

Aus dem interdisziplinären Schwerpunkt für Hämostaseologie
und Comprehensive Care Center für Hämophilie
Leitung: Prof. Dr. med. B. Kemkes-Matthes

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

**Klinische Ausprägung des von Willebrand-Syndroms
und der Polymorphismus
des thrombozytären Glykoproteins Ia/IIa**

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

vorgelegt von
Christina Maria Hohmann
aus Gießen

Gießen 2013

Referentin: Prof. Dr. B. Kemkes-Matthes

Korreferent: Prof. Dr. G. Bein

Dekan: Prof. Dr. T. Chakraborty

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2014

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Hämostase | 1 |
| 1.1.1. von Willebrand-Faktor | 2 |
| 1.1.2. Faktor VIII | 4 |
| 1.1.3. Glykoprotein Ia/IIa | 4 |
| 1.1.3.1. Polymorphismus | 5 |
| 1.1.3.2. Glykoprotein Ia/IIa Rezeptordichte | 6 |
| 1.2. Von Willebrand-Syndrom | 6 |
| 1.2.1. Klassifikation | 8 |
| 1.2.2. Klinische Symptomatik | 10 |
| 1.2.2.1. Blutungstyp | 10 |
| 1.2.2.2. Blutungsereignisse | 10 |
| 1.2.3. Diagnostik des VWS | 11 |
| 1.2.4. Therapie des VWS | 12 |
| 1.3. Ziel der Arbeit | 13 |
| | |
| 2. Material und Methode | 14 |
| 2.1. Patienten | 14 |
| 2.1.1. VWS-Patienten | 14 |
| 2.1.2. Kontrollgruppe | 14 |
| 2.2. Patientendaten | 14 |
| 2.2.1. Biometrische Daten | 14 |
| 2.2.2. Blutungsanamnese | 15 |
| 2.2.3. Blutungsscore | 15 |
| 2.3. Probengewinnung und -aufbereitung | 17 |
| 2.3.1. Blutentnahme | 17 |
| 2.3.2. Herstellung der Plasmaproben | 18 |
| 2.4. Testverfahren der Gerinnungsparameter | 18 |
| 2.4.1. Thrombozytenzahl | 19 |
| 2.4.2. Aktivierte Partielle Thromboplastinzeit | 19 |
| 2.4.3. Thromboplastinzeit | 19 |
| 2.4.4. Fibrinogen | 20 |
| 2.4.5. Faktor VIII-Aktivität | 20 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4.6. Ristocetin-Cofaktor-Aktivität | 20 |
| 2.4.7. VWF-Antigen..... | 21 |
| 2.5. DNA-Isolation..... | 21 |
| 2.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) | 23 |
| 2.6.1. PCR-Programm..... | 25 |
| 2.6.2. Aufbereitung des PCR-Produkts..... | 25 |
| 2.6.3. Gelelektrophorese | 25 |
| 2.6.3.1. Herstellung eines 1%igen Gels | 25 |
| 2.6.3.2. Darstellung des PCR-Produkts | 26 |
| 2.7. Statistische Auswertung | 27 |
| 2.7.1. Deskriptive Statistik..... | 27 |
| 2.7.2. Statistische Methodik | 27 |
| 3. Ergebnisse | 29 |
| 3.1. Alters- und Geschlechtsverteilung | 29 |
| 3.2. Klinisch erhobene Befunde | 29 |
| 3.2.1. Häufigkeit der Blutungssymptome | 29 |
| 3.2.2. Blutungsscore..... | 31 |
| 3.2.3. Verteilung nach Blutungsscore | 31 |
| 3.2.4. Blutungssymptomatik in Bezug auf Lebensalter und Geschlecht | 32 |
| 3.3. Gerinnungsparameter | 34 |
| 3.3.1. Thrombozytenzahl..... | 34 |
| 3.3.2. Aktivierte Partielle Thromboplastinzeit..... | 35 |
| 3.3.3. Thromboplastinzeit | 36 |
| 3.3.4. Fibrinogen | 37 |
| 3.3.5. FaktorVIII-Aktivität..... | 39 |
| 3.4. VWF-Antigen und Ristocetin-Cofaktor-Aktivität | 40 |
| 3.4.1. Einteilung in Gruppen | 40 |
| 3.4.2. Alters- und Geschlechterverteilung in den Gruppen..... | 40 |
| 3.4.3. Laborparameter und klinische Blutungsneigung | 41 |
| 3.5. Glykoprotein Ia-Polymorphismus | 42 |
| 3.5.1. Genotypfrequenz der Patienten mit VWS Typ 1 | 43 |
| 3.5.2. Kontrollgruppe | 43 |
| 3.5.2.1 Genotypfrequenz der Kontrollgruppe..... | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5.3. Einfluss des GP Ia-Polymorphismus auf die Blutungssymptomatik | 44 |
| 3.5.4. GP Ia-Polymorphismus in den Gruppen A-C | 45 |
| 4. Diskussion | 47 |
| 4.1. Von Willebrand-Syndrom | 47 |
| 4.1.1. Symptomatik des von Willebrand-Syndroms | 48 |
| 4.1.2. Variabilität der klinischen Ausprägung | 48 |
| 4.2. Diagnostik des VWS Typ 1 | 50 |
| 4.3. Schweregradeinteilung nach Blutungssymptomatik | 53 |
| 4.4. Verteilung der Patienten in den Gruppen A - C | 54 |
| 4.5. Beurteilung der Gerinnungsparameter | 55 |
| 4.5.1. Thrombozytenzahl | 56 |
| 4.5.2. Aktivierte Partielle Thromboplastinzeit (aPTT) | 56 |
| 4.5.3. Thromboplastinzeit (TPZ)..... | 57 |
| 4.5.4. Fibrinogen | 58 |
| 4.5.5. Faktor VIII-Aktivität | 58 |
| 4.6. Zusammenhang von klinischer Blutungssymptomatik mit Lebensalter und Geschlecht | 60 |
| 4.7. Zusammenhang von klinischer Blutungssymptomatik und Funktion des VWF..... | 61 |
| 4.8. Einfluss des GP Ia-Polymorphismus | 64 |
| 4.8.1. GP Ia/IIa-Rezeptor | 64 |
| 4.8.2. GP Ia-Polymorphismus | 65 |
| 4.8.2.1. Genotypfrequenz des GP Ia-Polymorphismus..... | 66 |
| 4.8.3. GP Ia-Polymorphismus und VWF | 67 |
| 4.8.3.1. Genotypfrequenz des GP Ia-Polymorphismus in den Gruppen A-C. | 69 |
| 4.8.4. GP Ia-Polymorphismus bei thromboembolischen Ereignissen | 69 |
| 4.8.5. GP Ia-Polymorphismus und Blutungsneigung..... | 71 |
| 5. Schlussfolgerung für die klinische Praxis | 75 |
| 6. Zusammenfassung | 77 |
| 7. Summary | 78 |
| 8. Abkürzungsverzeichnis..... | 79 |
| 9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis | 80 |
| 10. Literatur | 81 |

| | |
|---|----|
| 11. Anhang | 94 |
| 12. Erklärung zur Dissertation | 95 |
| 13. Danksagung | 96 |

1. EINLEITUNG

1.1. Hämostase

Die Blutgerinnung und die physiologische Blutstillung sind von grundlegender Bedeutung für den menschlichen Organismus und werden als Hämostase bezeichnet. Dabei ist ein exaktes Gleichgewicht zwischen prothrombotischen und antithrombotischen Effekten notwendig, um sowohl eine suffiziente Blutstillung bei Läsionen als auch die unbehinderte lebensnotwendige Blutzirkulation zu gewährleisten. Der Vorgang der Blutgerinnung kann in eine primäre und eine sekundäre Komponente unterteilt werden und wird ausgelöst, sobald die vaskuläre endotheliale Auskleidung zerreißt und das subendotheliale Bindegewebe mit Blut in Kontakt kommt. Die primäre Hämostase beruht neben vaskulären Reaktionen vor allem auf der Bindung von Thrombozyten an subendotheliales Kollagen mit Hilfe des von Willebrand-Faktors (VWF) und anschließender Thrombozytenaggregation an der Stelle der Läsion (Kretschmer et al, 2008). Sie geschieht innerhalb von Sekunden nach einer Gefäßverletzung und ist von größter Wichtigkeit bei der Begrenzung des Blutverlustes aus den Kapillaren, kleinen Arteriolen und Venolen. Nach der primären noch instabilen Abdichtung der Läsion durch den Thrombus wird die Gerinnungskaskade aktiviert. Hier beginnt die sekundäre Hämostase, die die Reaktionen innerhalb des plasmatischen Gerinnungssystems darstellt, die letztlich zur Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin und damit zum stabilen Wundverschluss führt (Behrends, 2010). Dieser Vorgang ist besonders wichtig bei verletzten größeren Gefäßen und verhindert Blutungsrezidive Stunden oder Tage nach dem eigentlichen Trauma. Primäre und sekundäre Gerinnung sind eng miteinander verwoben.

Die Blutgerinnung ist ein extrem komplexes System und ein Ungleichgewicht kann schwerwiegende Konsequenzen zur Folge haben. Allein schon die qualitative oder quantitative Abweichung nur einer Komponente, wie beispielsweise dem VWF, kann zu Krankheit und mitunter auch zu lebensbedrohlichen Situationen führen.

1.1.1. Von Willebrand-Faktor

Der VWF ist ein adhäsives Glykoprotein, das an der primären und sekundären Hämostase beteiligt ist. In der primären Hämostase vermittelt er die Adhäsion von Thrombozyten an das verletzte Subendothel und ist ebenfalls an der Thrombozytenaggregation beteiligt. Er ermöglicht den Thrombozyten, trotz der im Gefäßlumen herrschenden hohen Scherkräfte, insbesondere im arteriellen System, an der Gefäßwand haften zu bleiben (Budde et al, 1999).

