0,14		0,08		0,12	
% Sing – Tag 1	-0,83	**x**	-0,80	**x**	-0,79	**x**	-0,77	**x**	-0,80	**x**
% Sing – Tag 4	-0,81	**x**	-0,86	**x**	-0,83	**x**	-0,84	**x**	-0,84	**x**
% Sing – Tag 14	-0,79	**x**	-0,78	**x**	-0,81	**x**	-0,77	**x**	-0,80	**x**
% Sing – Tag 30	-0,87	**x**	-0,88	**x**	-0,87	**x**	-0,89	**x**	-0,85	**x**
% Sing – Tag 90	-0,80	**x**	-0,81	**x**	-0,79	**x**	-0,78	**x**	-0,88	**x**
% MP - Tag 1	-0,48	**x**	-0,45	**x**	-0,42	**+**	-0,46	**x**	-0,40	**+**
% MP - Tag 4	-0,45	**x**	-0,45	**x**	-0,42	**+**	-0,37	**+**	-0,36	**+**
% MP - Tag 14	-0,58	**x**	-0,60	**x**	-0,63	**x**	-0,63	**x**	-0,56	**x**
% MP - Tag 30	-0,59	**x**	-0,62	**x**	-0,59	**x**	-0,69	**x**	-0,64	**x**
% MP - Tag 90	-0,60	**x**	-0,61	**x**	-0,56	**x**	-0,62	**x**	-0,61	**x**
MP/ µl - Tag 1	-0,53	**x**	-0,54	**x**	-0,48	**x**	-0,52	**x**	-0,47	**x**
MP/ µl - Tag 4	-0,46	**x**	-0,41	**+**	-0,40	**+**	-0,35	**+**	-0,34	**+**
MP/ µl - Tag 14	-0,70	**x**	-0,69	**x**	-0,73	**x**	-0,72	**x**	-0,66	**x**
MP/ µl - Tag 30	-0,62	**x**	-0,64	**x**	-0,64	**x**	-0,72	**x**	-0,67	**x**
MP/ µl - Tag 90	-0,70	**x**	-0,71	**x**	-0,69	**x**	-0,72	**x**	-0,69	**x**
Aggr./ µl - Tag 1	0,90	**x**	0,83	**x**	0,83	**x**	0,82	**x**	0,83	**x**
Aggr./ µl - Tag 4	0,89	**x**	0,95	**x**	0,90	**x**	0,91	**x**	0,91	**x**
Aggr./ µl - Tag 14	0,83	**x**	0,84	**x**	0,91	**x**	0,87	**x**	0,84	**x**
Aggr./ µl - Tag 30	0,85	**x**	0,87	**x**	0,85	**x**	0,88	**x**	0,86	**x**
Aggr./ µl - Tag 90	0,83	**x**	0,83	**x**	0,77	**x**	0,82	**x**	0,91	**x**

Tab. 3.25d: Vergleich der verschiedenen Variablen mit den Aggregaten (Spearman`sche Rangkorrelation).
PAC 1: „aktivierte" Thrombozyten, **Sing.**: Singuletten (single platelets), **MP**: Mikropartikel, **Aggr**.: Aggregate; **+**: signifikant ($p<0,05$) **x**: hoch-signifikant ($p<0,01$)

Aggregate und *PAC 1-positive Zellen* zeigen keine signifikanten Zusammenhänge.

Sowohl *Singuletten* als auch *Mikropartikel* stehen in sämtlichen Gegenüberstellungen mit den Aggregaten in meist hochsignifikant negativem Zusammenhang.

3.3.2 Geschlechtsunterschiede

3.3.2.1 PAC 1-positive Thrombozyten (%)

Betrachtet man im Rahmen der PAC 1-Analyse den Anteil „aktivierter“ Plättchen im männlichen und weiblichen Geschlecht getrennt voneinander, ergeben sich folgende Werte:

PAC 1-positive (“aktivierte“) Thrombozyten (%)					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**	U-Test **p**
Tag 01 ♂	1,64	2,58	0,57	18	
♀	2,25	3,30	0,80	20	0,52
Tag 04 ♂	1,03	1,12	0,48	18	
♀	1,97	2,74	0,61	20	0,57
Tag 14 ♂	1,07	1,17	0,46	18	
♀	1,68	1,81	0,83	20	0,50
Tag 30 ♂	2,31	5,55	0,50	18	
♀	2,61	4,64	1,06	20	0,11
Tag 90 ♂	1,65	2,20	0,68	17	
♀	2,07	2,44	0,79	20	0,93
Alle ♂	1,54	2,97	0,54	89	
♀	2,11	3,09	0,74	100	0,21

Tab. 3.26: PAC 1-positive (“aktivierte“) Thrombozyten (%) nach Geschlecht getrennt

Der geringste Anteil „aktivierter“ Thrombozyten findet sich unter den weiblichen Probanden bei einem Wert von 0,02% (Minimum, ♀ 47J., Tag 01), der höchste bei 20,79% (Maximum, ♀ 51J., Tag 30). Die Mittelwerte liegen bei den Probandinnen zwischen 1,68% (Tag 14) und 2,61% (Tag 30) der PAC 1-positiven Zellen. Der Median liegt jeweils im Intervall zwischen 0,61% (Tag 04) und 1,06% (Tag 30).

Beim männlichen Probandengut findet sich ein Minimum von 0,07% (♂ 50J.,Tag 04 sowie ♂ 48J., Tag 30) und ein Maximum von 22,39% (♂ 51J., Tag 30) „aktivierter“ Zellen. Die Mittelwerte der einzelnen Beobachtungszeitpunkte befinden sich im Intervall zwischen 1,03% (Tag 04) und 2,31% (Tag 30).
Der Median liegt jeweils zwischen 0,46% (Tag 14) und 0,68% (Tag 90).

Im zweiseitigen U-Test konnten keine signifikanten Geschlechtsunterschiede aufgezeigt werden.

3.3.2.2 Singuletten (single platelets) (%)

In der Betrachtung des weiblichen und des männlichen Geschlechts unabhängig voneinander bezüglich des Anteils singulärer Thrombozyten, kann man folgende Beobachtungen machen:

Singuletten (single platelets) (%)					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**	U-Test **p**
Tag 01 ♂	92,87	2,90	93,69	18	
♀	93,94	3,00	94,74	20	0,12
Tag 04 ♂	92,30	3,87	93,11	18	
♀	94,09	3,01	95,00	20	0,08
Tag 14 ♂	93,13	2,76	94,05	18	
♀	94,05	2,77	94,49	20	0,20
Tag 30 ♂	93,10	2,94	94,04	18	
♀	94,06	3,30	95,01	20	**< 0,05**
Tag 90 ♂	92,97	3,40	93,77	17	
♀	94,08	3,10	94,78	20	0,27
Alle ♂	92,87	3,14	93,70	89	
♀	94,05	2,98	94,81	100	**< 0,01**

Tab. 3.27: Singuletten (single platelets) (%) nach Geschlecht getrennt

Bei den weiblichen Probanden haben die einzeln vorliegenden Blutplättchen einen Anteil zwischen 81,12% (Minimum, ♀ 24J., Tag 30) und 96,51% der gesamten Plättchenmenge (Maximum, ♀ 26J., Tag 04). Der Mittelwert liegt hier jeweils zwischen 93,94% (Tag 01) und 94,09% (Tag 04). Als Mediane werden zu den einzelnen Beobachtungszeitpunkten Werte zwischen 94,49% (Tag 14) und 95,01% (Tag 30) berechnet.

Für das männliche Geschlecht wurden Singuletten-Anteile zwischen 82,33% (Minimum, ♂ 52J.,Tag 04) und 96,96% (Maximum, ♂ 29J., Tag 90) bestimmt.
Die Mittelwerte können zwischen 92,30% am Tag 04 und 93,13% am Tag 14 festgelegt werden. Der Median umfasst ein Intervall zwischen 93,11% (Tag 04) und 94,05% (Tag 14).

Im U-Test konnte ein signifikanter Geschlechtsunterschied zum Beobachtungszeitpunkt Tag 30 nachgewiesen werden. Auch bei der gepoolten Analyse aller Messzeitpunkte bestand ein signifikanter Unterschied.

3.3.2.3a Mikropartikel (%)

Beobachtet man den Anteil der Mikropartikel nach Geschlechtern getrennt, kann man folgendes feststellen:

Mikropartikel (%)					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**	U-Test **p**
Tag 01 ♂	2,26	0,97	1,97	18	
♀	2,09	0,99	1,99	20	0,60
Tag 04 ♂	2,40	1,24	2,04	18	
♀	1,89	0,83	1,82	20	0,35
Tag 14 ♂	1,97	0,62	1,89	18	
♀	2,00	1,05	1,77	20	0,70
Tag 30 ♂	1,97	0,78	1,79	18	
♀	1,82	0,81	2,03	20	0,61
Tag 90 ♂	2,08	0,93	1,80	17	
♀	1,79	0,77	1,72	20	0,48
Alle ♂	2,14	0,92	1,89	89	
♀	1,92	0,88	1,82	100	0,18

Tab. 3.28: Mikropartikel (%) nach Geschlecht getrennt

Zwischen 0,58% (Minimum, ♀ 25J., Tag 30) und 4,66% der gesamten Thrombozytenpopulation (Maximum, ♀ 47J., Tag 14) liegen bei den weiblichen Probanden in Form von Mikropartikeln vor. Die Mittelwerte liegen hier zwischen 1,79% (Tag 90) und 2,09% (Tag 04). Der Median befindet sich jeweils in einem Bereich zwischen 1,72% (Tag 90) und 2,03% (Tag 30).

Die männlichen Probanden zeigten einen Anteil von zwischen 0,87% (Minimum, ♂ 51J., Tag 04) und 5,40% Mikropartikeln (Maximum, ♂ 47J., Tag 04). Als Mittelwerte lassen sich

Anteile zwischen 1,79% am Tag 90 und 2,09% am Tag 01 bestimmen. Der Median liegt jeweils bei Werten zwischen 1,72% (Tag 90) und 2,03% (Tag 30).

Signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern ließen sich nicht finden.

3.3.2.3b Mikropartikel / µl

Die Untersuchung der totalen Anzahl Mikropartikel/ µl nach Geschlechtern getrennt ergab folgende Werte:

Mikropartikel / µl					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**	U-Test **p**
Tag 01 ♂	5.812	2.635,71	5.628	18	
♀	5.983	3.056,43	5.873	20	0,77
Tag 04 ♂	6.431	3.568,20	5.338	18	
♀	5.594	2.565,67	5.339	20	0,64
Tag 14 ♂	4.987	1.641,14	4.946	18	
♀	5.970	3.338,31	5.236	20	0,60
Tag 30 ♂	5.015	2.543,90	4.315	18	
♀	5.213	2.791,64	5.001	20	0,77
Tag 90 ♂	4.940	2.957,51	4.198	17	
♀	5.075	2.760,91	4.599	19	0,81
Alle ♂	5.443	2.742	4.857	89	
♀	5.572	2.881	5.253	99	0,73

Tab. 3.29: Mikropartikel / µl nach Geschlecht getrennt

Bei den weiblichen Probanden wurden zwischen 1.230 (Minimum, ♀ 25J., Tag 30) und 14.573 Zellen/ µl (Maximum, ♀ 47J., Tag 14) als Mikropartikel identifiziert. Die Mittelwerte umfassen Partikelzahlen zwischen 5.075/ µl am Tag 90 und 5.983/ µl am Tag 01. Der Median ist jeweils zwischen 4.599 Zellen/ µl (Tag 90) und 5.873 Zellen/ µl (Tag 01) gelegen.

Zwischen 1.774 (Minimum, ♂ 51J., Tag 04) und 14.814 Mikropartikel/ µl Vollblut (Maximum, ♂ 48J., Tag 04) konnten bei den männlichen Probanden gezählt werden. Die Mittelwerte wurden für einen Bereich zwischen 4.940 (Tag 90) und 6.431 Partikeln/ µl (Tag

04) berechnet. Der Median beträgt zwischen 4.198 (Tag 90) und 5.628 Mikropartikeln/ µl (Tag 01).

Im U-Test konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Probanden verschiedenen Geschlechts festgestellt werden.

3.3.2.4a Thrombozyten-Aggregate (%)

Der Anteil der aggregierten Blutplättchen betrug in den einzelnen Geschlechtern wie folgt:

Thrombozyten-Aggregate (%)					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**	U-Test **p**
Tag 01 ♂	5,01	3,10	4,36	18	
♀	4,16	3,23	2,85	20	0,27
Tag 04 ♂	5,43	3,88	4,39	18	
♀	4,13	3,46	3,20	20	0,21
Tag 14 ♂	5,04	3,06	4,14	18	
♀	4,07	3,15	3,35	20	0,20
Tag 30 ♂	5,07	3,34	4,27	18	
♀	4,23	3,72	3,09	20	0,20
Tag 90 ♂	5,08	3,77	3,99	17	
♀	4,25	3,45	2,92	20	0,54
Alle ♂	5,13	3,37	4,26	89	
♀	4,17	3,34	3,00	100	**< 0,05**

Tab. 3.30: Thrombozyten-Aggregate (%) nach Geschlecht getrennt

Im weiblichen Geschlecht betrug der minimale Anteil von Aggregaten an der Gesamtmenge der Thrombozyten 1,40% (Minimum, ♀ 53J., Tag 30), der maximale Anteil betrug 18,09% (Maximum, ♀ 24J., Tag 30).
Die Mittelwerte der jeweiligen Beobachtungszeitpunkte sind zwischen 4,07% (Tag 14) und 4,25% (Tag 90) einzuordnen. Beim Median handelt es sich um Bereiche zwischen 2,85% (Tag 01) und 3,35% (Tag 14).

Die männlichen Probanden wiesen einen Anteil von zwischen 1,40% (Minimum, ♂ 29J., Tag 90) und 15,64% Aggregate (Maximum, ♂ 52J., Tag 04) auf. Die Mittelwerte bewegten sich zwischen 5,01% am Tag 01 und 5,43% am Tag 04.
Für den Median gilt ein Intervall zwischen 3,99% (Tag 90) und 4,39% (Tag 04).

Der zweiseitige U-Test zeigte an den einzelnen Untersuchungstagen keine signifikanten Unterschiede zwischen dem männlichen und dem weiblichen Geschlecht, lediglich bei der gepoolten Analyse aller Untersuchungen zeigten Frauen signifikant geringere Thrombozytenaggregatanteile als Männer.

3.3.2.4b Thrombozyten-Aggregate / µl

Die nach Geschlechtern getrennte Untersuchung der totalen Anzahl von Aggregaten/ µl ergab folgende Ergebnisse:

Thrombozyten-Aggregate/ µl					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**	U-Test **p**
Tag 01 ♂	12.619	7.478,42	11.163	18	
♀	12.157	11.950,91	8.338	20	0,46
Tag 04 ♂	14.405	12.031,36	11.167	18	
♀	12.285	10.892,77	10.344	20	0,45
Tag 14 ♂	12.597	7.496,10	9.748	18	
♀	12.434	10.557,19	9.206	20	0,68
Tag 30 ♂	12.038	7.621,27	10.612	18	
♀	11.546	11.484,30	8.151	20	0,64
Tag 90 ♂	10.950	7.759,98	8.039	17	
♀	11.621	8.984,88	8.900	20	0,62
Alle ♂	12.540	8.547	9.876	89	
♀	12.012	10.622	8.726	99	0,34

Tab. 3.31: Thrombozyten-Aggregate/ µl (%) nach Geschlecht getrennt

Die weiblichen Probanden zeigten zwischen 3.321 (Minimum, ♀ 53J., Tag 30) und 58.485 Aggregate/ µl Vollblut (Maximum, ♀ 24J., Tag 01). Die Mittelwerte betreffend ergab sich ein Bereich zwischen 11.546 (Tag 30) und 12.434 Aggregaten/ µl Vollblut (Tag 14). Der Median

liegt mit 8.151 Aggregate/ µl Vollblut am Tag 30 am niedrigsten, den höchsten Wert erreicht er mit 10.344 Aggregaten/ µl Vollblut am Tag 04.

Beim männlichen Geschlecht wurden zwischen 3.797 (Minimum, ♂ 29J., Tag 30) und 54.123 Aggregate/ µl Vollblut (Maximum, ♂ 52J., Tag 04) gemessen.
Die Mittelwerte lagen im Bereich zwischen 10.950 (Tag 90) und 14.405 Aggregaten/ µl Vollblut (Tag 04). Der Median liegt jeweils zwischen 8.039 (Tag 90) und 11.167 Aggregaten/ µl Vollblut (Tag 04).

Signifikante Unterschiede zwischen dem männlichen und dem weiblichen Geschlecht konnten nicht nachgewiesen werden.

3.3.2.5 Geschlechtsunterschiede für alle Variablen gepoolt

Geschlechtsunterschiede					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**	U-Test **p**
PAC 1 (%) ♀	2,11	3,09	0,74	100	
♂	1,54	2,73	0,54	89	0,21
Sing.(%) ♀	94,05	2,98	94,81	100	
♂	92,87	3,14	93,70	89	**< 0,01**
MP (%) ♀	1,95	0,93	1,80	100	
♂	2,14	0,90	1,90	89	0,18
MP/ µl ♀	5.572	2.881	5.253	99	
♂	5.443	2.742	4.857	89	0,73
Aggr.(%) ♀	4,17	3,34	3,00	100	
♂	5,13	3,37	4,26	89	**< 0,05**
Aggr./ µl ♀	12.012	10.622	8.726	99	
♂	12.540	8.547	9.876	89	0,34

Tab. 3.32: Geschlechtsunterschiede, gepoolt für alle Variablen
PAC 1: „aktivierte" Thrombozyten, **Sing.**: Singuletten (single platelets), **MP**: Mikropartikel, **Aggr**.: Aggregate

Im Gesamt-Vergleich zwischen Männern und Frauen stellten sich hochsignifikante Unterschiede im prozentualen Anteil der einzeln vorliegenden Zellen (single platelets) sowie signifikante Unterschiede im prozentualen Anteil der Thrombozytenaggregate heraus.