Das Gen des VWF ist am distalen Ende des kurzen Arms des Chromosoms 12 lokalisiert (Mazurier et al, 1996; Scharrer, 1997). Es besteht aus 178 Kilobasen, die sich auf 52 Exons und Introns verteilen (Mazurier et al, 1998). Das Gen enthält mehrere sich wiederholende homologe Regionen, die durch Genreplikation und Fusion während der Evolution entstanden sind.

Eine einzelne große Untereinheit des VWF-Vorläufers wird als primäres Translationsprodukt mit einer Größe von 2813 Aminosäuren in Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert (Schlokot et al, 1995). Intrazellulär wird zunächst ein 22 Aminosäuren langes Sekretionspeptid abgespalten. Es resultiert der Pro-VWF, der glykosiliert und am carboxyterminalen Ende zum Protomer dimerisiert wird. Über Disulfidbrücken am N-terminalen Ende werden die Dimere gekoppelt und in Multimere überführt. Die 741 Aminosäuren langen Propeptide werden abgespalten (Schneppenheim, 1997). Ergebnis ist eine Reihe von Plasmamultimeren gleicher Zusammensetzung, die aber in Abhängigkeit von der Anzahl der Monomere unterschiedliche Größen zwischen 250 Kilodalton (Monomere) und über 20000 Kilodalton (Multimere) aufweisen (Ruggeri, 1999). Sie werden bei Bedarf vom Endothel ins Blut sezerniert oder in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert. Die α -Granula der Thrombozyten stellen einen weiteren Speicherort dar (Schlokot et al, 1995). Propeptide und Multimere werden zu gleichen Teilen in die Zirkulation abgegeben; dabei beträgt die Halbwertszeit des Propeptids 2-3h, die der Multimere 8-12h (Barthels, 2013).

Gerade den Multimeren kommt eine wichtige Rolle in der Thrombozytenadhäsion und -aggregation zu. Die VWF-Multimere mit dem höchsten Molekulargewicht sind die effektivsten in der primären Hämostase (Federici et al, 1989). Die Angaben zu normalen Plasmakonzentrationen des VWF variieren zwischen ca. 7mg/l bis 10 mg/l.

Der VWF enthält mehrere Kopien funktioneller Domänen, die bestimmte Bindungsstellen für lösliche und zelluläre Komponenten besitzen. Hierzu gehören Bindungsstellen für Faktor VIII, Kollagen, Heparin sowie die thrombozytären Glykoproteine GP Ib/IX und GP IIb/IIIa. Der VWF erleichtert die Thrombozytenadhäsion an verletztes oder exponiertes Subendothel. Die adhärenen Thrombozyten setzen dann vorgeformte granuläre Bestandteile frei und bilden so neue Mediatoren. Die Adhäsion wird durch die Interaktion des VWF mit subendothelialen Komponenten, wie z.B. Kollagen vermittelt. Dabei erfährt der VWF strukturelle Modifikationen, koppelt anschließend mit der A1-Domäne an den GP Ib/IX-Rezeptor der Thrombozyten (Clemetson et al, 2001) und initiiert die reversible Thrombozytenadhäsion. Diese initialen Ereignisse führen zur Expression des GP IIb/IIIa-Komplexes auf der Thrombozytenmembran, an den der VWF mit seiner C1-Domäne bindet (Berliner et al, 1988). Dies führt zu einer irreversiblen Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten.

Insbesondere VWF-Multimere mit dem höchsten Molekulargewicht fördern die Thrombozytenaggregation, da sie mit ihren zahlreichen Bindungsstellen eine optimale Vernetzung gewährleisten (von

Depka Prondzinski, 2002). Hierauf ist die besondere Bedeutung hochmolekularer VWF-Moleküle, auch in Plasmakonzentraten, zurückzuführen. Selektives Fehlen dieser großen Multimere charakterisiert bestimmte Formen des von Willebrand-Syndroms (VWS).

In der sekundären Hämostase stabilisiert der VWF den zirkulierenden Faktor VIII durch Bindung an seinem N-terminalen Ende, schützt diesen somit vor der Inaktivierung durch Protein C oder Faktor Xa und verlängert so dessen Halbwertszeit (Mazurier et al, 1996).

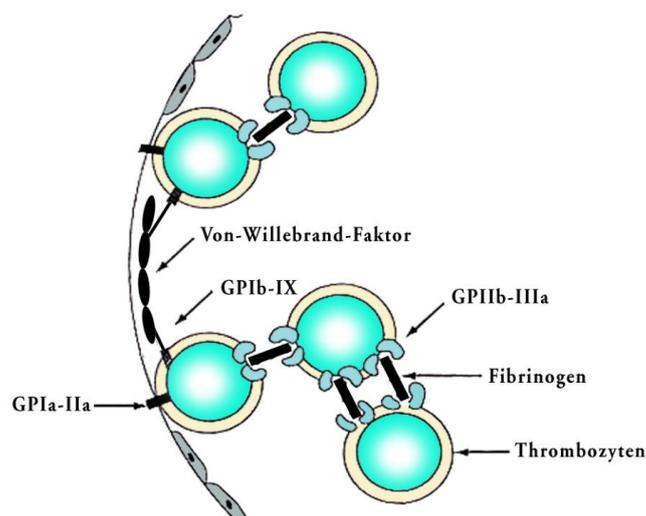


Abbildung 1.1: Molekulare Grundlage der Thrombozytenadhäsion und -aggregation.

1.1.2. Faktor VIII

Der physiologische Prozess der Blutgerinnung bedarf einer Vielzahl von Enzymen und Kofaktoren. Der Mangel oder das Defizit eines einzelnen Faktors kann die Thrombinbildung beeinträchtigen und Gerinnungsstörungen verursachen. Diese Gerinnungsfaktoren sind proteolytische Enzyme, die im Plasma in inaktiver Form als Proenzyme vorliegen und sich erst bei Provokation der Gerinnung in einer kaskadenartig ablaufenden Kette von Reaktionen gegenseitig aktivieren. Eines dieser Enzyme ist der sogenannte Faktor VIII (FVIII). Dabei handelt es sich um ein Akzelerationsglobulin, dessen Präsenz die enzymatischen Prozesse beschleunigt. Das Faktor VIII-Molekül besteht aus verschiedenen Domänen mit unterschiedlichen Eigenschaften, zum Beispiel Bindung des VWF oder Thrombinspaltungsstellen (Mannucci et al, 1999). Die inaktive Form des FVIII bedarf einer Aktivierung durch Thrombin. Die Funktion des aktivierten Faktor VIII (FVIIIa) besteht darin, in der Gegenwart von Kalziumionen die Umwandlung von Faktor X in die aktive Form zu beschleunigen (Kaufman et al, 2006). Das bekannteste Mangelsyndrom des FVIII ist die klassische Hämophilie, die Hämophilie A. Da der FVIII im Blut an sein Trägerprotein, den VWF, im Verhältnis 1:50 bis 1:100 VWF-Monomere konstant gebunden ist, wird er vor proteolytischem Abbau durch beispielsweise Plasmin oder Elastase (Barthels, 2013) geschützt. Somit spielt der VWF eine wichtige protektive Rolle. Durch einen quantitativen oder qualitativen Mangel verkürzt sich die Halbwertszeit des FVIII von ca. 10h auf 2h und kann somit auch zur Störung der plasmatischen Gerinnung führen (Kaufman et al, 2006).

1.1.3. Glykoprotein Ia/IIa

Neben vielen anderen beim Gerinnungsvorgang einsetzenden Reaktionen kommt es bei der Entwicklung eines Thrombus am geschädigten Gefäßendothel zur Verformung der aktivierten Thrombozyten. Unter anderem werden dabei Glykoproteine (GP) an der Thrombozytenoberfläche gebildet (Baumgartner, 1977; Gawaz, 1999). Diese Membranglykoproteine sind Rezeptoren, die zwei wichtige Funktionen vermitteln, zum einen die Adhäsion an das subendotheliale Gewebe und zum anderen die Aggregation der Thrombozyten untereinander. Viele dieser Glykoproteinrezeptoren sind nicht kovalent gebundene Heterodimere, insbesondere die, die zu den Adhäsionsrezeptoren gehören und als Integrine bezeichnet werden (Kunicki, 1989). Menschliche Thrombozyten bilden fünf verschiedene Adhäsionsrezeptoren (Pötzsch, 2010). Einer

davon ist das Glykoprotein Ia/IIa (GP Ia/IIa), das die Adhäsion der Thrombozyten sowohl an fibrilläres (Typ I, III und V) als auch an nicht fibrilläres (Typ IV, VI, VII und VIII) Kollagen vermittelt (Kunicki et al, 1981/1988; Pischel et al, 1988; Takada et al, 1988; Saelman et al, 1994). Die GP Ia/IIa-Rezeptordichte kann in der Normalbevölkerung bis um das zehnfache variieren, was mit der unterschiedlich ausgeprägten Adhäsion an Typ I oder Typ III Kollagen korreliert (Kunicki TJ, 2001).

1.1.3.1. Polymorphismus

Allele sind molekulare Varianten eines kodierenden Gens bzw. Genorts. Sie entstehen, wenn ein oder mehrere Nukleotidpaare gegen andere ausgetauscht werden (z.B. Adenin-Thymin gegen Guanin-Cytosin) oder verloren gehen (Groth, 2013). Das Auftreten mehrerer Genvarianten eines oder mehrerer Allele, so genannte Sequenzvariationen, in den Genen einer Population bezeichnet man als Polymorphismus. Unter Allelfrequenz versteht man die Auftretenshäufigkeit einer Genvariante. Die häufigsten Sequenzvariationen sind die Einzelnukleotidpolymorphismen, bei denen es zum Austausch eines einzelnen Nukleotids im DNA-Molekül kommt.

Genetische Polymorphismen gelten somit als Normvarianten, die entweder als „neutrale Polymorphismen“ keinen Einfluss auf den Organismus haben oder in bestimmter Konstellation Krankheitsrisiken erhöhen (Müller, 2013). Abzugrenzen ist hierbei der Begriff der Mutation, die eine Abweichung der normalen DNA-Sequenz bezeichnet. Das bedeutet, es existiert ein normales, in einer Population prävalentes Allel, das durch die Mutation in eine seltene und abnormale Variante konvertiert. Im Gegensatz dazu ist ein Polymorphismus eine, in einer Population häufig vorkommende Variante der DNA-Sequenz. Eine häufig verwendete Definition des Polymorphismus beschreibt, dass die Allelfrequenz für das variante Allel $> 1\%$ in einer Population sein muss (Gibson, 2011), anderenfalls wird von einer Mutation gesprochen. Dies trifft allerdings nicht immer zu, da auch eine Veränderung mit einer Allelfrequenz $< 1\%$ phänotypisch konsequenzlos sein kann (Müller, 2013).

Bei einer Mutation aber handelt es sich um eine krankheitsverursachende Veränderung, die bei autosomal dominanter Vererbung im heterozygoten Zustand und bei autosomal rezessivem Erbgang nur im homozygoten Zustand zur Erkrankung führt (Müller, 2013).

1.1.3.2. Glykoprotein Ia/IIa Rezeptordichte

Bei dem Glykoprotein Ia/IIa handelt es sich um ein Heterodimer, das aus zwei unterschiedlichen Glykoproteinen besteht. Die Rezeptordichte des GP Ia/IIa ist mit einem Polymorphismus des kodierenden Gens für das Glykoprotein Ia (Integrin α IIb) assoziiert. Dieser Einzelnukleotidpolymorphismus ist an Position 807 des sogenannten ITGA2 Gens lokalisiert und bedingt die Ausprägung von drei unterschiedlichen Genotypen. Diese können durch eine Gruppe stiller bzw. nicht codierter Sequenzunterschiede innerhalb des Gensegments kenntlich gemacht werden (Kunicki et al, 1997; Kritzik et al 1998).

Die Genotypen mit der Ausprägung des Nukleotids Cytosin (C), also heterozygot CT oder homozygot C sind mit einer niedrigen Rezeptordichte verbunden, während der Genotyp mit der homozygoten Ausprägung des Nukleotids Thymin (T) (homozygot T) eine Dichteerhöhung der GP Ia/IIa-Rezeptoren an der Thrombozytenoberfläche bewirkt (Kunicki et al, 1997; Kritzik et al, 1998).

Aus dieser erhöhten Expression des Kollagenrezeptors GP Ia/IIa an der Zellmembran resultiert eine verstärkte Thrombozytenadhäsion, die als potentieller Risikofaktor mit akuten thromboembolischen Ereignissen in Verbindung gebracht werden konnte (Moshfegh et al, 1999; Corral et al , 1999; Roest et al, 2000). Entsprechend konnte die Bedeutung des GP Ia/IIa als Rezeptor, der primär die Thrombozytenadhäsion an Kollagen unter fließenden Bedingungen vermittelt, durch einen Bericht über einen Patienten mit GP Ia/IIa-Mangel, bei dessen Thrombozyten die Bindung an Kollagen ausblieb, hervorgehoben werden (Saelman et al, 1994; Nieuwenhuis et al, 1985; Santoro et al, 1995; Sixma et al, 1995).

1.2. Von Willebrand-Syndrom

Erstmals wurde das von Willebrand-Syndrom (VWS) 1926 von einem finnischen Internisten namens Erik Adolf von Willebrand, in Helsinki, am Beispiel einer Blutersippe von den Ålandinseln, beschrieben. In der Annahme, die Erkrankung ähnele der hämorrhagischen Diathese der Hämophilie, wählte von Willebrand die Bezeichnung „hereditäre Pseudo-hämophilie“ (von Willebrand, 1926). Er erhob Befunde, die eine Abnormalität der Thrombozytenfunktion nahelegten. Im Gegensatz zur Hämophilie waren auch Frauen von der Blutungsneigung betroffen.

Er charakterisierte das Vererbungsmuster des ursprünglich untersuchten Stammbaums fälschlich als X-chromosomal-dominant, da die Erkrankung scheinbar bei weiblichen

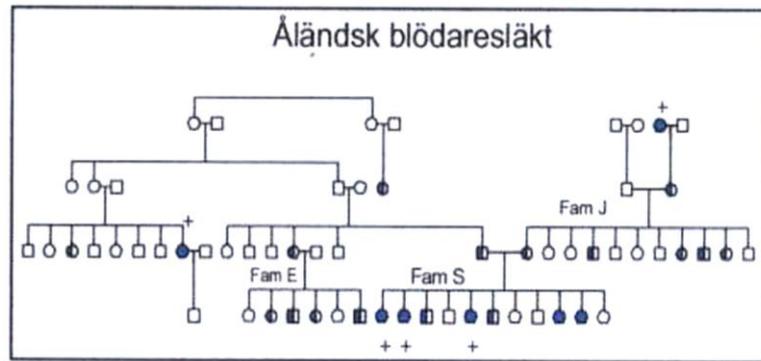


Abbildung 1.2: Blutersippe von den Åland-Inseln.

Patienten häufiger auftrat. Diese Häufigkeit aber war weitgehend zufällig und beruhte auf einer verstärkten Penetranz in Verbindung mit hämostatischer Belastung durch Menstruation und Schwangerschaft. Letztlich aber konnte von Willebrand das später nach ihm benannte Krankheitsbild von der Hämophilie abgrenzen.

1933 wurden in einer gemeinsamen Arbeit mit dem Leipziger Hämatologen Jürgens weitere Details dieser neuen Bluterkrankheit publiziert, daher die Bezeichnung „von Willebrand-Jürgens-Syndrom“. International ist heute die Bezeichnung „von Willebrand Disease (VWD)“ üblich (Schneppenheim/Budde 2010), die aber lediglich die hereditäre Form benennt. Die erworbene und die erbliche Form werden im englischen Sprachgebrauch unter dem Begriff „von Willebrand Syndrom“ zusammengefasst. Im deutschen Sprachgebrauch wird der Begriff VWS für beide Formen benutzt.

Das VWS ist eine Erkrankung des Gerinnungssystems, die durch eine quantitative bzw. qualitative Bildungsstörung des VWF und dadurch ausgelöste Thrombozytenfunktionsstörung und eine sekundäre verminderte Aktivität des FVIII charakterisiert ist (Mazurier et al, 1996). Es ist die häufigste vererbte Bluterkrankheit, die Männer und Frauen in allen Ländern betrifft. Die Prävalenz wird mit 0,8 bis 1,3% angegeben (Rodeghiero et al, 1987; Werner et al, 1993) Klinische Relevanz weist das VWS jedoch nur bei einem geringer Teil der Betroffenen (1:3000 bis 1:10000) auf (Budde et al, 2004). Das schwere VWS ist sehr selten (ca.0,5-3,0 auf 1.000.000). Das bedeutet, dass in der Bundesrepublik Deutschland mit ca. 250 Patienten mit schwerem Krankheitsbild zu rechnen ist (Schneppenheim, 1997).

1.2.1. Klassifikation

Das VWS ist ein sehr heterogenes Krankheitsbild. Abgesehen von der Variabilität der Blutungsereignisse gibt es erhebliche Unterschiede bei den Laborbefunden. So kann eine verlängerte aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), die auf die damit verbundene verminderte FVIII-Aktivität zurückzuführen ist, imponieren. Am häufigsten ist allerdings die Kombination aus erniedrigtem VWF-Antigen und verminderter Ristocetin-Cofaktor-Aktivität. Eine verlängerte Blutungszeit ist ebenfalls oft nachweisbar, ihre Bestimmung ist aber störanfällig und aufwendig und wird daher nur noch selten durchgeführt. Die Schwankungen der Laborbefunde hängen zum einen von der Variabilität der Defekte des VWS ab, zum anderen werden die Plasmaspiegel durch weitere Faktoren, wie dem AB0-Blutgruppentyp, systemischen Entzündungen, hormonellen Schwankungen (insbesondere Schwangerschaft), sowie dem Lebensalter und Geschlecht beeinflusst.

Die Klassifikation des kongenitalen VWS erfolgt primär in drei große Kategorien. Typ 1 und Typ 3 weisen einen partiellen oder nahezu kompletten Mangel an plasmatischem VWF auf, beim Typ 2 bestehen qualitative Defekte des VWF (Nitu-Whalley et al, 2000).

Somit gibt die Klinik bereits einen Aufschluss darüber, um welche Form des VWS es sich handeln könnte. Da die Klassifikation der einzelnen Defekte des VWS noch nicht vollständig abgeschlossen ist und weiterhin Bereiche existieren, in denen zwei Subtypen nicht klar voneinander abgegrenzt werden können, variieren die Angabe zu den Häufigkeiten der verschiedenen Formen zum Teil erheblich. Mit der sich in den letzten zwei Jahrzehnten verbessernden Diagnostik hat sich auch die Unterteilung in die einzelnen Subtypen geändert.

So wurde in einer neueren Untersuchung die Erscheinungsform des VWS Typ 1, die bisher 80-90% der in Spezialzentren registrierten Fälle repräsentierte (Rodeghiero et al, 1987), nur bei 58% der Patienten diagnostiziert. Der Typ 2 stellte sich mit 40% der Fälle als weitaus häufiger als bisher angenommen dar (Schneppenheim/Budde, 2010).