3.3.3 Alterskorrelation

		% PAC 1 MW ± SD	% Sing. MW ± SD	% MP MW ± SD	% Aggr. MW ± SD	Aggr./ µl MW ± SD	MP/ µl MW ± SD
Alter	≤ 35 Jahre	1,16 ± 2,04	93,41 ± 3,57	1,81 ± 0,85	4,92 ± 3,78	13.104 ± 11.131	4.936 ± 2.591
	≥ 45 Jahre	2,61 ± 3,73	93,58 ± 2,49	2,26 ± 0,92	4,28 ± 2,84	11.304 ± 7.640	6.163 ± 2.918
p		**< 0,01**	0,39	**< 0,01**	0,34	0,35	**< 0,01**

Tab. 3.33: Beziehung der angegebenen Komponenten zum Alter der Probanden;
PAC 1: „aktivierte" Thrombozyten, **Sing.**: Singuletten (single platelets), **MP**: Mikropartikel, **Aggr**.: Aggregate; n. s.: nicht signifikant

Zwischen dem Alter der Probanden und dem prozentualen Anteil von aktivierten Thrombozyten und dem Anteil bzw. der Konzentration von Mikropartikeln fand sich ein signifikanter Zusammenhang mit dem Alter.

3.4 ADIAflo-MESSREIHE

3.4.1 CD 41

3.4.1.1 Vergleich sämtlicher Probanden

Die Anzahl der CD 41-positiven Rezeptoren je Thrombozyt betrug in der gesamten Probandenpopulation zwischen 23.069 (Minimum, ♀ 53J., Tag 90) und 70.562 (Maximum, ♂ 25J., Tag 14). Hierbei lagen die Mittelwerte der einzelnen Messzeitpunkte zwischen 37.156 (Tag 90) und 42.391 Rezeptoren (Tag 14). Der Median bewegte sich zwischen 39.387 (Tag 90) und 42.490 Rezeptoren (Tag 4).

CD 41				
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabweichung **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**
Tag 01	41.559	7.949	41.249	37
Tag 04	42.247	8.759	42.490	37
Tag 14	42.391	9.577	40.773	37
Tag 30	41.168	7.894	41.418	37
Tag 90	37.156	9.634	39.387	37

Tab. 3.34: CD 41-Rezeptorzahlen aller Probanden insgesamt (nur komplette Datensätze)

Der Friedman-Test ($p = 0{,}0003$) ergab einen signifikanten Unterschied aller Messzeitpunkte, welcher im paarweisen Vergleich durch Vorzeichen-Rangtest als signifikanter Abfall am Tag 90 identifiziert werden konnte (siehe 3.4.1.2).

3.4.1.2 Geschlechtsunterschiede

Im Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Probanden ergaben sich folgende Ergebnisse:

CD 41					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**	U-Test **p**
Tag 01 ♂	43.015	7.949	43.514	18	
♀	39.830	7.856	40.043	20	0,19
Tag 04 ♂	42.579	8.557	42.763	18	
♀	41.537	9.099	39.710	20	0,62
Tag 14 ♂	44.260	11.111	43.824	18	
♀	40.181	7.792	38.567	20	0,24
Tag 30 ♂	41.112	7.637	41.582	18	
♀	40.794	8.338	40.313	20	0,86
Tag 90 ♂	38.103	6.499	39.514	17	
♀	36.352	11.781	38.406	20	0,81
Alle ♂	41.856	8.576	41.977	89	
♀	39.739	9.089	39.704	100	0,12

Tab. 3.35: CD 41 nach Geschlecht getrennt

Im weiblichen Geschlecht wurde ein Minimum von 23.069 (♀ 53J., Tag 90) und ein Maximum von 56.238 (♀ 25J., Tag 04) CD 41-positiven Rezeptoren gezählt.
Die Mittelwerte lagen zwischen 36.352 (Tag 90) und 41.537 (Tag 04) Rezeptoren. Der Median bewegte sich zwischen 38.406 Rezeptoren am Tag 90 und 40.313 Rezeptoren am Tag 30.

Beim männlichen Geschlecht lautet die minimale Anzahl CD 41-positiver Rezeptoren 24.951 (♂ 51J., Tag30), die maximale 70.562 (♂ 25J., Tag 14).
Die Mittelwerte zeigen Zahlen zwischen 38.103 (Tag 90) und 44.260 (Tag 14) Rezeptoren und liegen damit unter dem weiblichen Niveau. Der Median findet sich bei Werten zwischen 39.514 (Tag 90) und 43.824 Rezeptoren (Tag 14).

Im zweiseitigen U-Test zeigte sich kein signifikanter Geschlechtsunterschied.

3.4.2 CD 42b

3.4.2.1 Vergleich sämtlicher Probanden

Die Anzahl der CD 42b-positiven Rezeptoren je Thrombozyt betrug in der gesamten Probandenpopulation zwischen 12.967 (Minimum, ♀ 47J., Tag 01) und 43.875 (Maximum, ♂ 25J., Tag 14). Hierbei lagen die Mittelwerte der einzelnen Messzeitpunkte zwischen 25.030 (Tag 90) und 27.848 Rezeptoren (Tag 30).
Der Median bewegte sich zwischen 25.915 (Tag 90) und 28.412 Rezeptoren (Tag 30).

CD 42b				
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabweichung **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**
Tag 01	26.121	5.095	26.696	37
Tag 04	27.623	5.727	26.357	37
Tag 14	26.956	6.352	26.665	37
Tag 30	27.848	5.061	28.412	37
Tag 90	25.030	6.836	25.915	37

Tab. 3.36: CD 42b-Rezeptorzahlen aller Probanden insgesamt (nur komplette Datensätze)

Der Friedman-Test konnte zwischen den einzelnen Messtagen keine signifikanten Unterschiede der Rezeptorzahlen herausstellen ($p = 0{,}0916$).

3.4.2.2 Geschlechtsunterschiede

Im Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Probanden ergaben sich folgende Ergebnisse:

CD 42b					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**	U-Test **p**
Tag 01 ♂	28.807	4.291	28.377	18	
♀	23.708	4.443	24.199	20	**< 0,01**
Tag 04 ♂	28.590	5.628	27.000	18	
♀	26.575	5.693	24.990	20	0,18
Tag 14 ♂	29.170	6.688	27.395	18	
♀	24.906	5.238	24.045	20	**< 0,05**
Tag 30 ♂	28.814	4.899	28.308	18	
♀	26.985	5.039	28.138	20	0,46
Tag 90 ♂	27.379	4.505	28.435	17	
♀	23.033	7.894	25.167	20	0,07
Alle ♂	28.565	5.198	27.665	89	
♀	25.041	5.876	24.853	100	**< 0,0001**

Tab. 3.37: CD 42b nach Geschlecht getrennt

Im weiblichen Geschlecht wurde ein Minimum von 12.967 (♀ 47J., Tag 01) und ein Maximum von 41.396 (♀ 24J., Tag 04) CD 42b-positiven Rezeptoren gezählt. Die Mittelwerte liegen zwischen 23.033 (Tag 90) und 26.985 (Tag 30) Rezeptoren. Der Median bewegt sich zwischen 24.045 Rezeptoren am Tag 14 und 28.138 Rezeptoren am Tag 30.

Beim männlichen Geschlecht lautet die minimale Anzahl CD 42b-positiver Rezeptoren 15.605 (♂ 50J., Tag 14), die maximale 43.875 (♂ 25J., Tag 14). Die Mittelwerte zeigen Zahlen zwischen 27.379 (Tag 90) und 29.170 (Tag 14) und unterliegen somit weniger starken Schwankungen, als beim weiblichen Geschlecht beobachtet wird. Der Median befindet sich bei Werten zwischen 27.000 (Tag 04) und 28.435 Rezeptoren (Tag 90) und liegt hier etwas höher, als bei den weiblichen Probanden.

Im zweiseitigen U-Test zeigten sich signifikante Geschlechtsunterschiede am Messtag 14 ($p=0,03$) und am Tag 01 ($p=0,001$), sowie bei der gepoolten Analyse ($p < 0,01$).

3.4.3 CD 61

3.4.3.1 Vergleich sämtlicher Probanden

Die Anzahl der CD 61-positiven Rezeptoren je Thrombozyt betrug in der gesamten Probandenpopulation zwischen 21.123 (Minimum, ♀ 53J., Tag 90) und 65.407 (Maximum, ♂ 25J., Tag 14). Hierbei lagen die Mittelwerte der einzelnen Messzeitpunkte zwischen 36.021 (Tag 90) und 40.407 Rezeptoren (Tag 04).
Der Median bewegte sich zwischen 38.184 (Tag 90) und 41.143 Rezeptoren (Tag 30).

CD 61				
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabweichung **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**
Tag 01	39.687	8.423	39.286	37
Tag 04	40.408	8.590	40.160	37
Tag 14	40.000	9.635	39.441	37
Tag 30	39.956	7.978	41.143	37
Tag 90	36.021	10.150	38.184	37

Tab. 3.38: CD 61-Rezeptorzahlen aller Probanden insgesamt (nur komplette Datensätze)

Im Friedman-Test wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt ($p < 0,01$). Als verursachender Messzeitpunkt wurde anhand paarweiser Vergleiche durch Vorzeichen-Rangtest der Tag 90 identifiziert ($p < 0,01$) (siehe 3.4.3.2).

3.4.3.2 Geschlechtsunterschiede

Im Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Probanden ergaben sich folgende Ergebnisse:

CD 61					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**	U-Test **p**
Tag 01 ♂	41.477	8.285	43.965	18	
♀	37.586	8.388	37.339	20	0,08
Tag 04 ♂	40.690	8.659	41.390	18	
♀	39.515	8.965	38.480	20	0,60
Tag 14 ♂	41.911	10.405	42.564	18	
♀	37.679	8.803	37.413	20	0,20
Tag 30 ♂	39.649	7.944	41.413	18	
♀	39.740	8.312	39.701	20	0,91
Tag 90 ♂	36.942	6.919	38.184	17	
♀	35.239	12.389	38.031	20	0,81
Alle ♂	40.170	8.523	41.206	89	
♀	37.952	9.444	38.048	100	0,08

Tab. 3.39: CD 61 nach Geschlecht getrennt

Im weiblichen Geschlecht wurde ein Minimum von 21.123 (♀ 53J., Tag 90) und ein Maximum von 55.378 (♀ 28J., Tag 01) CD 41-positiven Rezeptoren gezählt.
Die Mittelwerte lagen zwischen 35.239 (Tag 90) und 39.740 (Tag 30) Rezeptoren. Der Median bewegte sich zwischen 37.339 Rezeptoren am Tag 01 und 39.701 Rezeptoren am Tag 30.

Beim männlichen Geschlecht lautet die minimale Anzahl CD 41-positiver Rezeptoren 23.152 (♂ 50J., Tag 30), die maximale 65.407 (♂ 25J., Tag 14). Die Mittelwerte zeigen Zahlen zwischen 36.942 (Tag 90) und 41.911 (Tag 14) Rezeptoren und liegen damit unter dem Niveau der weiblichen Probanden. Der Median findet sich bei Werten zwischen 38.184 (Tag 90) und 43.965 Rezeptoren (Tag 01).

Im zweiseitigen U-Test konnten keine signifikanten Geschlechtsunterschiede festgestellt werden.

3.4.4 CD 62p

3.4.4.1 Vergleich sämtlicher Probanden

Die Anzahl der CD 62p-positiven Rezeptoren je Thrombozyt betrug in der gesamten Probandenpopulation zwischen 50 (Minimum, ♀ 47 J., Tag 01) und 1.249 (Maximum, ♀47 J., Tag 14). Hierbei lagen die Mittelwerte der einzelnen Messzeitpunkte zwischen 451 (Tag 04) und 534 Rezeptoren (Tag 01).
Der Median bewegte sich zwischen 493 (Tag 30) und 542 Rezeptoren (Tag 90).

CD 62p				
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabweichung **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**
Tag 01	534	193,63	528	37
Tag 04	451	200,93	495	37
Tag 14	495	249,92	510	37
Tag 30	483	203,23	493	37
Tag 90	517	216,67	542	37

Tab. 3.40: CD 62p-Rezeptorzahlen aller Probanden insgesamt (nur komplette Datensätze)

Im Friedman-Test fanden sich keine signifikanten Unterschiede (p = 0,47).

3.4.4.2 Geschlechtsunterschiede

Im Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Probanden ergaben sich folgende Ergebnisse:

CD 62p					
Messzeitpunkt **t**	Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**	U-Test **p**
Tag 01 ♂	497	172	508	18	
♀	569	205	564	20	0,23
Tag 04 ♂	417	253	468	18	
♀	484	132	505	20	0,41
Tag 14 ♂	501	238	500	18	
♀	488	260	506	20	0,954
Tag 30 ♂	465	270	515	18	
♀	500	112	476	20	0,79
Tag 90 ♂	520	123	537	17	
♀	514	276	552	20	0,45
Alle ♂	480	217	514	89	
♀	511	206	521	100	0,25

Tab. 3.41: CD 62p nach Geschlecht getrennt

Im weiblichen Geschlecht wurde ein Minimum von 50 (♀ 47 J., Tag 01) und ein Maximum von 1.249 (♀ 47 J., Tag 14) CD 62p-positiven Rezeptoren gezählt.
Die Mittelwerte lagen zwischen 484 (Tag 04) und 569 (Tag 01) Rezeptoren.
Der Median bewegte sich zwischen 476 Rezeptoren am Tag 30 und 564 Rezeptoren am Tag 01.

Beim männlichen Geschlecht lautet die minimale Anzahl CD 62p-positiver Rezeptoren 62 (♂ 27 J., Tag 14), die maximale 1.070 (♂ 48J., Tag 14). Die Mittelwerte ergeben Zahlen zwischen 417 (Tag 04) und 520 (Tag 90) Rezeptoren. Der Median findet sich bei Werten zwischen 468 (Tag 04) und 537 Rezeptoren (Tag 90).

Im zweiseitigen U-Test konnten keine signifikanten Geschlechtsunterschiede festgestellt werden.

3.4.5 Vergleich der verschiedenen Rezeptoren miteinander

3.4.5a Vergleich mit CD 41

Spearman ρ										
	CD 41 Tag 1		CD 41 Tag 4		CD 41 Tag 14		CD 41 Tag 30		CD 41 Tag 90	
CD 42b – Tag 1	0,66	**x**	0,53	**x**	0,54	**x**	0,38	**+**	0,33	**+**
CD 42b – Tag 4	0,54	**x**	0,80	**x**	0,70	**x**	0,57	**x**	0,53	**x**
CD 42b – Tag 14	0,46	**x**	0,58	**x**	0,74	**x**	0,52	**x**	0,41	**+**
CD 42b – Tag 30	0,50	**x**	0,68	**x**	0,69	**x**	0,75	**x**	0,56	**x**
CD 42b – Tag 90	0,56	**x**	0,69	**x**	0,63	**x**	0,56	**x**	0,73	**x**
CD 61 - Tag 1	0,97	**x**	0,69	**x**	0,63	**x**	0,66	**x**	0,60	**x**
CD 61 - Tag 4	0,76	**x**	0,97	**x**	0,77	**x**	0,84	**x**	0,80	**x**
CD 61 - Tag 14	0,68	**x**	0,71	**x**	0,97	**x**	0,79	**x**	0,77	**x**
CD 61 - Tag 30	0,73	**x**	0,84	**x**	0,82	**x**	0,96	**x**	0,82	**x**
CD 61 - Tag 90	0,66	**x**	0,75	**x**	0,72	**x**	0,77	**x**	0,96	**x**
CD 62p - Tag 1	-0,10		-0,13		-0,06		-0,23		0,03	
CD 62p - Tag 4	-0,28		-0,05		-0,12		-0,06		-0,19	
CD 62p - Tag 14	-0,22		-0,20		-0,10		-0,17		-0,22	
CD 62p - Tag 30	0,06		0,01		-0,04		0,16		0,03	
CD 62p - Tag 90	0,11		0,19		0,31		0,24		0,14	

Tab. 3.42a: Vergleich der verschiedenen Rezeptoren mit CD 41 (Spearman`sche Rangkorrelation).
+: signifikant ($p<0,05$) **x**: hoch-signifikant ($p<0,01$)

Es bestehen signifikant positive Zusammenhänge zwischen den Rezeptoren CD 41 und CD 42b sowie CD 41 und CD 61. Ein signifikant gleich- oder gegensinniger Zusammenhang zu CD 62p ließ sich nicht herstellen.

3.4.5b Vergleich mit CD 42b

Spearman ρ										
	CD 42b Tag 1		CD 42b Tag 4		CD 42b Tag 14		CD 42b Tag 30		CD 42b Tag 90	
CD 41 – Tag 1	0,65	**x**	0,54	**x**	0,46	**x**	0,50	**x**	0,56	**x**
CD 41 – Tag 4	0,53	**x**	0,80	**x**	0,58	**x**	0,68	**x**	0,689	**x**
CD 41 – Tag 14	0,54	**x**	0,70	**x**	0,74	**x**	0,69	**x**	0,63	**x**
CD 41 – Tag 30	0,38	**+**	0,57	**x**	0,52	**x**	0,75	**x**	0,56	**x**
CD 41 – Tag 90	0,33	**+**	0,53	**x**	0,40	**+**	0,56	**x**	0,73	**x**
CD 61 - Tag 1	0,70	**x**	0,50	**x**	0,44	**x**	0,48	**x**	0,56	**x**
CD 61 - Tag 4	0,54	**x**	0,81	**x**	0,59	**x**	0,71	**x**	0,71	**x**
CD 61 - Tag 14	0,52	**x**	0,67	**x**	0,76	**x**	0,69	**x**	0,61	**x**
CD 61 - Tag 30	0,43	**x**	0,64	**x**	0,59	**x**	0,76	**x**	0,61	**x**
CD 61 - Tag 90	0,34	**+**	0,50	**x**	0,39	**+**	0,50	**x**	0,76	**x**
CD 62p - Tag 1	-0,24		-0,09		-0,18		-0,28		-0,16	
CD 62p - Tag 4	-0,13		-0,02		-0,23		0,08		-0,22	
CD 62p - Tag 14	0,01		-0,02		-0,07		0,001		-0,26	
CD 62p - Tag 30	-0,25		-0,07		-0,05		-0,003		-0,17	
CD 62p - Tag 90	-0,03		0,17		0,32		0,159		-0,09	

Tab. 3.42b: Vergleich der verschiedenen Rezeptoren mit CD 42b (Spearman`sche Rangkorrelation).
+: signifikant ($p<0,05$) **x**: hoch-signifikant ($p<0,01$)

CD 42b weist neben einer gleichsinnigen Entwicklung seiner Rezeptorzahl verglichen mit CD 41 auch einen signifikant positiven Zusammenhang zur Anzahl der CD 61-Rezeptoren auf, signifikante Zusammenhänge zur CD 62p-Zahl sind jedoch nicht nachweisbar.

3.4.5c Vergleich mit CD 61

Spearman ρ										
	CD 61 Tag 1		CD 61 Tag 4		CD 61 Tag 14		CD 61 Tag 30		CD 61 Tag 90	
CD 41 - Tag 1	0,97	**x**	0,76	**x**	0,68	**x**	0,73	**x**	0,66	**x**
CD 41 - Tag 4	0,69	**x**	0,97	**x**	0,74	**x**	0,84	**x**	0,75	**x**
CD 41 - Tag 14	0,63	**x**	0,77	**x**	0,97	**x**	0,82	**x**	0,72	**x**
CD 41 - Tag 30	0,66	**x**	0,84	**x**	0,79	**x**	0,96	**x**	0,76	**x**
CD 41 - Tag 90	0,60	**x**	0,80	**x**	0,77	**x**	0,82	**x**	0,96	**x**
CD 42b – Tag 1	0,70	**x**	0,54	**x**	0,52	**x**	0,43	**x**	0,34	**+**
CD 42b – Tag 4	0,50	**x**	0,81	**x**	0,67	**x**	0,64	**x**	0,50	**x**
CD 42b – Tag 14	0,44	**x**	0,59	**x**	0,76	**x**	0,59	**x**	0,39	**+**
CD 42b – Tag 30	0,48	**x**	0,71	**x**	0,69	**x**	0,76	**x**	0,50	**x**
CD 42b – Tag 90	0,56	**x**	0,71	**x**	0,61	**x**	0,61	**x**	0,76	**x**
CD 62p - Tag 1	-0,18		-0,16		-0,11		-0,24		0,04	
CD 62p - Tag 4	-0,26		-0,07		-0,22		-0,08		-0,28	
CD 62p - Tag 14	-0,18		-0,25		-0,08		-0,22		-0,27	
CD 62p - Tag 30	-0,00		0,08		0,01		0,14		0,00	
CD 62p - Tag 90	0,08		0,14		0,30		0,23		0,12	

Tab. 3.42c: Vergleich der verschiedenen Rezeptoren mit CD 61 (Spearman`sche Rangkorrelation).
+: signifikant ($p<0,05$) **x**: hoch-signifikant ($p<0,01$)

Signifikante Zusammenhänge bestehen zwischen der nachgewiesenen Zahl der Rezeptoren CD 61 und CD 41 sowie CD 61 und CD 42b, nicht aber zur CD 62p-Expression.

3.4.5d Vergleich mit CD 62p

Spearman ρ					
	CD 62p Tag 1	CD 62p Tag 4	CD 62p Tag 14	CD 62p Tag 30	CD 62p Tag 90
CD 41 - Tag 1	-0,10	-0,28	-0,22	0,06	0,11
CD 41 - Tag 4	-0,13	-0,05	-0,20	0,01	0,19
CD 41 - Tag 14	-0,06	-0,12	-0,10	-0,04	0,31
CD 41 - Tag 30	-0,23	-0,06	-0,17	0,16	0,24
CD 41 - Tag 90	0,03	-0,19	-0,22	0,03	0,14
CD 42b – Tag 1	-0,24	-0,13	0,01	-0,25	-0,03
CD 42b – Tag 4	-0,09	-0,02	-0,02	-0,07	0,17
CD 42b – Tag 14	-0,18	-0,23	-0,07	-0,05	0,32
CD 42b – Tag 30	-0,28	0,08	0,00	-0,003	0,16
CD 42b – Tag 90	-0,16	-0,22	-0,26	-0,17	-0,09
CD 61 - Tag 1	-0,18	-0,26	-0,18	-0,00	0,08
CD 61 - Tag 4	-0,16	-0,07	-0,25	0,08	0,14
CD 61 - Tag 14	-0,11	-0,22	-0,08	0,01	0,30
CD 61 - Tag 30	-0,24	-0,08	-0,22	0,14	0,23
CD 61 - Tag 90	0,04	-0,28	-0,27	0,002	0,12

Tab. 3.42d: Vergleich der verschiedenen Rezeptoren mit CD 62p (Spearman`sche Rangkorrelation).
+: signifikant ($p<0,05$) **x**: hoch-signifikant ($p<0,01$)

Die quantitative CD 62p-Expression steht in keinem statistisch nachweisbaren Zusammenhang zur Anzahl der Rezeptoren CD 41, CD 42b oder CD 61. Teils lassen sich gegensinnige Entwicklungen der jeweiligen Anzahl erahnen, welche jedoch weder konstant zu beobachten sind, noch signifikant wurden.

3.4.5e Gepoolter Vergleich aller Rezeptoren miteinander

Spearman ρ								
	CD 41		CD 42b		CD 61		CD 62p	
CD 41	1,00		0,72	**p < 0,01**	0,97	**p < 0,01**	0,01	
CD 42b	0,72	**p < 0,01**	1,00		0,75	**p < 0,01**	-0,09	
CD 61	0,97	**p < 0,01**	0,75	**p < 0,01**	1,00		-0,03	
CD 62p	0,01		-0,09		-0,03		1,00	

Tab. 3.42e: Vergleich der verschiedenen Rezeptoren untereinander (Spearman`sche Rangkorrelation).

Die Rezeptorzahlen von CD 41, CD 42b und CD 61 verhielten sich jeweils gleichsinnig. Für CD62p zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zur Zahl der sonstigen Rezeptoren.

3.4.6 Geschlechtsunterschiede für alle Variablen gepoolt

Geschlechtsunterschiede						
Messzeitpunkt **t**		Mittelwert **M**	Standardabw. **SD**	Median **MED**	Stichprobe **n**	U-Test **p**
CD41	♀	39.739	9.089	39.704	100	
	♂	41.856	8.576	41.977	89	0,12
CD42b	♀	25.041	5.876	24.853	100	
	♂	28.565	5.198	27.665	89	**<0,0001**
CD61	♀	37.952	9.444	38.048	100	
	♂	40.170	8.523	41.206	89	0,08
CD62p	♀	511	206	521	100	
	♂	480	217	514	89	0,25

Tab. 3.43: Geschlechtsunterschiede, gepoolt für alle Variablen.

Frauen verfügen über eine signifikant geringere Anzahl des CD 42b-Rezeptors. Bzgl. CD 41, CD 61 und CD 62p bestehen keine quantitativen Geschlechtsunterschiede.

3.4.7 Alterskorrelation

		CD 41	CD 42b	CD 61	CD 62p
Alter	≤ 35 Jahre	44481 ± 7187	28668 ± 5382	43097 ± 7019	1,30 ± 1,67
	≥ 45 Jahre	36527 ± 8770	24490 ± 5530	34389 ± 8922	1,94 ± 3,09
p		**< 0,01**	**< 0,01**	**< 0,01**	**< 0,01**

Tab. 3.44: Beziehung der Rezeptorzahl zum Alter der Probanden (U-Test); n. s.: nicht signifikant

Es bestehen signifikant negative Zusammenhänge zwischen dem Alter der Probanden und der Anzahl der Rezeptoren CD 41, CD 42b sowie CD 61 mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von jeweils <1%. Bezüglich CD62p besteht ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang mit dem Alter.

4 DISKUSSION

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die durchflusszytometrische Analyse der Aktivität von Thrombozyten in einem gesunden Probandenkollektiv im zeitlichen Verlauf.
Diese Studie ist Bestandteil einer Gesamtstudie, in welche des weiteren neurologische Patienten mit hochgradigen Karotisstenosen sowie Patienten nach endovaskulärer Ballonangioplastie mit Stent-Implantation eingeschlossen werden sollen, welche eine thrombozytenaggregationshemmende Therapie anhand ASS oder Clopidogrel in Monotherapie sowie ASS plus Clopidogrel in Kombination erhalten.
Da bisher unbekannt ist, in welchem Maße eine Grundaktivierung der thrombozytären Gerinnung auch bei gesunden Personen ohne wesentliche Risikofaktoren vorliegt und wie diese sich über die Zeit ändert, soll die vorliegende Arbeit diese Frage vorrangig klären und bildet somit die Grundlage, entsprechende Rückschlüsse im o.g. Patientenkollektiv zu ziehen. Die Beobachtung soll darüber hinaus die Frage der Aktivitätsfluktuation klären.

Für die Bestimmung der Thrombozytenaktivierung wurde zur Identifizierung der Thrombozyten in der Vollblutprobe der GP Ib-Rezeptor (CD42b) genutzt. Als Marker der Thrombozyten-Aktivierung dienten CD62p (=P-Selektin bzw. GMP 140), ein unter Aktivierung aus Granula im Zellinneren freigesetzter Oberflächenrezeptor, sowie PAC-1, welcher ein durch Konformationsänderung im Rahmen der Aktivierung auftretendes Epitop markiert.
Aber auch andere Informationen können zur Beurteilung der Aktivierung herangezogen werden. So gilt beispielsweise der Thrombozytenabfall als einer der sensitivsten Marker[232,233], ist jedoch in vivo nicht ohne weiteres nachweisbar. Auch die Aggregatbildung, zeitlich zwischen Thrombozytenabfall und CD 62p-Expression anzusiedeln, wurde bereits vermehrt mit der Thrombozytenaktivierung in Zusammenhang gebracht[234,235,236] und ihre Bestimmung anhand durchflusszytometrischer Verfahren mehrfach etabliert[189, 206,237]. Mikropartikel tragen die thrombozytären Membranproteine GP Ib, GP IIb/IIIa und CD 62p und werden somit wie Thrombozyten in die Aggregatbildung mit einbezogen, sodass es unter Aktivierung zu einem Abfall der Partikelzahl kommt[206,238,239]. Die vorliegende Arbeit soll die Verhältnisse bezüglich aller dieser Aktivierungsmarker beim Gesunden betrachten.
Ziel der ADIAflo-Messreihe war die Quantifizierung der Rezeptoren CD 41, CD 42b, CD 61 und CD 62p, ebenfalls in der gesunden Probandenpopulation.

4.1 STUDIENDESIGN

Da neben der Aktivitätsbestimmung des gesunden Probanden auch die Aktivitätsfluktuation eine zentrale Frage darstellt, wurde die Beobachtung im Längsschnitt gewählt. Alle durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden dazu jeweils zu fünf definierten Zeitpunkten (Tag 1, Tag 4, Tag 14, Tag 30, Tag 90) wiederholt durchgeführt, dies gilt ebenso für die jeweilige Bestimmung des aktuellen Blutbildes einschließlich der Thrombozytenzahl.
Hier bleibt anzumerken, dass sich die Durchführung exakt zum definierten Tag aufgrund persönlicher Verhinderung der Probanden oder aber aufgrund der Ausschlusskriterien (z.B. Einnahme aggregationshemmender Medikamente innerhalb 7 Tage vor dem Untersuchungstag) in Einzelfällen geringfügig verzögert hat.

Die Probandenpopulation beinhaltet 38 Personen, welche entsprechend den Ausschlusskriterien (Alter, regelmäßige Einnahme von Thrombozyten-Aggregationshemmern, bekannte Gefäßerkrankungen) ausgewählt und den Gruppen zugeteilt wurden (männlich 20-35 Jahre, männlich 45-57 Jahre, weiblich 20-35 Jahre, weiblich 45-57 Jahre).
Kritikpunkt diesbezüglich bleibt sicher die Gruppengröße. Hier wurde jedoch speziell darauf Wert gelegt, alle Probanden den einzelnen Gruppen gleichmäßig zuzuteilen, um für einen möglichst repräsentativen Querschnitt zu sorgen.

4.2 BEWERTUNG DER METHODIK

Die Methode zur praktischen Durchführung der Untersuchungen zur CD62p-Expression sowie der PAC-1-Epitope der vorliegenden Studie einschließlich der Methode zur Probengewinnung basiert auf der Habilitationsschrift „Erkennung aktivierter Thrombozyten mit Hilfe des α-Granula-Membran-Proteins CD 62p (GMP-140)“[206], 1999 vorgelegt von Priv. Doz. Dr. med. A. Matzdorff an der Justus-Liebig-Universität Gießen.
Die Durchführung der ADIAflo-Messreihe erfolgte nach standardisierten Empfehlungen des Herstellers.

4.2.1 Probenentnahme

Da Thrombozyten sehr sensibel auf Aktivierungsinduktion reagieren, müssen bei Probenpräparation und -analyse, aber auch bereits bei der Probengewinnung optimale Bedingungen erfüllt sein, um eine artifizielle Veränderung der Zellen zu verhindern[150].
Es wurde nachgewiesen[206], dass die mittlere Zahl CD 62p-positiver Thrombozyten sowie die Schwankungsbreite in unaktivierten, frisch entnommenen Proben für die verwendete Methode mit den Befunden anderer Gruppen[184, 207, 208, 209, 210] vergleichbar ist. Außerdem wurde bereits nachgewiesen, dass bis zur 2. Minute nach Probenentnahme mit der verwendeten Technik keine vermehrte CD62p-Expression stattfindet.

4.2.2 Probenlagerung

Frühere durchflusszytometrische Untersuchungen fanden eine spontane Zunahme der CD62p-Expression und Freisetzung von Mikropartikeln nach 20-30 Minuten bei Raumtemperatur[211, 212]. Für unfixierte Proben wird daher die unmittelbare Verarbeitung innerhalb weniger Minuten nach Entnahme empfohlen[213]. Dies wurde in der vorliegenden Studie bzgl. der Untersuchung von PAC-1 berücksichtigt und gilt ebenfalls für die CD62p-Expression, welche an der fixierten Probe untersucht wurde.
Die Präparation der ADIAflo-Messreihe erfolgte nach standardisierter Methode entsprechend der Empfehlungen des Herstellers, dies trifft auch für die Lagerungsfähigkeit zu.

4.2.3 Antikoagulation und Fixierung

Zur Untersuchung einer Vollblutprobe ist zur Verhinderung der zwangsläufig einsetzenden Gerinnung die Antikoagulation unabdingbar. Hierbei muss den Eigenschaften der einzelnen Antikoagulanzien und v.a. ihrer Wirkungen auf den Zustand der Zelle Aufmerksamkeit geschenkt werden[214, 215]:
EDTA ist das am häufigsten verwendete Reagenz zur Thrombozytenzählung, da es die spontane Aggregation verhindert bzw. bestehende kleine Aggregate aufzulösen vermag[216, 217]. Dennoch hat EDTA Auswirkungen auf Thrombozytenform und –größe, sodass es für die Beurteilung dieser als Aktivierungsmarker der Probe nicht beigefügt werden darf[217, 218].