Patienten mit einem VWS Typ 1 weisen eine leichte bis mäßige Verminderung des Plasma-VWF auf. Bei den leichteren Formen liegt der VWF-Spiegel, trotz deutlich beeinträchtigter Hämostase, nur wenig unterhalb des Normbereichs. Der Vererbungsgang ist autosomal dominant. Beim Typ 1 treten eine parallele Verminderung des VWF-Antigen und der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität auf, wobei sich ein normales Spektrum von Multimeren nachweisen lässt. Das VWS Typ 1 kann als

Kombination von Störungen der primären und sekundären Hämostase bezeichnet werden.

Die Varianten des VWS Typ 2 sind definiert als qualitative Veränderungen und somit Einschränkungen der funktionellen Aktivität des Proteins. Aufgrund der Komplexität dieser Form des VWS mit unterschiedlichem Ausmaß der Proteindysfunktion ist eine weitere Unterteilung in die Subtypen Typ 2A, Typ 2B, Typ 2M und Typ 2N notwendig. Patienten mit VWS Typ 2A weisen einen Mangel an hoch- und mittelmolekularen Formen der VWF-Multimere auf (Scharrer, 1997). Dieser Mangel wird entweder durch die Unfähigkeit zur Sekretion hochmolekularer VWF-Multimere oder durch Proteolyse der Multimere kurz nach Verlassen der endothelialen Zelle und vor dem Eintritt in den Kreislauf verursacht. Der Typ 2 A wird in weitere Subtypen unterteilt, deren Erbgang variiert. Bei dem VWS Typ 2B tritt auch ein Verlust an hochmolekularen Multimeren auf (Schneppenheim, 1997). Allerdings wird dieser Verlust durch eine unphysiologische Bindung des VWF, der eine erhöhte Affinität zum Thrombozyten-Glykoproteinrezeptor Ib/IX aufweist (Nichols, 1997), an die Thrombozyten bewirkt.

Beim VWS Typ 2M ist die Interaktion mit den Thrombozyten trotz Vorhandensein der hochmolekularen Multimere vermindert (Sadler et al, 2000). Das VWS Typ 2N zeigt einen VWF-Defekt mit verminderter Affinität zum Faktor VIII. Dabei bezieht sich die Funktionseinschränkung auf die Bindung und Stabilisierung des Faktor VIII. Die Faktor VIII-Menge ist daher vermindert, der klinische Phänotyp kann mit der Hämophilie A verwechselt werden (Mazurier et al, 1992). Der Erbgang ist autosomal rezessiv.

Das VWS Typ 3 ist sehr selten. Die Prävalenz wird mit weniger als 1-2% aller Patienten mit VWS angegeben. Es handelt sich um eine äußerst schwere Form, die autosomal rezessiv vererbt wird (Mazurier et al, 1996). VWF-Antigen- oder Aktivitätswerte sind oft nicht nachweisbar. Zudem kann die Faktor VIII-Aktivität (FVIII:C) extrem vermindert sein.

Neben den vererbten Formen kann das VWS aber auch im Rahmen einer anderen Grundkrankheit, wie zum Beispiel bei malignen Lymphomen oder autoimmunologischen Erkrankungen auftreten. Diese erworbenen Formen werden verursacht durch Antikörper, welche die Funktionen des VWF blockieren, oder durch lymphoide oder andere Tumore, die selektiv VWF-Multimere auf ihren Oberflächen absorbieren (Budde et al, 1984; Jakway, 1992). Ebenfalls erworbene Formen des VWS können durch stenosierende Herzvitien mit erhöhten Scherkräften des Blutes und

dadurch bedingtem Verlust der großen Multimere (von Depka Prondzinski, 2002) oder auch durch Medikamente verursacht werden.

Die Abgrenzung zur hereditären Form ergibt sich aus der Familienuntersuchung, der Anamnese (spätes Auftreten von Blutungssymptomen) und der Diagnose einer Grundkrankheit.

1.2.2. Klinische Symptomatik

Für die normale Hämostase sind neben der Funktion der Plasmafaktoren und den vaskulären Bedingungen die drei oben genannten Thrombozytenreaktionen erforderlich. Pathologische Blutungsereignisse können daraus resultieren, dass eine oder mehrere dieser Funktionen gestört sind.

Obwohl es sich beim VWS um eine heterogene Störung handelt, betreffen bestimmte klinische Befunde alle Formen des VWS gleichermaßen. Eine mäßige Verminderung der Plasma-VWF-Konzentration oder ein selektiver Verlust der hochmolekularen Multimere reduziert die Thrombozytenadhäsion, beeinflusst sekundär die Aktivität des Faktor VIII und führt so zu klinischen Blutungen.

Typisch für das von Willebrand-Syndrom sind Schleimhautblutungen aus Nase, Mund, Magen-Darm-Trakt, sowie Menorrhagien, außerdem kommt es zu Sofortblutungen und Nachblutungen während bzw. nach operativen Eingriffen. Unter Kontrazeption, am Ende der Schwangerschaft (Ostendorf et al, 1991), im Alter (ab ca. 40 Jahren (Gill et al, 1987)) und nach der Menopause nimmt die Blutungsneigung ab (Scharrer, 1997).

1.2.2.1. Blutungstyp

Bei Patienten mit VWS ist die Blutungssymptomatik sehr variabel. Es treten sowohl die für die Koagulopathien typischen großflächigen Blutungen in Haut und Subkutis, zum Teil auch in die Muskulatur mit palpabler Schwellung (nach Trauma oder auch spontan) als auch Petechien, Purpura und Ekchymosen vor allem an den Extremitäten, wie sie bei den thrombozytär oder vaskulär bedingten hämorrhagischen Diathesen (Siegenthaler, 2005) vorkommen, auf.

1.2.2.2. Blutungsereignisse

Bei vielen Patienten kann die Diagnose eines VWS aufgrund der Familiengeschichte und den gehäuften charakteristischen Blutungen bereits vermutet werden. Das Leitsymptom beim klassischen VWS sind Blutungen vom mukokutanen Typ, wie

Nasen- und Schleimhautblutungen (Rodeghiero et al, 2001) sowie eine leichte Verletzlichkeit der Hautgefäße. Häufig treten auch eine verstärkte Neigung zur Hämatombildung und eine verlängerte Blutung nach kleineren Verletzungen oder bei chirurgischen Eingriffen auf. Vorallem bei Zahnextraktionen oder Operationen im Hals-Nasen-Ohren-Bereich kann es zu starken Blutungen bzw. Nachblutungen kommen. Weibliche Patienten können unter schweren Menorrhagien leiden, die über Wochen, in manchen Fällen sogar über Monate andauern. Schwangere mit VWS haben ein erhöhtes Risiko für peripartale Blutungen.

Vereinzelt treten Blutungen des Gastrointestinal- oder Urogenitaltraktes auf. Gelenk- und Muskelblutungen, wie bei der Hämophilie, sind sehr selten und meist mit einer schweren Form des VWS mit stark erniedrigten FVIII -Werten verbunden.

1.2.3. Diagnostik des VWS

Bei der ersten klinischen Einschätzung einer Person, bei der der Verdacht auf ein VWS besteht, sollte der Fokus auf die persönliche Blutungsanamnese und die Familienanamnese bezüglich einer Blutungsneigung gerichtet werden. Die Blutungsanamnese sollte spontane Blutungen, Schweregrad, Lokalisation, Dauer, die Art von chirurgischen Eingriffen oder Verletzungen verbunden mit einem Blutungsereignis, die Mittel, mit denen eine Blutung gestoppt werden konnte, sowie eine mögliche antikoagulativ wirkende Medikamenteneinnahme in zeitlichem Zusammenhang mit dem Auftreten einer Blutung enthalten.

Idealerweise könnte eine einfache, einzelne Laboruntersuchung auf das Vorliegen eines VWS hinweisen. Dieser Screening-Test müsste eine Sensitivität für das Vorliegen der meisten VWS Typen und eine niedrige falsch-positiv Rate aufweisen. Leider existiert ein solcher Test nicht (Bethesda et al, 2007).

Zur orientierenden Diagnostik zählen neben der genauen Blutungsanamnese, aPTT, Blutungszeit und eine Filtermethode mit hohem Scherstress (z.B. Plättchen-Funktions-Analysator-100 (PFA-100)). Die erweiterte Diagnostik besteht aus VWF-Antigen (VWF:Ag), Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (VWF:RiCoF) und Faktor VIII-Aktivität. Die spezielle Diagnostik letztlich beinhaltet die Bestimmung der VWF-Kollagenbindungskapazität (VWF:CB), Ristocetin-induzierte Aggregation (RIPA), Multimeranalyse, VWF-Parameter in Thrombozyten sowie die FVIII-Bindungskapazität des VWF (VWF:FVIIIIB) (Budde et al, 2004).

1.2.4. Therapie des VWS

Zwei Therapieoptionen stehen bei der Behandlung des VWS zur Verfügung. Zum einen kann die Sekretion von körpereigenem, gespeichertem VWF provoziert, zum anderen das Defizit durch Präparate, die VWF enthalten ausgeglichen werden.

Durch die Gabe von Desmopressin (Minirin®) wird der physiologisch in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeicherte VWF genutzt und dessen Freisetzung bewirkt (Kaufmann et al, 2000). Es folgt ein kurzfristiger Anstieg des VWF und damit auch des FVIII im Plasma. In der Behandlung des VWS Typ 1 gilt Desmopressin als Basistherapeutikum, dessen Effektivität in einer Vielzahl von Studien belegt worden ist (Pötzsch et al, 2010). Eine maximale Steigerung des Ausgangswerts auf das Drei- bis Vierfache wird innerhalb der ersten Stunde erreicht und lässt anschließend kontinuierlich über 4-8 h nach (Schneppenheim et al, 2005). Intravenöse Gaben werden mit 0,3-0,4 µg/kg dosiert (Barthels, 2013), eine Alternative bietet die nasale Applikation. Desmopressin wird bei mäßigen und starken Blutungen sowie zur Prophylaxe bei operativen Eingriffen eingesetzt.