Gleiches gilt für die Untersuchung des Aggregationsverhaltens, da EDTA eine Konformationsänderung am GP IIb/IIIa-Rezeptor herbei führt und darüber hinaus die verminderte GP Ib- sowie vermehrte CD 62p-Expression bedingt[219, 220, 221, 222].
Hier eignete sich am besten die Verwendung von *Citrat*[214], welches keine spontane, artifizielle Größenänderung oder Änderung am GP IIb/IIIa-Komplex bewirkt[220]. Zwar modifiziert Citrat die Thrombozytenreaktion auf bestimmte Agonisten[214, 215], doch spielt dies für die vorliegende Arbeit keine Rolle, da keine Aktivierung vorgenommen wurde. Citrat war Ausgangs-Medium der Wahl für die PAC-1-Analyse sowie die ADIAflo-Messreihe. Nachteile sind jedoch einerseits die nur kurzzeitig mögliche Probenlagerung[211, 212] und die spontane Aggregation[216] sowie CD 62p-Expression bei Bewegungen der Probe[210], v.a. bei Körpertemperatur.
In diesem Zusammenhang bedurfte es zur CD62p-Bestimmung der *Probenfixierung*, welche Aktivierung und Aggregation aufgrund noch in der Probe befindlicher Reste von Agonisten oder aufgrund längerer Präparationszeiten während der Weiterverarbeitung unterbinden sollte[211, 214] und außerdem verhindert, dass sich agonisteninduzierte Veränderungen während der Präparation zurückbilden[223, 224]. Schon allein durch die Pipetiervorgänge, aber auch während Wasch- und Lyseverfahren können aktivierte Thrombozyten verloren gehen und würden ohne Fixierung somit der Analyse nicht mehr zur Verfügung stehen[187, 225]. Kommerziell erhältliche CD62p-Antikörper erkennen das Antigen auch auf fixierten Thrombozyten und sind entsprechend gut geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde CyFix III verwendet, da es bereits von mehreren Arbeitsgruppen erfolgreich eingesetzt wird, nachdem kein störender Einfluss auf die CD 62p-Expression[226] oder Erkennung CD 62p-positiver Thrombozyten[206] festgestellt werden konnte.

4.2.4 Laborchemische Genauigkeit

Durch die Markierung mit spezifischen Antikörpern ist eine optische Trennung der Thrombozyten von anderen Partikeln gleicher Größe in der Durchflusszytometrie sicher möglich. Sie ermöglicht darüber hinaus die Unterscheidung von aktivierten Thrombozyten, Mikropartikeln und Aggregaten[206, 211, 227], was für die Bestimmungen zur Thrombozytenaktivierung anhand CD 62p und PAC-1 genutzt wurde. Zur Kontrolle wurden Isotyp-Messungen durchgeführt.

Für die Berechnung der Rezeptorzahlen (CD 41, CD 42b, CD61 und CD 62p) im Rahmen der ADIAflo-Messreihe wurde anhand der in der Reagenz-Originalpackung enthaltenen Beads regelmäßig die zur Auswertung benötigte mittlere Fluoreszenz (Mean Fluorescence) ermittelt. Außerdem wurden auch hier für jeden Probanden an jedem Messtag Isotyp-Kontrollen angesetzt und bestimmt.

Die Geräteeinstellungen am FACSCalibur Durchflusszytometer wurden regelmäßig überprüft und justiert.

4.3 BEWERTUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE

4.3.1 Anzahl der Thrombozyten im Blutbild, Geschlechtsunterschiede und Abhängigkeit vom Alter

Die Thrombozytenzahlen aller Probanden entsprachen mit sehr wenigen Ausnahmen weitgehend den allgemeinen Normwerten der klinischen Chemie (150.000-350.000/µl) und wiesen während der gesamten Studie keine signifikanten Abweichungen zwischen den einzelnen Beobachtungs-Zeitpunkten auf, es konnte keine Altersabhängigkeit festgestellt werden. Dennoch wurde ein Geschlechtsunterschied deutlich, wobei im weiblichen Kollektiv im Vergleich hochsignifikant höhere Thrombozytenzahlen festgestellt wurden.

4.3.2 CD62p-Expression auf aktivierten Thrombozyten und anteiliges Vorliegen der Thrombozyten als singuläre Plättchen, Mikropartikel oder Aggregate

Die CD62p-Expression auf der Thrombozytenoberfläche erfolgt durch Degranulation aus den intrazellulären Granula, nachdem ein aktivierender Stimulus, z.B. durch Thrombin, gesetzt wurde. Nachgewiesen werden diese Rezeptoren durch Markierung anhand monoklonaler Antikörper, welche unter Zusetzen fluoreszierender Marker im Durchflusszytometer erkannt und Software-unterstützt graphisch sichtbar gemacht werden. Der Nachweis von CD62p ist eine der am häufigsten angewandten Methoden zur Erkennung aktivierter Thrombozyten im Durchflusszytometer[72, 146, 150, 207, 228, 229].

In früheren Untersuchungen hat sich gezeigt, dass CD62p auf ruhenden Thrombozyten mit maximal 1.000-2.000 Molekülen exprimiert wird[230, 231] und nach Aktivierung um das 10-20fache ansteigt[174, 227, 230, 231]. Auf die Bedeutung der Mikropartikel und Aggregate wurde bereits in der Einführung näher eingegangen.

4.3.2.1 Quantitative Vergleiche aller Probanden im Verlauf bzgl. CD62p-Expression und des Vorliegens der Thrombozyten in den verschiedenen Zellformen

Der quantitative Vergleich der *CD62p-positiven Thrombozyten*, alle Probanden zusammengenommen, ergab im dreimonatigen Verlauf der vorliegenden Studie keinerlei

signifikante Abweichungen zwischen den einzelnen Messtagen. Die gleiche Feststellung trifft auch für die Untersuchung des gleichzeitig vorliegenden Anteils an *Singuletten und Mikropartikeln* zu.
Hiervon wich allerdings der *Aggregatanteil* am Tag 90 ab, welcher hochsignifikant geringer ausfiel, als an den zuvor beobachteten Messtagen. Die nähere Betrachtung brachte im Vergleich der einzelnen Untersuchungstage untereinander jedoch keine eindeutige Erklärung hierfür, da in der prozentualen Betrachtung jeweils mindestens signifikant positive Zusammenhänge zwischen allen Beobachtungszeitpunkten bestehen, während in der Betrachtung des Aggregatanteiles/µl für den paarweisen Vergleich in zwei Fällen kein solcher herausgestellt werden konnte.

4.3.2.2 Abhängigkeiten zwischen dem Vorliegen der verschiedenen Zellformen und der CD62p-Expression

Die Untersuchung, in welchem Verhältnis zueinander CD62p-positive Thrombozyten, Singuletten, Mikropartikel und Aggregate vorliegen, ergab Folgendes:
Bei steigendem Anteil CD62p-positiver, aktivierter Thrombozyten stieg auch der Anteil der Thrombozytenaggregate hochsignifikant. Die Zellen in vereinzelter, ruhender Form (Singuletten) jedoch waren in hochsignifikant geringerem Anteil nachweisbar. Diese Beobachtung deckt sich mit den Erläuterungen zur Bedeutung der einzelnen Zellformen, wie im einleitenden Teil der Diskussion beschrieben. Laut früheren Publikationen hätte man idealerweise noch einen Abfall der Mikropartikel erwartet, deren Anteil veränderte sich in dieser Untersuchung jedoch nicht signifikant.
Deutlich wurde aber, dass umso weniger Thrombozyten in Form von Mikropartikeln, Aggregaten oder mit CD62p-Expression vorlagen, je höher der Anteil der ruhenden, vereinzelten Thrombozyten war. Dieser Zusammenhang ist hochsignifikant und deckt sich weitgehend mit dem bisherigen Verständnis der Thrombozytenaktivierung. Lediglich bezüglich des gleichzeitigen Mikropartikel-Abfalls mit steigender Singulettenzahl wurden in früheren Publikationen gegenteilige Beobachtungen beschrieben.

4.3.2.3 Geschlechtsunterschiede

Bezüglich des Anteils *CD62p-exprimierender Zellen* sowie der *Mikropartikel* ergaben sich im Verlauf keine durch das Geschlecht bedingten Unterschiede.
Der Anteil der *Singuletten* hingegen war an drei der fünf Untersuchungstage (01, 04, 90), sowie bei der Betrachtung aller Messzeitpunkte gemeinsam, im weiblichen Geschlecht gegenüber den männlichen Probanden signifikant erhöht.
Bzgl. der *Aggregate* ist die Aussage zunächst nicht eindeutig zu werten, da nur die prozentuale Auswertung signifikante Geschlechtsunterschiede an den Tagen 04 und 30 aufzeigte, Männer wiesen hier jeweils durchschnittlich höhere Anteile auf.
Aufklärung bringt erst die Auswertung der einzelnen genannten Parameter für alle Untersuchungstage gepoolt, denn hier ergeben sich hochsignifikante Geschlechtsunterschiede: bei den männlichen Probanden zeigte sich ein höherer Anteil an Aggregaten, während die weiblichen Probanden einen höheren Anteil an Singulären Plättchen aufwiesen. Inwiefern hier beispielsweise hormonelle Unterschiede oder aber Lebensgewohnheiten (Rauchen, Medikamente etc.) eine Rolle spielen, könnte in einer neu angelegten Studie zum Thema werden. Die sonstigen Parameter verhalten sich entsprechend den Ausführungen in der Verlaufsbetrachtung.

4.3.2.4 Abhängigkeit vom Alter

Mit zunehmendem Alter sank der Singuletten-Anteil deutlich ab, während der Anteil an Mikropartikeln sowie die Expression von CD62p hochsignifikant zunahmen. Der Anteil der Aggregate verhielt sich unabhängig.

4.3.3 Nachweis von PAC-1-Epitopen und anteilhaftes Vorliegen der Thrombozyten als singuläre Plättchen, Mikropartikel oder Aggregate

PAC-1 stellt einen monoklonalen Antikörper dar, welcher im Zuge der Thrombozytenaktivierung und Konformationsänderung der Zelle die Fibrinogen-Bindungsstelle des GP IIb/IIIa-Rezeptors erkennt und markiert[211]. Daher eignet er sich gut zur Quantifizierung des Aktivierungszustandes, ist jedoch vergleichsweise noch wenig umfangreich getestet.

4.3.3.1 Quantitative Vergleiche aller Probanden im Verlauf bzgl. GP IIb/IIIa-Markierung anhand PAC-1 und Vorliegens der Thrombozyten in den verschiedenen Zellformen

Der quantitative Vergleich der *PAC-1-positiven Thrombozyten* aller Probanden ergab im dreimonatigen Verlauf der vorliegenden Studie keine Abweichungen. Die gleiche Feststellung trifft für die Untersuchung der *Singuletten, Mikropartikel und Aggregate* zu, deren jeweilige Anteile an der Gesamtthrombozytenzahl über den gesamten Zeitraum stabil blieben.

4.3.3.2 Abhängigkeiten des Vorliegens der verschiedenen Zellformen und der Gp IIb/IIIa-Markierung anhand PAC-1

Bezüglich der Anzahl *PAC-1-positiver Thrombozyten* konnte kein Zusammenhang zur jeweiligen Verteilung der Gesamtplättchenzahl in die einzelnen Unterformen hergestellt werden.
Deutlich wurde jedoch, dass umso weniger Thrombozyten in Form von *Aggregaten* vorlagen, je höher der Anteil der *ruhenden, vereinzelten Thrombozyten* war, welche wiederum mehrfach in mindestens signifikant positivem Verhältnis zum Anteil der *Mikropartikel* standen. Auch Aggregate und Mikropartikel verhielten sich hochsignifikant gegenläufig.
Dieses Ergebnis entspricht dem derzeitigen Verständnis der gleichzeitig mit der Aktivierung und zunehmenden Aggregatbildung sinkenden Anteile an ruhenden Thrombozyten und Mikropartikeln.

4.3.3.3 Geschlechtsunterschiede

Der Anteil „aktivierter“, *PAC-1-positiver Thrombozyten* wurde zu den einzelnen Beobachtungszeitpunkten bei beiden Geschlechtern in ähnlichem Maße gefunden, es ließen sich also keine signifikanten Unterschiede feststellen. Gleiches gilt für die jeweiligen Anteile der Mikropartikel und Aggregate. Die Single Platelets zeigten einmalig am Tag 30 einen signifikant höheren Anteil beim weiblichen Geschlecht.
Wenn alle Messtage gepoolt betrachtet wurden, bestätigte sich nochmals die in den Geschlechtern gleichsinnige Ausprägung der Aktivierung am GP IIb/IIIa-Rezeptor. Der Anteil der Singuletten an der Gesamtzellzahl stellte sich hier beim weiblichen Geschlecht jedoch hochsignifikant höher, der Anteil der Aggregate entsprechend signifikant geringer dar. Diese Beobachtung deckt sich mit dem Ergebnis der CD62p-Bestimmung (siehe Kapitel 4.3.2.3).

4.3.3.4 Abhängigkeit vom Alter

PAC-1 zeigte in der Betrachtung der Abhängigkeit vom Alter einen hochsignifikant positiven Zusammenhang, sodass mit zunehmendem Alter eine auch zunehmende Aktivität am GPIIb/IIIa-Rezeptor diskutiert werden kann.
Die Zahl der Mikropartikel scheint ebenfalls mit steigendem Alter signifikant zuzunehmen. Genauere Aussagen diesbezüglich würde eine größere Probandenpopulation zulassen.

4.3.4 ADIAflo-Messreihe: Quantitativer Nachweis von CD41, CD42b, CD61 und CD62p

4.3.4.1 CD 41 (GP IIb/IIIa)

Die Angaben über die pro Thrombozyt vorliegende Anzahl der verschiedenen Rezeptoren sind sehr variabel, sodass Zahlen zwischen ca. 50.000 und 100.000 CD 41-Rezeptoren angenommen werden können.
Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden durchschnittlich ca. 41.000 CD 41-Rezeptoren je Thrombozyt gezählt. Die Anzahl unterlag keinen wesentlichen Schwankungen

im Verlauf der dreimonatigen Beobachtungszeit, lediglich am Tag 90 wurde mit durchschnittlich nur ca. 37.000 Rezeptoren eine signifikante Abweichung festgestellt.

4.3.4.2 CD 42b (GP Ib)

Für die Anzahl an CD 42b-Rezeptoren je Thrombozyt werden Zahlen zwischen 25.000 und 50.000 angenommen, auch hier sind die Angaben außerordentlich variabel.
In dieser Studie betrug die durchschnittliche Rezeptorzahl für CD 42b etwa 27.000 pro Plättchen. Signifikante Schwankungen wurden im Verlauf der fünf Beobachtungszeitpunkte nicht deutlich.

4.3.4.3 CD 61 (GP IIIa)

In der Literatur wird die Zahl der CD61-Bindungsstellen mit um die 50.000 angegeben, z.T. höher und niedriger. Dies hängt wahrscheinlich von der Präparation und der Bindungsaffinität des verwendeten Antikörpers ab. Wir messen im Verlauf der dreimonatigen Beobachtungszeit ca. 39.000 CD61-Bindungsstellen pro Thrombozyt und diese Zahl bleibt weitgehend konstant. Am Tag 90 zeigte sich eine signifikante Abweichung (36.000 je Plättchen) von den früheren Messtagen.

4.3.4.4 CD 62p (GMP-140)

Die Zahl der CD62p-Rezeptoren als Marker der Thrombozytenaktivierung betrug jeweils etwa 500 pro Thrombozyt, andere Arbeitsgruppen beschreiben ebenfalls max. 1000-2000 Bindungsstellen pro Thrombozyt[230,231] und Vervielfachungen um das 10-20fache nach erfolgter Aktivierung. Erklärbar ist diese Differenz möglicherweise dadurch, dass in der vorliegenden Studie keinerlei Aktivierung über den jeweilig bestehenden Ausgangszustand der Plättchen im Vollblut hinaus vorgenommen wurde und entsprechend nur ein Bruchteil der bei Aktivierung erst aus dem Zellinneren exprimierten Rezeptoren auch nachweisbar werden konnte. Schwankungen im Verlauf des Beobachtungszeitraumes traten nicht auf.

4.3.4.5 Verhältnis der Rezeptorzahl-Änderungen in Abhängigkeit der einzelnen Rezeptoren untereinander

Für das Vorliegen der Rezeptoren CD 41, CD 42b und CD 61 als feste Bestandteile der Thrombozyten-Oberfläche ergaben sich auch entsprechend gleichsinnige Verhältnisse bezüglich ihrer Anzahl. Ein signifikanter Zusammenhang zur Anzahl der erst im Rahmen der Aktivierung exprimierten CD 62p-Rezeptoren konnte folglich nicht nachgewiesen werden.

4.3.4.6 Geschlechtsunterschiede für alle Variablen gepoolt

Alle Messtage insgesamt betrachtet, fällt als einziger bei den Geschlechtern hochsignifikant in verschiedener Anzahl ausgeprägter Rezeptor CD 42b auf. Die Rezeptorzahl lag hier unter den weiblichen Probanden mit 25.000 durchschnittlich niedriger als beim männlichen Geschlecht (28.500).

4.3.4.7 Abhängigkeit der jeweiligen Rezeptor-Anzahl vom Alter

Mit zunehmendem Alter der Probanden fanden sich hochsignifikant geringere Ausprägungen für CD 41, CD 42b und CD 61. Einzig für CD 62p als flexibel exprimierten Rezeptor im Rahmen der Plättchenaktivierung ließ sich diesbezüglich eine vermehrte Expression mit zunehmendem Alter nachweisen.

4.4 AUSBLICK

Als Teil einer Gesamtstudie, deren Ziel die zusätzliche Analyse der hier untersuchten Rezeptor- und Aktivierungsverhältnisse auch bei neurologischen Patienten mit hochgradigen Karotisstenosen sowie nach stentgeschützter Ballonangioplastie unter thrombozytenaggregationshemmender Therapie mit ASS und/ oder Clopidogrel in Mono- oder Kombinationstherapie ist, liefert diese Arbeit wichtige Informationen über die Verhältnisse beim gesunden Erwachsenen. Dies schließt auch Geschlechtsunterschiede sowie Veränderungen mit zunehmendem Alter ein. Gemessen hieran wird es möglich sein, die Thrombozytenaktivität von Patienten vergleichend mit den hier erbrachten Ausgangswerten zu beurteilen.

CD62p und PAC-1 als Aktivierungsmarker werden bei erhöhter thrombozytärer Aktivierung im Rahmen der genannten Konstellationen in wesentlich höherer Zahl auf der Zelloberfläche erwartet als beim gesunden Erwachsenen.

Ebenso wird der umgekehrte Zusammenhang zwischen dem Anteil der ruhenden, singulären Plättchen sowie dem Abfall der Mikropartikelzahl auf der einen Seite und dem Anteil der CD62p-Expression, PAC-1-positiven Bindungsstellen sowie der Aggregate als Marker der Aktivierung auf der anderen Seite deutlicher werden und Rückschlüsse auf den Grad der thrombozytären Aktivierung zulassen.

Diese Erkenntnisse könnten möglicherweise sogar dienlich sein, um Therapie-Versagen unter ASS und/ oder Clopidogrel zu erkennen und zu beobachten, bzw. die thrombozytenaggregationshemmende Wirkung und Therapie neu zu beurteilen und ggf. umzustellen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der durchflusszytometrischen Analyse der Aktivität von Thrombozyten innerhalb eines gesunden Probandenkollektivs von 38 Personen (20 Frauen, 18 Männer, jeweils im Alter zwischen 20 und 35 Jahren sowie 45 und 57 Jahren). Sie soll die Frage klären, inwiefern eine Grundaktivierung der thrombozytären Gerinnung auch bei Personen ohne wesentliche Risikofaktoren, wie hämodynamisch relevante Karotisstenosen, vorliegt und ob im Rahmen einer Längsschnittbeobachtung über 5 definierte Zeitpunkte innerhalb von 3 Monaten (Tag 1, Tag 4, Tag 14, Tag 30, Tag 90) Fluktuationen der thrombozytären Aktivität auftreten. Eine manuell herbeigeführte, zusätzliche Aktivierung erfolgte hierbei nicht.
Als Bestandteil einer Gesamtstudie, in welcher künftig außerdem Probanden mit hochgradigen Karotisstenosen sowie Patienten nach endovaskulärer Ballonangioplastie mit Stent-Implantation untersucht werden sollen, welche zudem eine thrombozytenaggregationshemmende Therapie anhand ASS und/ oder Clopidogrel erfahren, liefert diese Arbeit wichtige Ausgangsinformationen.

Für die Identifizierung der Thrombozyten aus der Vollblutprobe wurde der Gp Ib-Rezeptor CD 42b genutzt, welcher durch Bindung eines fluorochrom-markierten, spezifischen Antikörpers im Durchflusszytometer erkannt und quantifiziert werden kann. Als Marker der Thrombozytenaktivierung dienten auf gleiche Weise CD 62p (P-Selektin bzw. GMP 140), ein unter Aktivierung aus den im Inneren der Thrombozyten gespeicherten α-Granula freigesetzter Oberflächenrezeptor, sowie PAC-1, ein Antikörper, welcher ein durch Konformationsänderung im Rahmen der Aktivierung freigesetztes Epitop am GpIIb/IIIa-Rezeptor (CD41/CD61) markiert. Durch die Markierung der Zellen anhand spezifischer Antikörper ist eine Trennung der Thrombozyten von anderen Partikeln gleicher Größe, die Unterscheidung der Zellformen singuläres Plättchen, Aggregat oder Mikropartikel sowie die Bestimmung deren prozentualer Anteile sicher möglich. Auch diese verschiedenen Zellformen lassen Rückschlüsse auf den Aktivierungszustand der Thrombozyten zu.
Des Weiteren wurde eine Quantifizierung der Rezeptoren CD 41, CD 42b, CD 61 und CD 62p vorgenommen.

Unsere Ausgangshypothese war, dass sich sowohl die Anzahl der Blutplättchen im Blutbild der Probanden, als auch die Grundaktivität im gesunden Kollektiv nach Einhaltung der

Ausschlusskriterien (Alter, regelmäßige Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern bzw. Einnahme innerhalb 7 Tagen vor dem Untersuchungstag, bekannte Gefäßerkrankungen) im zeitlichen Verlauf der beobachteten 3 Monate nicht verändern dürften.

Es zeigten sich, wie erwartet, keine signifikanten Abweichungen von den allgemeinen Normwerten bezüglich der Thrombozytenzahlen, auch waren diese nicht abhängig vom Alter. Jedoch fielen die Zählungen im weiblichen Geschlecht insgesamt höher aus.

Die Anzahl des zur Identifizierung der Blutplättchen sehr gut geeigneten und daher genutzten CD 42b-Rezeptors betrug etwa 27.000 je Thrombozyt und blieb im zeitlichen Verlauf konstant. Frauen scheinen über eine höhere Anzahl dieser Rezeptoren zu verfügen als Männer.

CD62p als im Rahmen der Thrombozytenaktivierung aus dem Zellinneren freigesetzter und an der Zelloberfläche exprimierter Rezeptor ist als Aktivierungsmarker sehr gut geeignet. Seine Anzahl auf ruhenden, nicht aktivierten Plättchen konnte auf etwa 500 je Zelle quantifiziert werden und blieb im zeitlichen Verlauf insgesamt stabil. Bei Abweichungen bestätigten sich die bereits früher von anderen Arbeitsgruppen herausgestellten Beobachtungen, nämlich ein umgekehrter Zusammenhang zwischen dem Anteil der ruhenden, singulären Plättchen auf der einen Seite und dem Anteil der CD62p-Expression und Aggregate als Marker der Aktivierung auf der anderen Seite. Der in früheren Untersuchungen deutlich gewordene Abfall der Mikropartikelzahl mit zunehmender Aktivierung konnte in diesem Fall nicht gezeigt werden, möglicherweise spielt hier die niedrige Probandenzahl eine entscheidende Rolle. Geschlechtsgebundene Unterschiede ergaben sich nicht, allerdings lagen bei Frauen gleichzeitig durchschnittlich mehr Plättchen in ruhender Form, bei Männern höhere Anteile in aggregierter Form vor. Inwiefern hier hormonelle Unterschiede oder auch Lebensgewohnheiten möglicherweise eine Rolle spielen, könnte eine neu angelegte Studie klären. Mit zunehmendem Alter fiel eine vermehrte Expression von CD62p an die Thrombozytenoberfläche auf.

Die Quantifizierung von CD 41 und CD 61 als den GpIIb/IIIa-Rezeptor bildende Variablen ergab eine weitestgehend konstante Anzahl von ca. 41.000 je Zelle für CD 41 und ca. 39.000 je Zelle für CD 61.

PAC-1 als im Zuge der Thrombozytenaktivierung und Konformationsänderung die Fibrinogen-Bindungsstelle des GpIIb/IIIa-Rezeptors markierender Antikörper war zweiter untersuchter Marker des Aktivierungsverhaltens. Auch hier zeigten sich stabile quantitative Verhältnisse über den Beobachtungszeitraum hinweg. Wie in der CD62p-Bestimmung fand sich wiederum der gegenläufige Zusammenhang zwischen ruhenden Plättchen einerseits und der Aggregatbildung andererseits, sogar der Mikropartikelabfall mit zunehmendem Grad der Aktivierung wurde diesmal deutlich.
Die Anzahl der PAC-1-markierten Rezeptoren war nicht geschlechts-, aber sehr wohl proportional positiv altersabhängig. Die Beobachtungen bezüglich geschlechtsgebundenem Anteil der Aggregate und Singuletten aus der CD62p-Untersuchung bestätigte sich.

In der Gruppe mit höherem Lebensalter wurden signifikant niedrigere Rezeptorzahlen pro Thrombozyt für CD 41, CD 42b und CD 61 beobachtet. Inwiefern sich diese Beobachtung in einem größeren Kollektiv bestätigt, müsste eine erweiterte Studie zeigen.

SUMMARY

This study is meant to analyze platelet activation of healthy people (20 women, 18 men at the age of 20 to 35 years or 45 to 57 years) by flow cytometry. The questions to be answered are: what is the basic level of platelet coagulation activity with people that do not have a higher risk for stroke (for example hemodynamic relevant stenosis of the carotids) and how far is this level changing in between an investigated period of 3 months (day 1-4-14-30-90). We did not cause activation artificially.
As part of a comprehensive study that will also include patients with hemodynamic relevant stenosis of the carotids and patients treated by endovascular angioplasty or stent implantation that are treated with acetylsalicylacid and/ or clopidogrel afterwards, this study will supply important basic information.

For platelet identification we used fluorescence marked anti-CD 42b-Mab that binds to the GpIIb/IIIa receptor and can easily be identified and counted by flow cytometry. The same way we used anti-CD 62p-Mab (expressed from the platelet's inside under activation) and PAC-1 (marks an epitope of Gp IIb/IIIa shown under activation). Because of the specific antibodies and marking by fluorocrome flow cytometry is able to identify platelets out of particles of the same size and it is also able to differentiate and count single platelets, aggregates and microparticles what gives even more information about activation level.
Apart from that we quantified the count of CD 41, CD 42b, CD 61 and CD 62p on the platelet surface.

We assumed there would not be found relevant changes in platelet count or basic activity with healthy people that fitted in age, did not show hemodynamic relevant stenosis of carotids and did not use platelet aggregation inhibitors for at least 7 days before analysis.

The results did not show variation from known standards concerning platelet count. Also there was no dependence to the age. But we found higher platelet counts with women.

CD 42b, used for platelet identification, was quantified with about 27.000 receptors on each platelet surface, these counts did not vary during the analyzed period. Women showed more receptors of this type than men.

CD 62p, expressed on the platelet surface from the platelet's inside under activation, was quantified with about 500 receptors/ platelet, these counts did not vary during the analyzed period as well. Interesting was the phenomenon already watched by other study groups: the less the amount of single platelets, the higher the amount of platelet aggregates and CD 62p expression as activation markers. Only the watched decrease of micro particles under activation could not be found. Possibly the amount of part taking people was not high enough to figure this out, properly.
There could not be found any dependencies of the CD 62p count to the sex. Women showed higher amounts of single platelets, men of aggregates. In what way hormones or lifestyle (for example smoking) have an effect, could be analyzed in another study. We found increasing CD 62p counts with increasing age.

Quantification of CD 41 and CD 61 (both are part of the Gp IIb/IIIa receptor) counted constantly about 41.000 CD 41 receptors and about 39.000 CD 61 receptors on each platelet's surface.
PAC-1 (marking the fibrinogen binding epitope of Gp IIb/IIIa under activation) was also analyzed and showed constant quantitative counts. Apart from equal results to the CD 62p analysis concerning the amount of single platelets and platelet aggregates as activation markers this part of the analysis even showed the expected decrease of micro particles.
The count of PAC-1 positive platelets was not dependent to the sex, but proportionally dependent to the age. Again women showed higher amounts of single platelets, men of aggregates (as the analysis of CD 62p had already shown).

Finally we found significantly decreasing receptor counts for CD 41, CD 42b and CD 61 with increasing age. The validity of this result has to be shown in a new study with a larger cohort size.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1 **Weiss Ch, Jelkmann W.** Funktionen des Blutes. Thrombozyten. In: **Schmidt RF, Thews G (Hrsg.)**. Physiologie des Menschen. **Springer, Berlin-Heidelberg-New York**. 27. Auflage, 1997; 426-34

2 **Junquera, Carneiro.** Blutplättchen. In: Histologie. **Springer, Berlin-Heidelberg-New York.** 4. Auflage, 1996; 323

3 **George JN.** Platelets. **Lancet** 2000; 355: 1531-39

4 **Kühnel W.** Thrombozyten. In: Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. **Thieme, Stuttgart-New York.** 9. Auflage, 1995; 234

5 **Behnke O, Forer A.** From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. **Eur J Haematol** 1998; 60: 3-23

6 **Kaushansky K.** Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. **Blood** 1995; 86: 419-31

7 **Rodgers GM.** Overview of platelet physiology and laboratory evaluation of platelet function. **Clin Obstet Gynecol** 1999; 42(2): 349-59

8 **Bizzozero J.** Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. **Arch Pathol Anat Physiol** 1881; 90: 261-332

9 **Hayem G**. Sur le méchanism de l ´arrête des hémorrhagies. **C R Acad Sci** 1882 ; 95: 18-21

10 **Eberth JC, Schimmelbusch C**. Experimentelle Untersuchungen über Thrombose. **Virchows Arch Pathol Anat Physiol** 1886; 103: 39-87

11 **Hellem AJ**. The adhesiveness of human blood platelets in vitro. **Scand J Clin Lab Invest** 1960; 12 (suppl.51): 1-117

12 **Born GVR**. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. **Nature** 1962; 194: 927-29

13 **Jürgens R, Braunsteiner H**. Zur Pathogenese der Thrombose. **Schweiz Med Wochenschr** 1950; 80: 1388-94

14 **O'Brien JR**. Platelet aggregation. Part I. Some effects of the adenosine phosphates, thrombin, and cocaine upon platelet adhesiveness. Part II. Some results from a new method of study. **J Clin Pathol** 1962; 15: 446-55

15 **Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B**. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. **Proc Natl Acad Sci** USA 1975; 72: 2994-98

16 **Roth GJ, Stanford N, Majerus PW**. Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. **Proc Natl Acad Sci USA** 1975; 72: 3073-76

17 **Marcus AJ**. Aspirin as an antithrombotic medication. **N Engl J Med** 1983; 309: 1515-17

18 **Patrono C**. Aspirin as an antiplatelet drug. **N Engl J Med** 1994; 330: 1287-94

19 **Packham MA, Mustard FA**. Interactions of platelet activating pathways: studies with inhibitors specific for individual pathways. **In: Holmsen H (Hrsg.)**. Platelet Responses and Metabolism. **CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida** 1986, 267-83

20 **Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N**. Integrin signaling: the platelet paradigm. **Blood** 1998; 91: 2645-57

[21] **Lüscher EF**. Rapid Shape Change-When, why and to what Purpose? **Thromb Haemost** 2000; 84: 1130

[22] **Levy-Toledano S**. Platelet Signal Transduction Pathways: Could We Organize Them into a Hierarchy´? **Haemostasis** 1999; 29: 4-15

[23] Physiologie des Hämostasesystems. **In: Mueller-Eckhardt C. (Hrsg.)**. Transfusionsmedizin-Grundlagen, Therapie, Methodik. **Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.** 2. Auflage, 1996.

[24] **Wörterbuch-Redaktion des Verlages unter Leitung von Hildebrandt, H.** Integrine. **In: Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch**. **de Gruyter Berlin, New York.** 257. Auflage, 1994; 728

[25] **Calvete JJ.** Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. **Thromb Haemost** 1994; 72: 1-15

[26] **Koksch M, Woinke M** (1998). Durchflußzytometrische Thrombozytendiagnostik (Skript). Vom Labor zur klinischen Fragestellung, **Zentrum für Innere Medizin, Universität Leipzig**

[27] **Metzelaar MJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK**. A new cluster of activation-dependent mAb recognizing a 53-kDa lysosome-like granule protein, expressed on the plasma membrane after activation. **In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, von dem Borne AEGKr (Hrsg.).** Leucocyte typing IV. White cell antigens. **Oxford Univ. press, Oxford**, 1989, 1043-44

[28] **Berman CL, Yeo EL, Wencel-Drake JD, Furie B**. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. **J Clin Invest** 1986; 78: 130-37

[29] **Stenberg PE, Mc Ever RP, Shuman MA, Jaques YV, Bainton DF**. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. **J Cell Biol** 1985; 101: 880-86

[30] **Wörterbuch-Redaktion des Verlages unter Leitung von Hildebrandt, H.** Selektine. **In: Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch. de Gruyter Berlin, New York.** 257. Auflage, 1994; 1407

[31] **Rodgers GM**. Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells. **FASEB J**. 1988; 2: 116-23

[32] **Aarts PAMM, Heethaar RM, Sixma JJ**. Red blood cell deformability influences platelet vessel wall interaction in flowing blood. **Blood** 1984; 64: 1228-33

[33] **Bilsker DL, Waters CM, Kippenhan JS, Eckstein EC**. A freeze-capture method for the study of platelet sized particle distributions. **Biorheology** 1989; 26: 1031-40

[34] **Davies MJ**. A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. **Circulation** 1990; 82 (Suppl.II): II-38-46

[35] **Wörterbuch-Redaktion des Verlages unter Leitung von Hildebrandt, H.** Willebrand-Faktor. **In: Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch**. **de Gruyter Berlin, New York.** 257. Auflage, 1994; 1664

[36] **Ruggeri ZM**. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. **Thromb Haemost** 1997; 78: 611-16

[37] **Charo IF, Kieffer N, Phillips DR**. Platelet membrane glycoproteins. **In: Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW, eds.** Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. **Philadelphia, PA: JB Lippincott Co.**, 1994; 489-507

[38] **Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ**. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. **N Engl J Med** 1995; 332: 11553-59

[39] **Wurzinger LJ, Blasberg P, van de Loecht M, Suwelack W, Schmid-Schönbein H**. Model experiments on platelet adhesion in stagnation point flow. **Biorheology** 1984; 21: 649-59

[40] **Konstantopoulos K, Wu KK, Udden MM, Bañez EI, Shattil SJ, Hellums JD**. Flow cytometric studies of platelet responses to shear stress in whole blood. **Biorheology** 1995; 32: 73-93