Bei Patienten mit VWS Typ 2B ist Desmopressin aufgrund der Gefahr einer konsekutiven Thrombozytopenie als Folge einer Thrombozytenagglutination (Hiller et al, 1998) als kontraindiziert angesehen. Bei Patienten mit VWS Typ 3 ist die Desmopressingabe wirkungslos, da sie weder zirkulierenden, noch in Weibel-Palade-Körperchen gespeicherten VWF besitzen.

Eine alternative Behandlungsmöglichkeit insbesondere für VWS Typ 2B und Typ 3 bietet das Faktor VIII-Konzentrat, zum Beispiel Haemate®, das aus gepooltem menschlichen Plasma hergestellt wird und ursprünglich für die Behandlung der Hämophilie entwickelt wurde. Bei ausreichender Konzentration eines funktionell aktiven VWF (vor allem der großen Multimere) profitieren VWS-Patienten ebenso von diesem Präparat. Ein neues Präparat ist ein aufgereinigtes VWF-Konzentrat (Willfact®), das keinen funktionellen FVIII-Anteil enthält (Schneppenheim/Budde, 2010).

1.3. Ziel der Arbeit

Die ausgeprägte Vielfalt des VWS ist die Ursache für die Probleme bei der korrekten Diagnostik und der davon abzuleitenden geeigneten Therapie. Diese Problematik tritt besonders beim VWS Typ 1 in Erscheinung. Wegen der oft nur milden Symptomatik wird dem VWS Typ 1 meist keine größere Bedeutung zugesprochen, was dazu führt, dass in vielen Fällen weiterhin Unsicherheit darüber besteht, ob es sich überhaupt um ein VWS handelt bzw., ob die Zuordnung zum Typ 1 korrekt ist.

Die klinisch erhobenen Befunde bei Patienten mit VWS Typ 1 weisen signifikante Differenzen auf, deren Ätiologie noch nicht eindeutig geklärt werden konnte. In der Literatur existiert der Hinweis (Di Paola et al, 1999), dass der GP Ia-Polymorphismus das Ausmaß der Blutungsneigung bei VWS-Patienten beeinflussen kann. Um diese Aussage zu überprüfen, wurde eine retrospektive Analyse der VWS Typ 1 Patienten der Gerinnungsambulanz des Universitätsklinikums Gießen durchgeführt. Ziel der Analyse war, einen mutmaßlichen Zusammenhang der GP Ia/IIa-Rezeptordichte auf der Thrombozytenoberfläche, die mit einem Einzelnukleotidpolymorphismus an Position 807 des ITGA2 Gens assoziiert ist, mit dem Schweregrad der Erkrankung bei Patienten mit VWS Typ 1 herauszuarbeiten. Geprüft wurde, ob eine stärkere klinische Ausprägung der Blutungsneigung in Zusammenhang mit dem Basenaustausch von T zu C an Position 807 des ITGA2 Gens, das für das Glykoprotein Ia kodiert, und der damit verbundenen verminderten Expression der Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche steht.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1. Patienten

2.1.1. VWS-Patienten

Die für die Studie verwendeten Daten stammten von insgesamt 73 Patienten mit bereits bekanntem bzw. neu diagnostiziertem VWS Typ 1, die sich im Zeitraum von Januar 2000 bis Februar 2003 in der Gerinnungsambulanz der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Gießen vorstellten. Es handelte sich um 49 Frauen im Alter von 13 bis 74 Jahren (Median: 41 Jahre) und 24 Männer im Alter von 12 bis 83 Jahren (Median: 39 Jahre).

Im Rahmen der Ambulanzvorstellung wurde neben der routinemäßigen Blutentnahme zur Analyse von Laborparametern ein Fragebogen zur detaillierten Blutungsanamnese mit der Bitte um Bearbeitung ausgehändigt.

Zwecks Anonymisierung wurden nach Zuordnung der Blutungsanamnese-Daten zu den Routine-Labor-Ergebnissen die Patientendaten (Name, Geburtsdatum, Adresse) entfernt.

2.1.2. Kontrollgruppe

Die Daten der Kontrollgruppe stammten aus einem Kollektiv von 72 Probanden ohne bekannte Gerinnungsstörung: 46 Frauen im Alter von 12 bis 82 Jahren (Median: 44 Jahre) und 26 Männer zwischen 4 und 77 Jahren (Median: 44 Jahre). Hierbei handelte es sich um Personen, die im Gerinnungslabor des Uniklinikums Gießen untersucht und bei denen weder eine hämorrhagische Diathese noch eine Mutation (Faktor V Leiden / Prothrombin / Methyltetrahydrofolatreduktase Mutationen (MTHFR)) diagnostiziert worden war.

2.2. Patientendaten

2.2.1. Biometrische Daten

Als biometrische Daten dienten Lebensalter (in Jahren) zum Zeitpunkt der Untersuchung und Geschlecht der VWS Typ 1 Patienten.

2.2.2. Blutungsanamnese

Anhand des von den Patienten ausgefüllten Fragebogens (Anhang 1) basierend auf der typischen Symptomatik hämorrhagischer Diathesen zur genauen Blutungsanamnese wurde die Krankengeschichte bezüglich hämorrhagischer bzw. thromboembolischer Ereignisse über den Zeitpunkt der Diagnosestellung hinaus zurückverfolgt.

Der Fragebogen erfasste Auftreten und Schweregrad folgender Symptome: Nasenbluten, Zahnfleischbluten, Blutungen nach Zahnextraktionen, Blutungen nach chirurgischen Eingriffen (speziell Tonsillektomie/Adenoidektomie), Menorrhagien und Blutungen während bzw. nach Entbindung, verlängertes Nachbluten bei kleinen Verletzungen, verstärkte Neigung zur Hämatombildung, Muskel- oder Gelenkblutungen, gastrointestinale Blutungen sowie die Familienanamnese von Verwandten ersten oder zweiten Grades mit diagnostizierter Gerinnungsstörung oder auffälliger nicht diagnostizierter Blutungssymptomatik. Bei pathologischen Blutungsereignissen wurde jeweils die schwerste Episode ausgewertet.

2.2.3. Blutungsscore

Zur Beurteilung der Blutungsanamnese wurden die vorhandenen Daten analysiert. Ein Grenzbereich wurde bestimmt, ab dem ein spezifisches Symptom als trivial einzustufen war. Zu den charakteristischen Symptomen zählten Nasenbluten, verstärkte Neigung zur Hämatombildung, Blutungen nach kleineren Verletzungen, Blutungen in der Mundhöhle, gastrointestinale Blutungen, peripartale Blutungen, Hämarthrosis, Blutungen nach Zahnextraktion, perioperative Blutungen und Menorrhagien. Anschließend wurde die Ausprägung jedes einzelnen Symptoms unter Anwendung eines Blutungsscore-Systems, das orientierend an einer Studie von Rodeghiero aus dem Jahre 2005 erstellt wurde, im Bereich von 0 bis 3 (Tab. 2.1.) festgelegt und entsprechend das schwerste Ereignis jedes Symptoms ausgewertet.

Tabelle 2.1. Blutungsscore:

| Symptom | Auswertung |
|---------------------------------|---|
| Epistaxis | 0 = kein 1 = gehäuft 2 = stark 3 = medizinische Behandlung |
| Hämatome | 0 = keine 1 = Petechien und Ekchymosen 2 = großflächige Hämatome 3 = medizinische Behandlung |
| Blutung n. kleinen Verletzungen | 0 = keine 1 = verlängert 2 = medizinische Behandlung 3 = chirurgische Versorgung/Transfusion |
| Zahnfleischbluten | 0 = kein/ selten 1 = häufig 2 = stark 3 = medizinische Behandlung |
| Blutung n. Zahnextraktion | 0 = keine 1 = Nachblutung 2 = medizinische Behandlung 3 = stationärer Aufenthalt |
| Perioperative Blutungen | 0 = keine 1 = Nachblutung 2 = chirurgische Revision 3 = Transfusion |
| Gastrointestinale Blutungen | 0 = keine 1 = vorkommend 2 = medizinische Behandlung 3 = chirurgische Intervention/ Transfusion |
| Hämarthrosis | 0 = keine 1 = vorkommend 2 = medizinische Behandlung 3 = chirurgische Intervention/ Transfusion |
| Menorrhagie | 0 = keine 1 = vorkommend 2 = medizinische Behandlung (Kürettage/Eisenpräparat) 3 = Transfusion/Hysterektomie |
| Peripartale Blutung | 0 = keine 1 = vorkommend 2 = Transfusion/ Kürettage 3 = Hysterektomie |

Dabei ergab sich aus der Summe der vergebenen Punktwerte bezogen auf die einzelnen Symptome und deren Schweregrad ein Blutungsscore für jeden Patienten, anhand dessen eine Einteilung in vier Gruppen (Blutungsscore 1-4) erfolgen konnte.

Blutungsscore 1: Punktauswertung 0-4

Blutungsscore 2: Punktauswertung 5-8

Blutungsscore 3: Punktauswertung 9-12

Blutungsscore 4: Punktauswertung ≥ 13

2.3. Probengewinnung und –aufbereitung

2.3.1. Blutentnahme

Material:

| | |
|---------------------------|---|
| Venenpunktionsbesteck | Venofix®, B.Braun Melsungen AG, Deutschland |
| Stauschlauch | |
| Einmalhandschuhe | |
| Baumwoll-Zellulose-Tupfer | Hartmann Verbandstoffe, Deutschland |
| Hautdesinfektion | Softasept N®, B.Braun Melsungen AG, Deutschland |
| Monovette | Natriumcitrat / Kalium EDTA |
| Pflaster | Leukosilk S®, Beiersdorf AG, Deutschland |

In der Gerinnungsambulanz wurde die Venenpunktion zur Blutentnahme im Sitzen oder Liegen unter Ruhebedingungen durchgeführt. Nach Anlegen des Stauschlauchs am Oberarm und Desinfektion wurde eine oberflächliche Vene der Cubitalregion, des Unterarms oder der Hand punktiert und das Schlauchsystem des Venenpunktionsbestecks vollständig mit Blut gefüllt. Als Antikoagulanzen für die Blutentnahme-Röhrchen wurde zum einen Natriumcitrat im Verhältnis von 9 Teilen Blut zu einem Teil Citrat und zum anderen Kalium-EDTA verwendet. Nach Beendigung der Blutentnahme für drei Natriumcitrat- und zwei Kalium-EDTA-Monovetten wurde die Punktionsnadel entfernt und die Einstichstelle mit Tupfer und Pflasterstreifen versorgt.