[41] **Kehrel B**. Platelet-collagen interactions. **Semin Thromb Hemost** 1995; 21: 123-29

[42] **Sixma JJ, van Zanten H, Huizinga EG, van der Plas RM, Verkley M, Wu YP, Gros P, de Groot PG**. Platelet adhesion to collagen: an update. **Thromb Haemost** 1997; 78: 434-38

[43] **Sakariassen KS, Bolhuis PA, Sixma JJ**. Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-von Willebrand factor bond to the subendothelium. **Nature**. 1979; 279: 636-38

[44] **Turitto VT, Weiss HJ, Zimmermann TS, Sussman II**. Factor VIII/von Willebrand factor in subendothelium mediates platelet adhesion. **Blood**. 1985; 65: 823-31

[45] **Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM**. Initiation of platelet adhesion by attachment onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. **Cell**. 1996; 84: 289-97

[46] **Moroi M, Jung SM, Nomura S, Sekiguchi S, Ordinas A, Diaz-Ricart M**. Analysis of the involvement of the von Willebrand factor-glycoprotein Ib interaction in platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions. **Blood**. 1997; 90: 4413-24

[47] **Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM**. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. **Cell**. 1998; 94: 657-66

[48] **Daniel JL** Platelet contractile proteins. **In: Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW, eds.** Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. **Philadelphia, PA: JB Lippincott Co.**, 1994; 557-73

[49] **Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, Matsui H, Mizuno T, Miyata S, Yoshioka A**. Platelet Shape Changes and Adhesion Under High Shear Flow. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2002; 22: 329-34

[50] **White JG**. Anatomy and structural organization of the platelet. **In: Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW, eds.** Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. **Philadelphia, PA: JB Lippincott Co.**, 1994; 397-413

[51] **White JG**. Morphological and functional aspects of cellular hemostatic mechanisms. **Hämostaseologie**. 1996; 16: 78-87

[52] **White JG, Krumwiede M**. Further studies of the secretory pathway in thrombin stimulated human platelets. **Blood**. 1987; 69: 1196-1203

[53] **Niewiarowski S**. Secreted platelet proteins. **In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, eds.** Haemostasis and thrombosis. **Churchill Livingstone, Edinburgh**, 1994; 167-81

[54] **Kroll MH, Schafer AI**. Biochemical mechanisms of platelet activation. **Blood** 1989; 74: 1181-95

[55] **Born GVR, Kratzer MAA**. Source and concentration of extracellular adenosine triphosphate during haemostasis in rats, rabbits and man. **J Physiol** 1984; 354: 419-29

[56] **Hagberg IA, Roald HE, Lyberg T**. Platelet activation in flowing blood passing growing arterial thrombi. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 1997; 17: 1331-36

[57] **Leistikow EA**. Platelet internalization in early thrombogenesis. **Semin Thromb Hemost** 1996; 22: 289-94

[58] **Brass LF**. The biochemistry of platelet activation. **In: Hoffman R, Benz Jr EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, eds.** Hematology. Basic principles and practice. **Churchill Livingstone, New York** 1991; 1176-97

[59] **Crawford N, Scrutton MC**. Biochemistry of the blood platelet. **In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, eds.** Haemostasis and thrombosis. **Churchill Livingstone, Edinburgh**, 1994; 89-114

[60] **Holmsen H**. Platelet secretion and energy metabolism. **In: Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW, eds.** Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. **Philadelphia, PA: JB Lippincott Co.**, 1994; 524-45

[61] **Hawiger J**. Adhesive interactions of blood cells and the vascular wall. **In: Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW, eds.** Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. **Philadelphia, PA: JB Lippincott Co.**, 1994; 762-796

[62] **Hawiger J**. Mechanisms involved in platelet vessel wall interaction. **Thromb Haemost** 1995; 74: 369-72

[63] **Hawiger J, Brass LF, Salzman EW**. Signal transduction and intracellular regulatory processes in platelets. **In: Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW, eds.** Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. **Philadelphia, PA: JB Lippincott Co.**, 1994; 603-28

[64] **Mesters R, Kienast J.** Hämorrhagische Diathesen. **In: Classen M, Diehl V, Kochsiek K. Innere Medizin. Urban & Scharzenberg, München-Wien-Baltimore.** 4. Auflage, 1998; 246-67

[65] **George JN, Shattil SJ**. The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function. **N Engl J Med** 1991; 324: 27-39

[66] **Schneider W, Gattermann N**. Megakaryocytes: origin of bleeding and thrombotic disorders. **Europ J Clin Invest** 1994; 24 (suppl. I): 16-20

[67] **Wehmeier A, Schneider W**. Megakaryocytes and platelets as the main cause for vascular events in chronic myeloproliferative disorders. **Hämostaseologie** 1996; 16: 151-63

[68] **Tschöpe D, Lampeter E, Schwippert B**. Megakaryocytes and platelets in diabetes mellitus. **Hämostaseologie** 1996; 16: 144-50

[69] **Winocour PD**. Platelet abnormalities in diabetes mellitus. **Diabetes** 1992; 41 (Suppl. II): 26-31

[70] **van der Loo B, Martin JF**. Platelets and megakaryocytes in vascular disease. H**ämostaseologie** 1996; 16: 139-43

[71] **Wu KK**. Platelet activation arterial thrombosis. **Lancet** 1994; 344: 991-95

[72] **Chen TH, Rong H, Shang MQ, Yin GP, Guo SS, Sun XM, Li YL**. Detection of platelet activation in the blood of patients with cerebral embolism. **Blood** 1997; 90 (Suppl. I, part II): 63b

[73] **Wu KK, Hoak JC**. Increased platelet aggregates in patients with transient ischemic attacks. **Stroke** 1975; 6: 521-24

[74] **Ten Cate JW, Vos J, Oosterhuis H, Prenger D, Jenkins CS**. Spontaneous platelet aggregation in cerebrovascular disease. **Thromb Haemost** 1978; 39: 223-29

[75] **Jafri SM**. Hypercoagulability in heart failure. **Semin Thromb Haemost** 1997; 23: 543-45

[76] **Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, Fitzgerald GA**. Platelet activation in unstable coronary disease. **N Engl J Med** 1986; 73: 418-27

[77] **Flores NA, Sheridan DJ**. The pathophysiological role of platelets during myocardial ischemia. **Cardiovasc Res** 1994; 28: 295-302

[78] **Bruhn HD, Zurborn KH**. Hämostase bei malignen Erkrankungen – Therapieinduzierte Einflüsse. **Tumordiagn u Ther** 1998; 19: 25-34

[79] **Rinder H, Recht M, De Castro L, Mc Hugh C, Smith BR**. Differences in CD62p response between young and aged platelets in normal and ITP patients. **Blood** 1997; 90 (suppl. I, part I): 459a

[80] **Fuster V, Stein B, Ambrose JA, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH**. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. **Circulation** 1990; 82 (suppl. II): II-47-59

[81] **Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH**. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. **N Engl J Med** 1992; 326: 242-50

[82] Hemmstoffe der Plättchenaggregation bzw. –funktion. **In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (Hrsg.)**. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. **Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin-Oxford**. 7. Auflage, 1996; 489-90

[83] **Karow T, Lang R**. Thrombozytenaggregationshemmer. **In: Karow T, Lang R (Hrsg.)** Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. **(Eigenverlag)** 8. Auflage, 2000; 239-44

[84] **Hong J, Nilsson Ekdahl K, Reynolds H, Larsson R, Nilsson B**. A new in vitro model to study intersction between whole blood and biomaterials. Studies of platelet and coagulation activation and the effect of aspirin. **Biomaterials** 1999; 20: 603-11

[85] **Antiplatelet Trialist´s Collaboration**: Secondary prevention of vascular disease by prolonged antiplatelet treatment. **BMJ** 1988; 296: 320-31

[86] **Schrör K**. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. **Sem Thromb Hemost** 1998; 23: 349-56

[87] **The Dutch TIA Study Group**. A comparison of two doses of aspirin (30mg versus 283mg a day) in patients after a transient ischemic attack or minor ischemic stroke. **N Engl J Med** 1991; 325: 1261-66

[88] **Buchanan MR, Brister SJ**. Individual variation in the effects of ASA on platelet function: implications for the use of ASA clinically. **Can J Cardiol** 1995; 11: 221-27

[89] **Helgason CM, Bolin KM, Hoff JA, Winkler SR, Mangat A, Tortorice KL, Brace LD**. Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. **Stroke** 1994; 25: 2331-36

[90] **Helgason CM, Tortorice KL, Winkler SR, Penney DW, Schuler JJ, McClelland TJ, Brace LD**. Aspirin Response and Failure in Cerebral Infarction. **Stroke** 1993; 24: 345-50

[91] **Bornstein NM, Karepov VG, Aronovich BD, Gorbulev AY, Treves TA, Korczyn AD**. Failure Of Aspirin Treatment After Stroke. **Stroke** 1994; 25: 275-77

[92] **Ackerman RE, Newman KL**. Incomplete antiplatelet effects in patients on aspirin compounds. **Ann Neurol** 1990; 28: 224. Abstract.

[93] **von Herrath D, Thimme W (Hrsg.)**. Neue Thrombozytenfunktionshemmer - “Superaspirine”. **Der Arzneimittelbrief**. Jahrgang 33, 1999; 5: 33-37

[94] **Coukell A-J, Markham A**. Clopidogrel. **Drugs** 1997; 54: 745-50

[95] **Quinn MJ, Fitzgerald DJ**. Ticlopidine and clopidogrel. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 1999; 19: 2007-11

[96] **Weber AA, Braun M, Hohlfeld T, Schwippert B, Tschöpe D, Schrör K**. Recovery of platelet function after discontinuation of clopidogrel treatment in healthy volunteers. **Br J Clin Pharmacol** 2001; 52: 333-36

[97] **Schornig A et al**. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. **N Engl J Med** 1996; 334: 1084-89

[98] **Bertrand ME et al**. Randomized multicenter comparison of conventional anticoagulation versus antiplatelet therapy in unplanned and elective coronary stenting. The full anticoagulation versus aspirin and Ticlopidine (FANTASTIC) study. **Circulation** 1998; 98: 1597-1603

[99] **Urban P et al**. Randomized evaluation of anticoagulation versus antiplatelet therapy after coronary stent implantation in high-risk patients. The multicenter aspirin and Ticlopidine trial after intracoronary stenting (MATTIS). **Circulation** 1998; 98: 2126-32

[100] **Leon MB et al**. A clinical trial comparing three antithrombotic drug regimens after coronary artery stenting. **N Engl J Med** 1998; 339: 1665-71

[101] **Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, Gershlick AH; for the CLASSICS Investigators**. Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with Ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting. The Clopidogrel Aspirin Stent International Cooperative Study (CLASSICS). **Circulation** 2000; 102: 624-29

[102] **Moussa I, Oetgen M, Roubin G, et al**. Effectiveness of clopidogrel and aspirin versus ticlopidine and aspirin in preventing stent thrombosis after coronary stent implantation. **Circulation** 1999; 99: 2364-66

[103] **Moshfegh K, Redondo M, Julmy F, Wuillemin WA, Gebauer MU, Haeberli A, Meyer BJ**. Antiplatelet effects of clopidogrel compared with aspirin after Myocardial infarction: Enhanced inhibitory effects of combination therapy. **J Am Coll Cardiol** 2000; 36: 699-705

[104] **CAPRIE Steering Committee**. A randomized, blinded trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischemic events (CAPRIE). **Lancet** 1996; 348: 1329-39

[105] **Karow T, Lang R**. Antikoagulanzien und Fibrinolytika. **In: Karow T, Lang R (Hrsg.)**. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. **(Eigenverlag)** 8. Auflage, 2000; 223-32

[106] **Wahba A, Rothe G, Lodes H, Barlage S, Schmitz G, Birnbaum DE**. Effects of extracorporeal circulation and heparin on the phenotype of platelet surface antigens following heart surgery. **Thrombosis Research** 2000; 97: 379-86

[107] **Topol EJByzova TV, Plow EF**. Platelet GpIIb-IIIa blockers. **Lancet** 1999; 353: 227-31

[108] **Sandercock P, for the International Stroke Trial Collaborative Group**: The International Stroke Trial (IST): A randomized trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19,435 patients with acute ischemic stroke. **Lancet** 1997; 349: 1569-81

[109] **Chinese Acute Stroke Trial (CAST)**: Randomized placebo-controlled trial of early aspirin use in 20,000 patients with acute ischemic stroke. **Lancet** 1997; 349: 1641-49

[110] **The EPIC Investigators**: Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. **N Engl J Med** 1994; 330: 956-61

[111] **The EPILOG Investigators**: Effect of the glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor abciximab with lower heparin dosages in ischemic complications of percutaneous coronary revascularization. **N Engl J Med** 1997; 336: 1689-96

[112] **The CAPTURE Investigators**: Refractory unstable angina reduction of events by treatment with abciximab prior to coronary intervention. **Lancet** 1997; 349: 1429-35

[113] **The EPISTENT Investigators**: Randomised placebo-controlled and balloon-angioplasty-controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein-IIb/IIIa blockade. **Lancet** 1998; 352: 87-92

[114] **The IMPACT-II Investigators**: Randomised placebo-controlled trial of effect of eptifibatide on complications of percutaneous coronary intervention: IMPACT-II. **Lancet** 1997; 349: 1422-28

[115] **The PURSUIT Trial Investigators**: Inhibition of platelet glycoprotein IIb/IIIa with eptifibatide in patients with acute coronary syndromes. **N Engl J Med** 1998; 339: 436-43

[116] **The Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Study Investigators**: A comparison of aspirin plus tirofiban plus heparin for unstable angina. **N Engl J Med** 1998; 338: 1498-1505

[117] **The Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management in Patients Limited by Unstable Signs and Symptoms (PRISM-PLUS) Study Investigators**: Inhibition of the glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction. **N Engl J Med** 1998; 338: 1488-97

[118] **The Abciximab in Ischemic Stroke Investigators**: Abciximab in acute ischemic stroke. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study. **Stroke** 2000; 31: 601-9

[119] **Madan M, Berkowitz SD, Tcheng JE**. Glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade. **Circulation** 1998; 98: 2629-35

[120] **Bogousslavsky J, Leclerc JR**. Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Blockade in Acute Ischemic Stroke. **Cerebrovasc Dis** 2001; 11: 287-93

[121] **Kong DF, Califf RM, Miller DP, Moliterno DJ, White HD, Harrington RA, Tcheng JE, Lincoff MA, Hasselblad V, Topol EJ**: Clinical outcomes of therapeutic agents that block the platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin in ischemic heart disease. **Circulation** 1998; 98: 2829-35

[122] **Topol EJ, Ferguson JJ, Weisman HF, Tcheng JE, Ellis SG, Kleiman NS**: Long-term protection from myocardial ischemic events in a randomized trial of brief integrin β3 blockade with percutaneous c coronary intervention. **JAMA** 1997; 278: 479-84

[123] **Topol EJ, Mark DB, Lincoff MA, Cohen E, Burton J, Kleiman N, et al**. Outcomes at 1 year and economic implications of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade in patients undergoing coronary stenting: Results from a multicenter randomised trial. **EPISTENT Investigators**. Evaluation of Platelet IIb/IIIa Inhibitor for Stenting. **Lancet** 1999; 354: 2019-24

[124] **Matzdorff AC, Kühnel G, Kemkes-Matthes B, Pralle H, Voss R, Fareed J**. Effect of glycoprotein IIb/IIIa on CD62p expression, platelet aggregates, and microparticles in vitro. **J Lab Clin Med** 2000; 135: 247-55

[125] **Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators**. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. **N Eng J Med** 2001; 345: 494-502

[126] **Cannon CP, McCabe CH, Wilcox RG, et al**. Oral glycoprotein IIb/IIIa inhibition with orbofiban in patients with unstable coronary syndromes (OPUS-TIMI 16) trial. **Circulation** 2000; 102: 149-56

[127] **O`Neill WW, Serruys P, Knudtson M, et al**. Long-term treatment with a platelet glycoprotein-receptor antagonist after percutaneous coronary revascularization. **N Engl J Med** 2000; 342: 1316-24

[128] **The SYMPHONY Investigators**. Comparison of sibrafiban with aspirin for prevention of cardiovascular events after acute coronary syndromes: A randomised trial. **Lancet** 2000; 355: 337-45

[129] **Second SYMPHONY Investigators**: Randomized trial of aspirin, sibrafiban, or both for secondary prevention after acute coronary syndromes. **Circulation** 2001; 103: 1727-33

[130] **Newby LK, Califf RM, White HD, et al**. The failure of orally administered glycoprotein IIb/IIIa inhibitors to prevent recurrent cardiac events. **Am J Med** 2002; 112: 647-58

[131] **Topol EJ, Easton JD, Amarenco P, et al**. Design of the blockade of the glycoprotein IIb/IIIa receptor to avoid vascular occlusion (BRAVO) trial. **Am Heart J** 2000; 139: 927-33

[132] **Topol EJ**. BRAVO trial terminated early. Available at: **http://www.theheart.org**

[133] **Mousa SA, Khurana S, Forsythe MS**. Comparative in vitro efficacy of different platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists on platelet-mediated clot strength induced by tissue factor with use of thromboelastography: Differentiation among glycoprotein IIb/IIIa antagonists. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2000; 20: 1162-67

[134] **Marti GE, Stetler-Stevenson M, Blessing JJH, Fleisher TA**. Introduction to Flow Cytometry. **Seminars in Hematology** 2001; Vol 38, No 2: 93-99

[135] **Thews A**. Einführung in die Durchflußzytometrie und ihre Anwendungen. **Coulter-Immunotech-Diagnostics, Hamburg. Durchflusszytometrie**, Stand 8/1997; 3-15

[136] **BD Deutschland. Trainingshandbuch Durchflusszytometrie FACSCalibur™ FACScan™ FACSort™.** Einführung in die Durchflußzytometrie. Stand März 1999; 1-16

[137] **Shapiro HM**. Practical Flow Cytometry (ed. 3). **New York, NY, Liss.** 1995; 244-45

[138] **Kaplan KL, Owen J**. Radioimmunoassays of alpha granule proteins. **In: Harker LA, Zimmerman TS (eds)**: Measurements of Platelet Function. **Edinburgh, UK, Churchill Livingstone**, 1983; 115

[139] **Levine SP**. Secreted platelet proteins as merkers for pathological disorders. **In: Phillips DR, Shuman MA (eds)**. Biochemistry of platelets. **Orlando, FL, Academic**, 1986; 378

[140] **Chong BH, Murray B, Berndt MC, Dunlop LC, Brighton T, Chesterman CN**. Plasma P-selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders. **Blood** 1994; 83: 1535

[141] **Rodger RPC, Levin J**. A critical reappraisal of the bleeding time. **Semin Thromb Hemost** 1991; 16: 1

[142] **Kinlough-Rathbone RL, Packham MA, Mustard JF**. Platelet aggregation. **In: Harker LA, Zimmerman TS (eds)**: Measurements of Platelet Function. **New York, NY, Churchill Livingstone**, 1983; 64

[143] **Ejim OS, Powling MJ, Dandona P, Kernoff PB, Goodall AH**. A flow cytometric analysis of fibronectin binding to platelets from patients with peripheral vascular disease. **Thromb Res** 1990; 58: 519

[144] **Wehmeier A, Tschope D, Esser J, Menzel C, Nieuwenhuis HK, Schneider W**. Circulating activated platelets in myeloproliferative disorders. **Thromb Res** 1991; 61: 271

[145] **Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA**. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependant monoclonal antibodies and flow cytometry. **Blood** 1987; 70: 307

[146] **Michelson AD**. Flow Cytometry: A Clinical Test of Platelet Function. **Blood** 1996; 87: 4925-36

[147] **Michelson AD, Shattil SJ**. The use of flow cytometry to study platelet activation. **In: Watson SP, Authi K (eds.)**. Platelet Function and Signal Transduction: A Practical Approach. **Oxford, UK** 1996; 111

[148] **Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, Fitzgerald GA**. Platelet activation in unstable coronary disease. **N Engl J Med** 1994; 315: 983

[149] **Oates JA, Fitzgerald GA, Branch RA, Jackson EK, Knapp HR, Roberts LJ**. Clinical implications of prostaglandin and thromboxane A_2 formation. **N Engl J Med** 1988; 319: 689

[150] **Abrams C, Shattil SJ**. Immunological Detection of Activated Platelets in Clinical Disorders. **Thromb Haemost** 1991; 65 (5): 467-73

[151] **Wu KK, Hoak LC**. Increased platelet aggregates in patients with transient ischemic attacks. **Stroke** 1975; 6: 521

[152] **Ault KA**. The Clinical Utility of Flow Cytometry in the Study of Platelets. **Seminars in Hematology** 2001; Vol 38: 160-68

[153] **Ault KA**. Flow cytometric measurement of platelet-associated immunoglobulin. **Pathol Immunopathol Res** 1988; 7: 395-408

[154] **Ault KA, Mitchell J**. Analysis of platelets by flow Cytometry. **Methods Cell Biol** 1994; 42: 275-94

[155] **Zucker-Franklin D, Karpatkin S**. Red-cell and platelet fragmentation in idiopathic autoimmune thrombocytopenic Purpura. **N Engl J Med** 1977; 297: 517-23

[156] **Matzdorff AC, Kühnel G, Kemkes-Matthes B, Pralle H**. Quantitative assessment of platelets, platelet microparticles, and platelet aggregates with flow cytometry. **J Lab Clin Med** 1998; 131: 507-17

157 **Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, et al**. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. **J Biol Chem** 1988; 263: 18205-12

158 **Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, et al**. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: An isolated defect in platelet procoagulant activity. **J Biol Chem** 1989; 264: 17049-57

159 **Abrams CS, Ellison N, Brudzynski AZ, et al**. Direct detection of activated platelets and platelet derived microparticles in human blood. **Blood** 1990; 87: 4925-36

160 **Hughes M, Haywardd CP, Warkentin TE, et al**. Morphological analysis if microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia. **Blood** 2000; 96: 188-94

161 **Lee DH, Warkentin TE, Denomme GA, et al**. A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia: Detection of platelet microparticles using flow cytometry. **Br J Haematol** 1996; 95: 724-31

162 **Michelson AD, Furman MI**. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. **Curr Opin Hematol** 1999; 6: 342-48

163 **Ahn YS, Jy W, Kolodny L, Horstman LL, Mao WW, Valant PA, et al**. Activated platelet aggregates in thrombotic thrombocytopenic purpura decrease with plasma infusions and normalize remission. **Br J Haematol** 1996; 95: 408-15

164 **Metzelaar MJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK**. Detection of platelet activation using activation specific monoclonal antibodies. **Blood Cells** 1990; 16: 85-96

165 **Köhler M, Hellstern P, Morgenstern E, Mueller-Eckhardt C, Berberich R, Meiser RJ, Scheffler P, Wenzel E**. Gray platelet syndrome: selective α-granule deficiency and thrombocytopenia due to increased platelet turnover. **Blut** 1985; 50: 331-40

166 **Lages B, Shattil SJ, Bainton DF, Weiss HJ**. Decreased content and surface expression of α-granule membrane protein GMP-140 in one of two types of platelet αδ storage pool deficiency. **J Clin Invest** 1991; 87: 919-29

167 **Spangenberg P, Tschöpe D, Esser J, Schippert B, Kehrel B, Rosen P, Gries FA**. Determination of platelet activation by assaying filamentous actin and detecting membrane alterations. **Acta Histochem Suppl** 1991; 41: 187-92

168 **Jen CJ, Chen HI Lai KC, Usami S**. Changes in cytosolic calcium concentration and cell morphology in single platelets adhered to fibrinogen-coated surface under flow. **Blood** 1996; 87: 3775-82

169 **Jennings LK, Dockter ME, Wall CD, Kennedy DM**. Calcium mobilization in human platelets using indo-1 and flow Cytometry. **Blood** 1989; 74: 2674-80

170 **Tomer A**. A sensitive and specific functional flow cytometric assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. **Br J Haematol** 1997; 98: 648-56

171 **Heilmann E, Hvnes LA, Burstein SA, George JN, Dale GL**. Fluorescein derivatization of fibrinogen for flow cytometric analysis of fibrinogen binding to platelets. **Cytometry** 1994; 17: 287-93

172 **Giles H, Smith R, Martin JF**. Platelet glycoprotein IIb-IIIa and size are increased in acute myocardial infarction. **Eur J Clin Invest** 1994; 24: 69-72

173 **Niiya K, Hodson E, Bader R, Byers-Ward V, Koziol JA, Plow EF, Ruggeri ZM**. Inceased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. **Blood** 1987; 70: 475-83

174 **Nurden P, Bihour C, Combrié R, Gralnick H, Nurden AT**. Glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) and glycoprotein Ib-IX complexes are processed independently during thrombin-induced platelet activation. **J Lab Clin Med** 1994; 124: 579-88

[175] **Goodall AH, de Oliviera Domingos M, Chronos N, Janes SL, Wilson DJ**. Flow cytometric detection of the redistribution of the glycoprotein Ib-IX complex on thrombin-stimulated platelets is dependent on the type of antibody conjugate used. **Blood** 1993; 81: 1407-08

[176] **Rao GH, Peller JD, White JG**. Influence of ionized calcium on thrombin-induced down regulation of GPIb/IX receptors on human platelets. **Thromb Res** 1997; 85: 23-31

[177] **Matzdorff AC, Kemkes-Matthes B, Voss R, Pralle H**. Comparison of β-thromboglobulin, flow cytometry, and platelet aggregometry to study platelet activation. **Haemostasis** 1996; 26: 98-106

[178] **Wu KK, Hoak JC**. A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency. **Lancet** 1974; ii; 924-27

[179] **Rinder H, Rinder C, Mitchell J, Forest R, Hillman RS, Ault KA**. The kinetics of platelet activation and aggregation during cardiopulmonary bypass – a wave of early aggregation is dissociated from a progressive increase in platelet activation. **Blood** 1988; 72 (Suppl): 307a

[180] **Zilla P, Fasol R, Groscurth P, Klepetko W, Reichenspurner H, Wolner E**. Blood platelets in cardiopulmonary bypass operations. **J Thorac Cardiovasc Surg** 1989; 97: 379-88

[181] **Wolf P**. The nature and significance of platelet products in human plasma. **Br J Haematol** 1967; 13: 269-88

[182] **Holme PA, Solum NO, Brosstad F, Røger M, Abdelnoor M**. Demonstration of platelet derived microvesicles in blood from patients with activated coagulation and fibrinolysis using a filtration technique and western blotting. **Thromb Haemost** 1994; 72: 666-71

[183] **Horan PK, Muirhead KA, Slezak SE**. Standards and controls in flow cytometry. **In: Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML (Hrsg.)**. Flow cytometry and sorting. **Wiley-Liss, New York**, 2. Auflage, 1990; 397-414

[184] **Scharf RE, Tomer A, Marzec UM, Teirstein PS, Ruggeri ZM, Harker LA**. Activation of platelets in blood perfusing angioplasty-damaged coronary arteries. **Arterioscler Thromb** 1992; 12: 1475-87

[185] **Dean PN**. Data processing. **In: Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML (Hrsg.)**. Flow cytometry and sorting. **Wiley-Liss, New York**, 2. Auflage, 1990; 415-444

[186] **Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ Shattil SJ**. Direct detection of activated platelets and platelet derived microparticles in humans. **Blood** 1990; 75: 128-38

[187] **Larsson A, Egberg N, Lindahl TL**. Platelet activation and binding of complement components to platelets induced by immune complexes. **Platelets** 1994; 5: 149-55

[188] **Larsson A, Lundahl T, Eriksson M, Lundkvist K, Lindahl T**. Endotoxin induced platelet microvesicle formation measured by flow cytometry. **Platelets** 1996; 7: 153-58

[189] **Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clementson KJ, Goodall AH, Michelson AD, Nurden AT, Shankey TV, for the European Working Group on Clinical Cell Analysis. European Working Group on Clinical Cell Analysis**: consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. **Thromb Haemost** 1998; 79: 885-96

[190] **Oda A, Daley JF, Cabral C, Kang J, Smith M, Salzman EW**. Heterogeneity in filamentous actin content among individual human blood platelets. **Blood** 1992; 79: 920-27

[191] **Stolz E, Oschmann P, Pötzsch B, Kraus J, Kaps M**. Thrombocyte activation increases with the degree of carotid artery stenosis. **J Cerebrovasc Dis Stroke** 2002; II: 324-29

[192] **Cambria-Kiely JA, Ghandi PJ**. Possible mechanisms if aspirin resistance. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis** 2002; 13(1): 49-56

[193] **Hacke W, Kaste M, Olsen TS, Orgogozo JM, Bogousslavsky J**. Empfehlungen der Europäischen Schlaganfallinitiative zur Versorgung und Behandlung des Schlaganfalls. **Nervenarzt** 2001; 72: 807-19

194 **Swanson R**. Intravenous heparin for acute stroke. What can we learn from the megatrials? **Neurology** 1999; 52: 1746-50.

195 **Langhorne P, Williams B, Gilcrist B**. Do stoke units safe lives? **Lancet** 1993; 342: 395-98

196 **Stroke Units Trialists Collaboration**. A systematic review of the randomised trials of organised impatient (stroke unit) care after stroke. **Br Med J** 1997; 314: 1151-59

197 **Multicenter Acute Stroke Trial – Europe Study Group**. Thrombolytic therapy with streptokinase an acute ischaemic stroke. **N Engl J Med** 1996; 335: 145-50

198 **Furlan A, Higashida R, Wechsler L, Schulz G**. PROACT II: Recombinant prourokinase (r-ProUK) in acute cerebral thromboembolism. Initial Trial Results. **The PROACT II Investigators. Stroke** 1999; 30: 234

199 **National Institute of Neurological Disorders and Stroke**: rt-PA Stroke Study Group (NINDS). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. **N Engl J Med** 1995; 333: 1581-87

200 **Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, Meier D, Larrue V, et al**. Randomised double-blind placebo-controlled trials of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). **Lancet** 1998; 352: 1245-51

201 **Antiplatelet Trialists Collaboration**: Collaborative review of randomised trials of antiplatelet therapy. 1. Prevention of death, myocardial infarction and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. **BMJ** 1994; 308: 81-106

202 **Diener H, Cunha L, Forbes C; Silvenius J, Smets P; Lowenthal A**: European stroke prevention study. 2. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke. **J Neurol Sci** 1996; 143: 1-13

203 **North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators (NASCET)**. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. **N Engl J Med** 1991; 325: 445-53

204 **European Carotid Surgery Trialists Collaborative Group**: MRC European Carotid Surgery Trial. Interim results for symptomatic patients with severe (70-99%) or with mild (0-29%) carotid stenosis. **Lancet** 1991; 337: 1235-43

205 **Ruf A, Patscheke H**. Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and p-selectin expression. **Semin Thromb Hemost** 1995; 21: 146-51

206 **Matzdorff AC.** Erkennung aktivierter Thrombozyten mit Hilfe des α-Granula-Membran-Proteins CD62p (GMP-140). Habilitationsschrift, Justus-Liebig-Universität Gießen, 1999.

207 **Becker RC, Tracy RP, Bovill EG, Mann KG, Ault K**. The clinical use of flow cytometry for assessing platelet activation in acute coronary syndromes. TIMI-III thrombosis and anticoagulation group. **Coron Artery Dis** 1994; 5: 339-45

208 **Ahn YS, Jy W, Kolodny L, Horstman LL, Mao WW, Valant PA, Duncan RC**. Activated platelet aggregates in thrombotic thrombocytopenic purpura decreasewith plasma infusions and normalize in remission. **Br J Haematol** 1996; 95: 408-15

209 **Gralnick HR, Vail M, McKeown P, Merryman P, Wilson O, Chu I, Kimball J**. Activated platelets in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. **Br J. Haematol** 1995; 91: 697-702

210 **Ault KA, Rinder HM, Mitchell JG, Rinder CS, Lambrew CT, Hillman RS**. Correlated messurement of platelet release and aggregation in whole blood. **Cytometry** 1989; 10: 448-55

211 **Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA**. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependant monoclonal antibodies and flow cytometry. **Blood** 1987; 50: 307-15

[212] **Golanski J, Pietrucha T, Baj Z, Greger J, Watala C**. Molecular insights into the anticoagulant-induced spontaneous activation of platelets in whole blood – various anticoagulants are not equal. **Thromb Res** 1996; 83: 199-216

[213] **Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA**. Activation of platelets with adenosine-5´-diphosphate (ADP). Manual Source Book Section 1.13, Activation of platelets with thrombin. **Manual Source book,** Section 1.14.1.