Fehlerquellen:

Bei ungenauer Venenpunktion kann es prinzipiell durch Beimischung von Gewebsflüssigkeit zur Gerinnungsaktivierung durch Gewebethrombokinase oder durch Kollagen und Zellfragmente kommen. Kleinlumige Kanülen, zu starker Sog und Schaumbildung bei der Blutabnahme können ebenfalls die Gerinnung aktivieren und so zu falsch niedrigen Gerinnungsparametern führen (Thomas, 2008). Ferner kann eine zu lange Stauung am Arm die Gerinnung beeinflussen. Eine weitere Fehlerquelle kann das Punktionsbesteck darstellen. Aus unzureichender Vorfüllung des Schlauchsystems kann eine verminderte Füllung des ersten Röhrchens mit Patientenblut resultieren und das richtige Mischungsverhältnis zwischen Citrat und Blut beeinflussen.

Bei sichtbarer Koagulation der Probe kann keine Bestimmung von Gerinnungsparametern erfolgen, da von einer vorzeitigen Aktivierung der Gerinnung auszugehen ist. Eine genaue Beschriftung der Proben vermeidet das Vertauschen von Blutröhrchen.

2.3.2. Herstellung der Plasmaproben

Material:

| | |
|-----------------|---|
| Zentrifuge | Rotina 48RS, Hettich-Zentrifuge, Deutschland |
| Eppendorffcups | Reagenzgefäße-Microtubes, 1,5ml, Sarstedt, Deutschland |
| Pipetten | Eppendorff Reference 100µl, Deutschland Eppendorff Reference 1000µl, Deutschland |
| Pipettenspitzen | 100µl, Starlab, Deutschland 1000µl, Starlab, Deutschland |

Reagenzglashalter

Eine Natriumcitrat-Monovette wurde nach der Entnahme bei 4000 Umdrehungen (U) für 40 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert. Es wurden 500µl für die Bestimmung der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität und 150µl für die VWF-Antigen-Bestimmung bei -80°C eingefroren.

2.4. Testverfahren der Gerinnungsparameter

Die Bestimmung der Gerinnungsparameter für alle Patienten der Gerinnungsambulanz erfolgte im Gerinnungslabor des Universitätsklinikums Gießen ausschließlich der

Thrombozytenzahl, die im hämatologischen Labor ermittelt wurde. Im Thrombozytenfunktionslabor wurden die VWF-Werte (Ristocetin-Cofaktor-Aktivität und VWF-Antigen) bestimmt, sowie die DNA-Isolation durchgeführt. Die PCR erfolgte im PCR-Labor der Blutbank.

2.4.1. Thrombozytenzahl

Die Zählung erfolgte aus EDTA-antikoaguliertem Blut mittels durchflusszytometrischem Messverfahren, der Variationskoeffizient der automatisierten Zählung lag bei < 3%.

Die Standardisierung der Konzentrationsbestimmung der Thrombozyten ist durch die DIN 58932-5 geregelt. Der Referenzbereich liegt bei 150-300 Giga/l.

2.4.2. Aktivierte Partielle Thromboplastinzeit

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) wurde mit dem Pathrombin SL® Test der Firma Dade Behring Marburg GmbH im BCS-Gerät (Behring-Coagulation-Systems) und im Wasserbad von Hand bestimmt. Diese Methode ist ein Suchtest auf Gerinnungsstörungen des endogenen Systems und umfasst die Faktoren V, VIII, IX, sowie Fibrinogen und die Kontaktfaktoren. Die Inkubation von Citratplasma mit der optimalen Menge an gerinnungsaktiven Phospholipiden (partielle Thromboplastine) und einem Oberflächenaktivator (z.B. Kollagen, Basalmembran) führt zur Aktivierung dieser Faktoren. Durch Zugabe von Kalzium-Ionen wird der Gerinnungsvorgang ausgelöst und die Zeit bis zur Gerinnselbildung gemessen. Das Ergebnis wird in Sekunden angegeben. Der Normbereich liegt bei 26-36 Sekunden.

2.4.3. Thromboplastinzeit

Zur Bestimmung der Thromboplastinzeit (TPZ) nach Quick wurde der Thromborel® S Test der Firma Dade Behring Marburg GmbH im BCS-Gerät durchgeführt. Dieser Test stellt eine empfindliche Screeningmethode auf Störungen im Bereich des exogenen Systems (Faktor II, V, VII, X) und des Fibrinogens dar.

Durch Inkubation von Citratplasma mit der optimalen Menge von Gewebethromboplastin und Kalzium wird der Gerinnungsvorgang ausgelöst. Aus Prothrombin wird Thrombin, welches Fibrinogen in Fibrin umwandelt. Die Zeit bis zur Bildung des Fibringerinnsels wird in Sekunden gemessen und in Prozent Gerinnungsaktivität angegeben. Der Referenzbereich liegt bei 70-130% der Norm.

2.4.4. Fibrinogen

Die quantitative Bestimmung von Fibrinogen erfolgte mit dem Multifibren® U Test der Firma Dade Behring Marburg GmbH. Dieser Test stellt eine Modifikation der Methode nach Clauss (Schnellmethode) dar. Dabei wird Citratplasma mit einem großen Überschuss an Thrombin zur Gerinnung gebracht. Die Gerinnungszeit hängt dabei weitgehend vom Fibrinogengehalt der Probe ab und verhält sich bezüglich diesem proportional. Der Normbereich liegt bei 1,77-4,00 g/l.

2.4.5. Faktor VIII-Aktivität

Bei der Bestimmung der FVIII-Aktivität handelte es sich um eine koagulometrische Methode mittels Gerinnungsfaktor VIII-Mangelplasma der Firma Siemens Healthcare Diagnostics. Das Prinzip der Methode beinhaltet, dass der Mangel an einem der Faktoren des intrinsischen Gerinnungssystems zu einer verlängerten partiellen Thromboplastinzeit führt. Zur Bestimmung des FVIII wird die aPTT einer Mischung des entsprechenden Mangelplasmas mit dem Patientenplasma gemessen. Ein Patientenplasma, dem FVIII fehlt, ist nicht in der Lage, die Abwesenheit des Faktors im Mangelplasma auszugleichen, woraus eine Veränderung der aPTT resultiert. Die FVIII-Aktivität in % der Norm wird über eine Bezugskurve ermittelt, die mit der Verdünnung von Standard-Human-Plasma oder einem Normalplasma-Pool in Mischung mit dem entsprechenden Mangelplasma erstellt wird. Der Referenzbereich liegt bei 50- 150% der Norm.

2.4.6. Ristocetin-Cofaktor-Aktivität

Zur Bestimmung der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität wurde das von-Willebrand-Reagenz der Behringwerke AG, Marburg, BRD verwendet. Es enthält stabilisierte Human-Plättchen, Ristocetin und EDTA (Endkonzentration 1g/l) in lyophilisierter Form.

Zur Vorbereitung wurde das Reagenz mit 50µl Ristocetin A (10mg/ml) S 04 von der Firma Paesel + Lorei GmbH & Co, Duisburg, BRD resuspendiert.

Für die angewandte Aggregometer-Methode wurde das Windows-Programm Aggro/Link von Willebrand-Cofactor Essay verwendet.

Die Bezugskurve wurde mit Standard-Human-Plasma der Firma Dade Behring, Marburg, BRD erstellt.

Das Plasma wurde unverdünnt (100% der Norm) und in verdünnter Form 1:2 (50%), 1:4 (25%), 1:8 (12,5%), 1:16 (6,3%) und 1:32 (3,1%) eingesetzt. Zur Verdünnung

wurde isotonische Kochsalzlösung verwendet. Der deklarierte Gehalt an Ristocetin-Cofaktor wurde berücksichtigt. In einer einfach logarithmischen Auftragung wurde die maximale Transmissionsänderung pro Minute gegen den Logarithmus des Gehalts in Prozent der Norm aufgetragen und durch die Messpunkte eine Ausgleichsgerade gelegt. Die Plättchen wurden in Form einer Suspension 1:8 verdünnt, eingesetzt. Für den Probenansatz wurden 350µl dieser Plättchen-Suspension verwendet. Der Gehalt an Ristocetin-Cofaktor der Probe in Prozent der Norm wurde an der Bezugskurve abgelesen. Der Referenzbereich liegt bei 50-150%.

2.4.7. VWF-Antigen

Zur quantitativen Bestimmung des von Willebrand-Faktors wurde Asserachrom R der Firma Diagnostica Stago, Roche verwendet. Es handelt sich dabei um ein Enzym-Immunesay nach dem Testprinzip der Sandwich-Methode. Die Mikrotitrationsstreifen sind mit F (ab²)² beschichtet, als Antikörper-POD-Konjugat enthält das Reagenz Anti-VWF-Peroxidase, als Substrat o-Phenylendiamin, als Peroxid Harnstoffperoxid, als Pufferkonzentrat Albumin und Phosphatpuffer, und als Waschlösungskonzentrat Natriumchlorid. Als Probenmaterial wurde Citratplasma eingesetzt.

Nach der Testdurchführung entsprechend der Werksangaben wurde die Extinktion bei 492 nm gemessen und auf doppelt logarithmischem Netzpapier gegen den in Prozent angegebenen VWF aufgetragen. Der Referenzbereich liegt bei 50-160% der Norm.

2.5. DNA-Isolation

Material:

Puregene DNA-Isolations-Kit der Firma Gentra Systems:

| | |
|--------------------------------|--|
| RBC Lysis Solution | Artikel-Nr.: D – 5001 |
| Cell Lysis zur Lyse | Artikel-Nr.: D – 5002 |
| RNase A Solution (4mg/ml) | Artikel-Nr.: D – 5006 |
| Protein Precipitation Solution | Artikel-Nr.: D – 5003 |
| Isopropanol (100%) | |
| Ethanol (70%) | |
| DNA Hydration Solution | Artikel-Nr.: D – 5004 |
| Reaktionsgefäß | Multi-R, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, BRD |
| Zentrifuge | Biofuge pico, Heraeus |
| Rüttler | Heidolph Reax 2000, Deutschland |

| | |
|-----------------|---|
| Wasserbad | JulaboR5, Deutschland |
| Multipette | Eppendorff Multipette®plus, Deutschland |
| Combitip | Eppendorff Combitips®plus, Deutschland |
| Pipettenspitzen | 1000µl, Starlab, Deutschland |
| | 100µl, Starlab, Deutschland |

Für die DNA-Isolation aus Vollblut wurde der Puregene DNA-Isolations-Kit der Firma Gentra Systems verwendet. Zur Zell-Lyse wurden 300µl EDTA-Vollblut in ein 1,7ml RNase-/DNase-freies Multi-R-Reaktionsgefäß gefüllt. Dazu wurden 900µl der RBC Lysis Solution (zur Lyse der Erythrozyten) pipettiert. Das Reaktionsgefäß wurde über Kopf geschwenkt und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert. Während der Inkubation wurde es erneut geschwenkt. Anschließend wurde die Probe bei 13000 Umdrehungen (U) 20 Sekunden lang zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 10-20µl abpipettiert. Das Reaktionsgefäß wurde auf einem automatischen Rüttler ca. 1 Minute lang geschüttelt bis sich das Pellet im Restüberstand gut löste. Danach wurden 300µl Cell Lysis Solution (zur Lyse kernhaltiger Blutzellen) hinzu gegeben. Eine Inkubation bei 37°C in einem Wasserbad von ca. 15 Minuten wurde dazwischen geschaltet bis die Lösung homogen war.

Für die RNase-Behandlung wurden zu dem Zell-Lysat 1,5µl RNase A Solution gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde 25 mal geschwenkt und bei 37°C 15 Minuten lang erneut inkubiert.

Zur Proteinfällung wurde das Reaktionsgefäß 5-10 Minuten auf Raumtemperatur gekühlt und im Anschluss 100µl Protein Precipitation Solution hinzu pipettiert. Die Probe wurde ca. eine Minute auf dem automatischen Rüttler gemischt und dann bei 13000 U 3 Minuten lang zentrifugiert. Die gefällten Proteine ergaben ein dunkelbraunes Pellet.

Zur DNA-Fällung wurde der DNA-haltige Überstand in ein neues 1,7ml Multi-R-Reaktionsgefäß pipettiert, 300µl Isopropanol (100%) dazu gegeben und 50mal geschwenkt. Nach einer Minute zentrifugieren bei 13000 U wurde ein weißes Pellet sichtbar. Der Überstand wurde abgegossen, 300µl Ethanol (70%) zu dem Pellet pipettiert und geschwenkt. Bei 13000 U wurde eine Minute lang zentrifugiert und anschließend das Ethanol (70%) abpipettiert. Das verbleibende Pellet wurde 15 Minuten lang bei Raumtemperatur getrocknet.

Die DNA wurde rehydriert, indem zu dem ausgewaschenen Pellet 100µl DNA Hydration Solution pipettiert wurden. Über Nacht erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur. Gelagert wurden die isolierten DNA-Proben bei -20°C bis -80°C.

Fehlerquellen:

Mögliche Fehlerquellen bei der DNA-Isolierung sind die Kontamination des Verbrauchsmaterials und des Arbeitsplatzes. Um die Kontamination der Reagenzien zu verhindern, erfolgt jeder Vorgang mit einer frischen Pipettenspitze. Ferner werden bei jedem Arbeitsvorgang die Handschuhe gewechselt und eine sterile Sicherstellung der Arbeitsflächen mit Ethanol gewährleistet. Nach der Proteinfällung werden Pipettenspitzen mit Filter verwendet, damit die Pipetten beim Pipettiervorgang nicht kontaminiert werden und somit keine Übertragung von DNA auf eine andere Probe erfolgt. Darüber hinaus werden stets neue und sterilisierte Reaktionsgefäße und Lösungen benutzt. Um Verwechslungen zu vermeiden wird jedes einzelne Reaktionsgefäß genau beschriftet.

2.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Material:

Puffer: 10 x PCR Buffer von Applied Biosystems, hergestellt von der Firma Roche
enthält 10mM MgCl₂ D 09868

Standard dNTP-Mix (Konzentration 10mM) der Firma Peqlab

ultrareine (2`Desoxynukleotid 5`Triphosphate) dATP, dCTP, dGTP, dTTP Lot 03273

Human Growth Hormon (HGH) I: 100µM HGH I von MWG-Biotech

AG5` - CAG TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A – 3` 331533-4/7

Human Growth Hormon (HGH) II: 100µM HGH II von MWG-Biotech AG

5` - ATC CAC TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C – 3` 01-2379-1/2

GP Ia Primer:

GP Ia 92 V (vorwärts) von MWG-Biotech AG / 100µM / 92V

5` - GAC AGC CCA TTA ATA AAT GTC TCC TCT G – 3` 33-1533-1/7

GP Ia 96 R (rückwärts) (C) von MWG-Biotech AG / 100µM / 96 R (C)

5` - CCT TGC ATA TTG AAT TGC TAC G – 3` 33-1533-2/7

GP Ia 97 R (rückwärts) (T) von MWG-Biotech AG / 100µM / 96 R (T)

5` - CCT TGC ATA TTG AAT TGC TAC A – 3` 33-1533-3/7

Ampli Taq Gold™ 250 Units (5U/µl) von Applied Biosystems,

hergestellt von der Firma Roche

D 11553

| | |
|--------------------------------|---|
| peqGold-Standard | 100bp DNA Ladder 500µl/ml, PeqLab |
| Tube-Strips | pyrogene-frei 0,2ml mit 8 Kappen, Biozym Diagnostik GmbH |
| PCR-Maschine | Hybaid PCR Express |
| Multipette | Eppendorff Multipette®plus, Deutschland |
| Combitip | Eppendorff Combitips®plus, Deutschland |
| Micropipette | Eppendorff, Deutschland |
| Pipettenspitzen | 1000µl, Starlab, Deutschland 100µl, Starlab, Deutschland 10µl, Starlab, Deutschland |
| Saccharose (40%) | |
| Bromphenolblau (0,25%) | |
| Aqua dest | |
| Puffer | (54g Tris, 27,5g Borsäure, 20ml EDTA 0,5M pH8) |
| Agarose | Gibco, BRL |
| Ethidiumbromid | Invitrogen |
| Einfachschlitten mit 10er Kamm | |

Um die Allelfrequenz für C und T zu entschlüsseln, wurden pro Patient folgende Menge des PCR-Ansatzes benötigt:

| Jeweils für C: | | 5µl | und für T: | | 5µl |
|---------------------|-------|--------|---------------------|-------|--------|
| Puffer | | | Puffer | | |
| dNTP (1,25µM) | | 5µl | dNTP (1,25µM) | | 5µl |
| HGH I (1,25µM) | | 5µl | HGH I (1,25µM) | | 5µl |
| HGH II (1,25µM) | | 5µl | HGH II (1,25µM) | | 5µl |
| GP Ia 92V (5µM) | 2,5µl | | GP Ia 92V (5µM) | 2,5µl | |
| GP Ia 97R (C) (5µM) | 2,5µl | | GP Ia 97R (T) (5µM) | 2,5µl | |
| Taq | | 0,5µl | Taq | | 0,5µl |
| H2O | | 23,5µl | H2O | | 23,5µl |
| DNA | | 1µl | DNA | | 1µl |

Die PCR wurde in RNase-, DNase- und pyrogene-freien Tube-Strips 0,2ml mit 8 Kappen für je 4 DNA-Proben (C und T) in der PCR-Maschine: Hybaid PCR Express angesetzt.

2.6.1. PCR-Programm

Der Vorlauf wurde mit 96°C für 10 Minuten angesetzt. Die Amplifikation fand in Zyklen mit Reaktionsschritten bei unterschiedlichen Temperaturen folgendermaßen statt: In 34 Temperaturzyklen folgten jeweils die Denaturierungstemperatur mit 93°C für 50 Sekunden, bei der die Doppelstrang-DNA zu Einzelstrang-DNA dissoziierte, das sogenannte Annealing bei niedriger Temperatur von 57°C für 30 Sekunden, wobei die Oligonukleotid-Primer an die Ziel-DNA hybridisierten und die Polymerisationstemperatur mit 72°C für 30 Sekunden, bei der die DNA-Synthese durch die Polymerase erfolgte. Nach dem Nachlauf bei 72°C für 7 Minuten wurde das PCR-Produkt auf 4°C bis 10°C herunter gekühlt.

2.6.2. Aufbereitung des PCR-Produkts

Der für die Gelelektrophorese benötigte Loading Buffer bestehend aus Saccharose (40%), 25mg Bromphenolblau (0,25%) und 9ml Aqua dest wurde in 900µl Portionen bei -20°C aufbewahrt und nach dem Auftauen mit 100µl 0,5M EDTA (pH 8) versetzt.