[214] **Holmsen H**. Significance of testing platelet functions in vitro. **Europ J Clin Invest** 1994 ; 42 (Suppl.): 3-8

[215] **Schneider DJ, Tracy PB, Mann KG, Sobel BE**. Differential effects of anticoagulants on the activation of platelets ex vivo**. Circulation** 1997; 96: 2877-83

[216] **Wu KK, Hoak JC**. Spontaneous platelet aggregation in arterial insufficiency: mechanism and implications**. Thromb Haemost** 1976; 35: 702-11

[217] **Malmgren R, Beving H, Olsson P**. Effects of different anticoagulants on human platelet size distribution and serotonin (5-HT) induced shape change and uptake kinetics. **Thromb Res** 1985; 38: 649-61

[218] **White JG**. Effects of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) on platelet structure. **Scand J Haematol** 1968; 5: 241-54

[219] **Lozano M, Escolar G, White JG, Tàssies D, Ordinas A, Diaz-Ricart M**. Redistribution of membrane glycoproteins in platelets activated under flow conditions. **Blood Coagul Fibrinolysis** 1996; 7: 214-17

[220] **Nomura S, Nagata H, Oda K, Kokawa T, Yasunaga K**. Effects of EDTA on the membrane glycoproteins IIb-IIIa complex – analysis using flow cytometry. **Thromb Res** 1987; 47: 47-58

[221] **Kühne T, Hornstein A, Semple J, Chang W, Blanchette V, Freedman J**. Flow cytometric evaluation of platelet activation in blood collected in EDTA vs. Diatube-H, sodium citrate solution supplemented with theophylline, adenosine and dipyridamole. **Am J Hematol** 1995; 50: 40-45

[222] **Kennedy SD, Igarashi Y, Kickler TS**. Measurement of in vitro p-selectin expression by flow cytometry. **Am J Clin Pathol** 1997; 107: 99-104

[223] **Gear ARL** Rapid reactions of platelet studied by a quenched-flow approach: aggregation kinetics. **J Lab Clin Med** 1982; 100: 866-86

[224] **Ozaki Y, Satoh K, Yatomi Y, Yamamoto T, Shirasawa Y, Kume S**. Detection of platelet aggregates with a particle counting method using light scattering. **Analyt Biochem** 1994, 218: 284-94

[225] **Richards EM, Baglin TP**. Quantitation of reticulated platelets 1: methodology and clinical application. **Br J Haematol** 1995; 91: 445-51

[226] **Ruf A, Morgenstern E**. Ultrastructural aspects of platelet adhesion on subendothelial structures. **Semin Thromb Hemost** 1995; 21: 119-22

[227] **Johnston GI, Pickett EB, McEver RP, George JN**. Heterogeneity of platelet secretion in response to thrombin demonstrated by fluorescence flow Cytometry. **Blood** 1987; 69: 1401-03

[228] **Rinder HM, Murphy M, Ault KA, Stocks J, Slichter S, Hillman RS**. Quantitation of platelet activation during storage: evidence that activated platelets fail to circulate following transfusion. **Blood** 1988; 72 (Suppl. I): 283a

[229] **Ault KA, Mitchell J**. Analysis of platelets by flow Cytometry. **Methods Cell Biol** 1994; 42: 275-94

[230] **George JN, Pickett, Saucerman S, McEver RP, Kunicki TJ, Kieffer N, Newman PJ**. Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. **J Clin Invest** 1986; 78: 340-48

231 **Chatelain B, Thiry C, Lelubre F, Chatelain C**. Quantification of platelet glycoproteins by a one step indirect cytofluorometric method. **Blood** 1997; 90 (Suppl. I, Part II): 63

232 **Gear ARL**. In vitro platelet responses: aggregation. **In: Holmsen H (Edt.)**. Platelet Responses and metabolism. **CRD Press, Inc., Boca Raton, Florida** 1986; Vol. I, 97-114

233 **Verhoeven AJM, Mommersteeg ME, Akkerman JWN**. Comparative studies on the energetics of platelet responses induced by different agonists. **Biochem J** 1986; 236: 879-87

234 **Fei R, Shuman B, Reisman M**. A new method for evaluating quantitation and size distribution of platelet aggregation and thrombus. **Exp Hemat** 1996; 24: 1070

235 **Bach R, Jung F, Kohsiek I, Ozbek C, Spitzer S, Schneller B, Dyckmans J, Schieffer H**. Factors affecting the restenosis rate after percutaneous transluminal coronary angioplasty. **Thromb Res** 1994; 74 (Suppl.I): 55-67

236 **Ozaki Y**. Measurement pf platelet aggregation and attempts for standardization. **Sysmex J Int** 1998; 8: 15-22

237 **Jy W, Mao WW, Horstman L, Tap J, Ahn YS**. Platelet microparticles bind, activated and aggregate neutrophils in vitro**. Blood Cells Mol Dis** 1995; 21: 217-31

238 **Hoffman M, Monroe DM, Oliver JA, Roberts HR**. Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependant initiation of coagulation. **Blood** 1995; 86: 1794-1801

239 **Hoffman M, Monroe DM, Roberts HR**. Coagulation factor IXa binding to activated platelets and platelet-derived microparticles: a flow cytometric study. **Thromb Haemost** 1992; 68: 74-78

240 **Berman CL, Yeo EL, Wencel-Drake JD, Furie BC, Ginsberg MH, Furie B**. A platelet alpha-granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. **J Clin Invest** 1986; 78: 130-37

241 **Hsu-Lin SC, Berman CL, Furie BC, August D, Furie B**. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. **J Biol Chem** 1984; 259: 9121-26

242 **McEver RP, Martin MN**. A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. **J Biol Chem** 1984; 259: 9799-9804

243 **Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jaques YV, Bainton DF**. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. **J Cell Biol** 1985; 101: 880-86

244 **Metzelaar MJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK.** Activation-dependant mAb recognizing a 140-kDa platelet α-granulemembrane protein, expressed after activation. **In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, von dem Borne AEGKR (Hrsg.).** Leucocyte typing IV. White cell antigens. **Oxford univ. press, Oxford,** 1989; 1039-40

245 **Nieswandt B, Watson SP.** Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? Blood 2003; 101: 449-461

7 ANHANG

7.1 VERSUCHSPROTOKOLLE

7.1.1 ADIAflo-Messreihe

- je Proband benötigte Menge *Reagenz 1* (1:10 verdünnt mit Aqua inj.): 10,55 ml
- zusätzlich 1x wöchentlich 2 ml für Beads (für alle Probanden insgesamt)

Reagent Tube Setup

T1 50 µl Reagenz 1…….....Puffer
T2 20 µl Reagenz 2a……IgG Mouse
T3 20 µl Reagenz 2b.....anti GpIIb/IIIa Mab = CD 41a
T4 20 µl Reagenz 2c…….anti GpIb Mab = CD 42b
T5 20 µl Reagenz 2d…….....anti GpIIIa Mab = CD61
T6 20 µl Reagenz 2e……...anti GMP 140 Mab = CD62p
TB 40 µl vortexed Reagenz 3……..Beads

Platelet "Activation"

T1 50 µl unfixiertes Citratblut → vortexen → 5 min Inkubation
T1 500 µl Reagenz 1 → vortexen

Immuno-labelling of samples

T2 – T6 20 µl aus T1 → vortexen → 10 min Inkubation

Fluorescent Staining

T2 – TB 20 µl Reagenz 4 → vortexen → 10 min Inkubation
T2 – TB 2 ml Reagenz 1 → vortexen

► Lagerung bis 4 Std. bei 2-8°C möglich!

Fixation vor Zugabe von Reag.1 mögl.: T2-TB 50 µl 1% PFA → vortexen → 10 min

► Lagerung bis 8 Std. bei 2-8°C möglich!

7.1.2 CD 62p-Markierung (Fixierung nach Cyfix III-Protokoll)

Stabilisierungs-Lösung (Cyfix III):
- 50 µl Glyoxallösung
- 400 µl Formaldehydlösung
- 9550 µl (9,5 ml + 50 µl) Phosphatpuffer

► Die Lösung muß täglich frisch angesetzt werden!

- Citratröhrchen (5ml) mit 2,5 ml der Cyfixlösung füllen

Stabilisierung
- Citratröhrchen mit 2,5 ml Vollblut füllen
- Inkubation: 10 min bei Raumtemperatur
- Verdünnung der Probe im Verhältnis 1:10 mit in PBS gelöster Glycine (50 µl Probe : 450 µl Glycinelösung)

► Lagerungsstabil für mindestens 24 Std. bei 4°C!

Immunmarkierung:
- Probe: - 50 µl verdünnte Probe
  - 10 µl anti CD 42b-PE
  - 10 µl anti CD 62p-FITC

- Isotyp: - 50 µl verdünnte Probe
  - 10 µl anti CD42b-PE
  - 10 µl anti IgG Mouse-FITC

- Inkubation für 15 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln
- Zugabe von 450 µl Phosphatpuffer

7.1.3 PAC-1-Markierung

1. Verdünnung
- 50 µl unfixiertes! Citratblut
- 950 µl Phosphatpuffer

Immunmarkierung
- 50 µl verdünnte Probe
- 10 µl anti PAC-1-FITC
- 10 µl anti CD 42b-PE

Inkubation
30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln

2. Verdünnung
500 µl Phosphatpuffer

7.2 ABKÜRZUNGEN

A

A.	**A**rteria
Abb.	**Abb**ildung
ADP	**A**denosin**di**p**h**osphat
ASS	**A**cetyl**s**alicyl**s**äure
AT III	**A**nti**t**hrombin **III**
ATP	**A**denosin**tri**p**h**osphat
ATPase	**A**denosin**tri**p**h**osphat**ase**

B

BRAVO[131,132]	Design of the **b**lockade of the glycoprotein IIb/IIIa **r**eceptor to **a**void **v**ascular **o**cclusion.

C

cAMP	**c**yclisches 3´,5´-**A**denosin**m**ono**p**hosphat
CAPRI[104]	A randomized, blinded trial of **c**lopidogrel versus **a**spirin in **p**atients at **r**isk of **i**schemic events
CAPTURE[112]	**c**7E3 Fab **A**nti**p**latelet **T**herapy in **U**nstable **Re**fractory Angina
CAST[109]	**C**hinese **A**cute **S**troke **T**rial
CCT	**c**ranielle **C**omputer**t**omographie
CD	**C**luster **D**eterminants (internat. System für die Bezeichnung von Differenzierungsantigenen)
CLASSIC-S	The **CL**opidogrel **AS**pirin **S**tent **I**nternational **C**ooperative **S**tudy
cMRT	**c**ranielle **M**agnet**r**esonanz**t**omographie

D

DD	**D**ifferenzial**d**iagnose
DNA	**D**esoxyribo**n**ukleinsäure (-**a**cid)

E

EDRF	**e**ndothelium-**d**erived **r**elaxing **f**actor
EFNS	**E**uropäische **F**öderation **N**eurologischer Gesellschaften (-**S**ocieties)
EKG	**E**lektro**k**ardio**g**raphie
ENS	**E**uropäische **N**eurologische Gesellschaft (-**S**ociety)
EPIC[110]	**E**valuation of c7E3 for the **P**revention of **I**schemic **C**omplications
EPILOG[111]	**E**valuation in **P**ercutaneous Transluminal Coronary Angioplasty to **I**mprove **L**ong-Term **O**utcome with Abciximab **G**P IIb/IIIa blockade
EPISTENT[113]	**E**valuation of **P**latelet IIb/IIIa **I**nhibition in **STENT**ing
ESC	**E**uropäische **S**chlaganfall-**C**ouncil
EUSI	**Eu**ropäische **S**chlaganfall-**I**nitiative
EXCITE[127]	**E**valuation of Oral **X**emilofiban in **C**ontrolling **T**hrombotic **E**vents

F

FANTASTIC[98]	The **f**ull **ant**icoagulation versus **as**pirin and **Tic**lopidine
FITC	**f**luorescein **i**so**th**io**c**yanate
FSC	**F**orward Angle Light **Sc**atter = Vorwärtslichtstreuung

G

GDP	**G**uanosin**di**p**h**osphat
GP	**G**lyco**p**rotein
G-Proteine	**G**lyco**p**roteine
GTP	**G**uanosin**tri**p**h**osphat

H

HIV	**H**uman **i**mmunodeficiency **v**irus
HLA	**H**uman **l**eucocyte **a**ntigen

I

INR	International Normalized Ratio
IMPACT-II[114]	Randomised placebo-controlled trial of effect of eptifibatide on complications of percutaneous coronary intervention: IMPACT-II.
ISAR[97]	**I**ntracoronary **S**tenting and **A**ntithrombotic **R**egimen
IST[108]	The **I**nternational **S**troke **T**rial (IST): A randomized trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19,435 patients with acute ischemic stroke.

K

KHK	**K**oronare **H**erz**k**rankheit

L

LDL	**L**ow **d**ensity **l**ipoproteins
LIBS	**L**igand-**i**nduced **B**inding **S**ites
Lsg.	Lösung

M

Mab	**M**onoclonal **a**nti**b**ody
MATCH	**M**anagement of **A**therothrombosis in High-risk Patients with Recent **T**ransient Is**ch**emic Attack or Ischemic Stroke
MATTIS[99]	The **m**ulticenter **a**spirin and **T**iclopidine **t**rial after **i**ntracoronary **s**tenting
max.	maximal
min.	minimal

N

NO	Stickoxyd (chem. Symbol)

O

OPUS-TIMI 16[126]	Oral glycoprotein IIb/IIIa inhibition with orbofiban in patients with unstable coronary syndromes trial

P

pAVK	**p**eriphere **a**rterielle **V**erschluss**k**rankheit
PDGF	**p**latelet-**d**erived **g**rowth **f**actor
PE	**p**hyco**e**rythrin
PerCP	**per**idin-**c**hlorophyl-A-**p**rotein
PGF2α	F2-isoprostane 8-iso-prostaglandine
PI	**p**ropidium **i**odide
PRISM[116]	The **P**latelet **R**eceptor Inhibition in **I**schemic **S**yndrome **M**anagement
PRISM-PLUS[117]	The **P**latelet **R**eceptor Inhibition in **I**schemic **S**yndrome Management in **P**atients **L**imited by **U**nstable Signs and **S**ymptoms
PURSUIT[115]	**P**latelet glycoprotein IIb/IIIa in **u**nstable angina: **r**eceptor **s**uppression using **i**ntegrilin **t**herapy

R

RIBS	**R**eceptor-**I**nduced **B**inding **S**ites
RNA	**R**ibo**n**ucleinsäure (-**a**cid)
r-ProUK	**Pro**-U**ro**kinase
rtPA	**r**ecombinant **t**issue **p**lasminogen **a**ctivator

S

SSC	**S**ide Angle Light **Sc**atter = Seitwärtslichtstreuung
STARS[100]	**St**ent **A**nti-thrombotic **R**egimen **S**tudy
SYMPHONY[128,129]	**S**ibrafiban versus aspirin to **y**ield **m**aximum **p**rotection from ischemic **h**eart events post-acute coronary syndromes

T

Tab.	**Tab**elle
TOTO-1	Dimere von thiazole orange
TRAP	**T**hrombin**r**ezeptor-**a**ktivierendes **P**eptid
TXA2	Thromboxan 2
T-Zellen	= T-Lymphozyten

U

u.a.	**u**nd **a**ndere bzw. **u**nter **a**nderem

V

V.	**V**ena
vWF	**v**on **W**illebrand-**F**aktor
vWS	**v**on **W**illebrand-**S**yndrom

Z

z.B.	**z**um **B**eispiel

7

7AAD	**7**-**a**mino-**a**ctinomycin **D**

LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name:	Fromm
Vorname:	Annette
Geburtsdatum:	19. April 1977
Geburtsort:	Heilbad Heiligenstadt/ Thüringen
Familienstand:	ledig
Eltern:	Dipl. Ing. Gerhard Georg Fromm, selbständig Inge Christa Fromm, geb. Kaufhold, Angestellte
Geschwister:	Astrid Fromm, Rechtsanwältin

Ausbildung

1983-1991	Polytechnische Oberschule I, spätere Lorenz-Kellner-Schule, Heiligenstadt
1991-1995	Staatliches Gymnasium, Heiligenstadt
Juni 1995	Allgemeine Hochschulreife, Hauptfächer Deutsch und Englisch
September 1995 - März 1996	Freiwilliges Soziales Jahr im Städtischen Krankenhaus München-Harlaching
April 1996	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
April 1998	Ärztliche Vorprüfung
März 1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 1999 - April 2000	Auslandsstudium an der Universität Bergen, Norwegen
Februar-August 2001 sowie April - Juni 2002	Studentisch-wissenschaftliche Hilfskraft, Neurochemisches Labor des Universitätsklinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen im Rahmen der Promotion

April 2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April - Juli 2002	Studentisch-wissenschaftliche Hilfskraft an der Universitäts-Kinderklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen, Medithek
Oktober 2002 - September 2003	Praktisches Jahr mit den Tertialen: I. Innere Medizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen II. Chirurgie am Spital Zollikerberg, Kanton Zürich, Schweiz III. Gynäkologie und Geburtshilfe am Kantonsspital Luzern, Kanton Luzern, Schweiz
November 2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Januar - September 2004	Ärztin im Praktikum im Zentrum für Neurologie und Frührehabilitation am SRH-Klinikum Karlsbad-Langensteinbach/ Baden-Württemberg
01.10.2004	Approbation als Ärztin
Oktober 2004 - Januar 2006	Assistenzärztin im Zentrum für Neurologie und Frührehabilitation am SRH-Klinikum Karlsbad-Langensteinbach/ Baden-Württemberg
seit Februar 2006	Assistenzärztin im Sørlandet Sykehus HF Kristiansand, Nevrologisk avdeling, Kristiansand/ Norwegen

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt an dieser Stelle allen, die mir mit fachlicher Betreuung, „seelischer und moralischer“ Unterstützung oder persönlichem Einsatz eine große Hilfe waren und somit entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere:

Dr. med. habil. E. Stolz für Thema sowie sehr gute Betreuung und Unterstützung bei Statistik, Auswertung und Korrekturen,
PD Dr. A. Matzdorff für die geduldige Einarbeitung in die Methode und die großartige fachliche Unterstützung,
den Mitarbeiterinnen des Neurochemischen Labors der JLU Gießen sowie Frau G. Kühnel vom Thrombozytenlabor der Medizinischen Klinik der JLU Gießen für Ihre Einarbeitung und Hilfe sowie unerschöpfliche Geduld und die sehr gute Zusammenarbeit,
meinen Freunden sowie allen anderen, die sich freundlicherweise als Probanden zur Verfügung gestellt haben, insbesondere Benjamin C. Becker, Dr. Christine Rose, Mandy Horn und Dr. Synje Andresen für Ihr „Dasein“ in jeder Lebenslage und die gegenseitige Motivation sowie Ilka Lauber für die Tipps bei der Textverarbeitung,
Denis O´Sullivan für den kleinen Wettstreit als Ansporn und die Hilfe beim Korrekturlesen sowie Dr. Astanand Jugessur für seine Unterstützung in Zusammenhang mit der Disputation,
zu guter Letzt meiner Familie und in ganz besonderem Maße meinen Eltern Gerhard und Inge Fromm, die mich auf allen Wegen begleitet und unterstützt, aber auch kritisch hinterfragt haben. Ohne Euch wären einige großartige Punkte in meinem bisherigen Leben nicht möglich geworden…