Als Längenstandard für die Größenbestimmung im Bereich von 80 bis 1000 Basenpaaren wurde der peqGold-Standard mit 100bp DNA Ladder 500µl/ml verwendet. Für die Standardbande wurden pro Gel zu 1µl des 100bp-Standard je 2µl Loading Buffer und 7µl H₂O pipettiert. Je 8µl PCR-Produkt wurden mit 2µl Loading Buffer aufbereitet.

2.6.3. Gelelektrophorese

2.6.3.1. Herstellung eines 1%igen Gels

Für ein 1%-iges Gel wurde 250mg Agarose (Gibco BRL) mit 25ml 0,5 x TBE Puffer (54g Tris, 27,5g Borsäure, 20ml EDTA 0,5M pH8) in einen Erlenmeyerkolben gegeben und für ca. 5 Minuten unter mehrmaligem Schwenken in der Mikrowelle erhitzt bis die Agarose vollständig gelöst und eine homogene Flüssigkeit entstanden war. Nachdem die Agarose auf ca. 60°C abgekühlt war, wurde als Fluoreszenzmarker zur Gelelektrophorese 2,5µl Ethidiumbromid dazugegeben. Die noch flüssige Agarose wurde zum Aushärten in einen zuvor abgeklebten Einfachschlitten mit eingestecktem 10er Kamm gegossen und für 20-30 Minuten bei Zimmertemperatur ruhen gelassen.

2.6.3.2. Darstellung des PCR-Produkts

Als Laufmedium für die Gelelektrophorese wurde 0,5 x TBE Laufpuffer verwendet, mit dem das Gel in der Agarosekammer überflutet wurde. In das 1%ige Agarose-Gel wurden jeweils der Standard und die aufbereiteten PCR-Produkte in die durch den Kamm entstandenen Schlitze pipettiert. Die Gelelektrophorese lief bei 120V für 20-25 Minuten. Anschließend wurde das mit Ethidiumbromid gefärbte Gel unter ultraviolettem Licht visualisiert.

Fehlerquellen:

Der große Vorteil der PCR ist ihre extreme Empfindlichkeit (theoretisch genügt ein DNA-Molekül), die aber gleichzeitig zu Risiken der Kontamination mit bereits amplifizierten DNA-Abschnitten führt (Thomas, 2008). Falsch-positive Testergebnisse können Folge dieser Kontaminationen sein, die entweder das biologische Material, das Verbrauchsmaterial oder den Arbeitsplatz betreffen. Beim Pipettieren können durch übertragene Aerosole aus dem Pipettenschaft oder aus der Raumluft kleinste Verunreinigungen entstehen. Diese Aerosole können die mögliche Kontamination mit anderen DNA-Molekülen verursachen. Um beim Pipettiervorgang die Kontamination der Pipetten und somit die Übertragung von DNA-Bereichen auf eine andere Probe zu vermeiden, werden Pipettenspitzen mit Filter verwendet. Damit die Kontamination der Reagenzien sowie der PCR Ansätze verhindert werden, erfolgt jeder Vorgang mit einer frischen Pipettenspitze. Ferner werden bei jedem Arbeitsvorgang die Handschuhe gewechselt und eine sterile Sicherstellung der Arbeitsflächen mit Ethanol gewährleistet. Ebenso erfolgt die Trennung von Prä- und Post-PCR-Arbeitsplatz. Im Prä-PCR-Bereich erfolgt die Probenaufbereitung und der PCR-Ansatz unter einem Abzug. Im Post-PCR-Bereich findet die Amplifikation und Detektion der PCR-Produkte statt. Darüber hinaus werden stets neue und sterilisierte Reaktionsgefäße und Lösungen benutzt.

2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse wurde von der Moredata GmbH, Geschäftsführer: Dipl. Math. Martin Mogk und Dipl. Math. Jörg Reitze, Kerkrader Straße 11, 35394 Gießen unter Beratung von Herrn Reitze vorgenommen. Für die statistische Analyse wurde das Programmpaket SPSS© 12.0 verwendet.

2.7.1. Deskriptive Statistik

Für die Charakterisierung der Daten und für den Vergleich einzelner Datengruppen bezüglich ihrer Lage und Streuung wurden Median, Minimum, Maximum, Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler als Maßzahlen verwendet.

Der Median einer Anzahl von Werten ist die Zahl, die in der Mitte aller beobachteten, nach Größe sortierten Werte liegt. Er teilt eine Stichprobe in zwei Hälften gleicher Größe und entspricht bei ungerader Anzahl der Werte dem mittleren Wert, bei gerader Anzahl der Werte dem Mittelwert der beiden mittleren Werte. Im Vergleich zum Mittelwert stellt sich der Median gegenüber extrem abweichenden Werten als robuster dar.

Als Minimum wird der niedrigste, als Maximum der höchste Wert in einer Stichprobe bezeichnet.

Der Mittelwert beschreibt den statistischen Durchschnittswert und ist als Quotient aus der Summe aller beobachteter Werte und der Anzahl der Werte definiert.

Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streubreite der Werte eines Merkmals rund um dessen Mittelwert. Das bedeutet, die Standardabweichung ist die durchschnittliche Entfernung aller gemessenen Ausprägungen eines Merkmals vom Durchschnitt.

Der Standardfehler bezeichnet die Streuung einer Stichprobenkennwertverteilung und informiert über variable Stichprobenkennwerte (z. B. Mittelwerte) von Stichproben aus einer Population bei einem gegebenen Stichprobenumfang (Reitze, 2013).

2.7.2. Statistische Methodik

Zum Überprüfen von wissenschaftlichen Vermutungen werden statistische Hypothesen aufgestellt. Sie sind bei Gruppenvergleichen meist so formuliert, dass das Ziel des Anwenders das Ablehnen der Hypothese ist. Als Signifikanzniveau (Fehler 1. Art, Fehlerwahrscheinlichkeit oder p-Wert) wird diejenige Wahrscheinlichkeit bezeichnet, mit der man irrtümlich eine richtige Hypothese ablehnt. Will man einen geringen Fehler beim Ablehnen der Hypothese machen, so sollte diese Wahrscheinlichkeit klein sein,

übliche Schranken sind $\alpha=0,05$ und $\alpha=0,01$. In dieser Arbeit wurde mit dem Signifikanzniveau von 5% gearbeitet (Reitze, 2013).

Zur Festlegung der Unabhängigkeit untersuchter Faktoren wird folgender Test durchgeführt. In einer vorliegenden Kontingenztafel mit ordinalen oder nominalen Zeilen- und Spaltenmerkmal ist für den Anwender die Frage von Interesse, ob die Ausprägung des einen Merkmals die Ausprägung des anderen Merkmals beeinflusst bzw. bestimmt. Bei genügend großer Zellbelegung wird die Hypothese der Unabhängigkeit der beiden Merkmale mit einem Chi²-Test getestet. Wird die Nullhypothese abgelehnt ($p \leq 0,05$), so kann von einer Abhängigkeit der beiden Parameter ausgegangen werden. Wird die Nullhypothese nicht abgelehnt ($p > 0,05$), so gibt es keinen Hinweis auf eine Abhängigkeit der beiden betrachteten Parameter (Reitze, 2013).

Mittels der Varianzanalyse wird überprüft, in wieweit statistisch signifikante Unterschiede zwischen den durchschnittlichen Wirkungen der Faktoren auf eine abhängige Variable vorhanden sind. Es handelt sich also um einen Mittelwerttest für mehrere Stichproben. Es wird davon ausgegangen, dass andere Einflüsse als die kontrollierten Faktoren keinen systematischen Einfluss haben. Die Bezeichnung Varianzanalyse stammt daher, dass bei diesem Verfahren die Varianz der zusammengefasst betrachteten Gruppen in Beziehung zur Varianz innerhalb der einzelnen Gruppen gesetzt wird (Reitze, 2013).

3. ERGEBNISSE

3.1. Alters- und Geschlechtsverteilung

Die Altersverteilung der 73 Patienten mit VWS Typ 1 reichte von 12 bis 83 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 41,3 Jahren. Bei den 49 weiblichen Patienten ließ sich ein Durchschnittsalter von 41,8 und bei den 24 männlichen von 40,3 Jahren errechnen (vgl. Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1.

| Geschlecht | Median (Jahre) | Minimum (Jahre) | Maximum (Jahre) | Mittelwert (Jahre) | Standard- abweichung | Standard- fehler |
|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------|
| W (N=49) | 41 | 13 | 74 | 41,8 | 15,6 | 2,2 |
| M (N=24) | 36 | 12 | 83 | 40,3 | 20,7 | 4,2 |
| Gesamt (N=73) | 39 | 12 | 83 | 41,3 | 17,3 | 2,0 |

Tabelle 3.1: Altersverteilung aller Patienten mit VWS Typ 1. Zum Vergleich wurden weibliche und männliche Patienten separat aufgeführt.

3.2. Klinisch erhobene Befunde

3.2.1. Häufigkeit der Blutungssymptome

Das Leitsymptom des VWS ist die verlängerte Schleimhautblutung (Rodeghiero et al, 2001), die als Blutung bei Zahnwechsel, nach Tonsillektomie, Adenoidektomie und Zahnextraktion auftritt. Speziell bei diesen Operationen im Schleimhautbereich können Personen mit zuvor nicht bekannter Blutungsneigung plötzlich auffällig werden. Bei Frauen können zusätzlich gehäuft Menorrhagien und peripartale Blutungen auftreten. Gastrointestinale- und Gelenk-Blutungen sind typisch für die schwere Form des VWS und damit beim VWS Typ 1 eher selten. Anhand der ausgewerteten Daten der Patienten mit VWS Typ 1 wurde folgendes Verteilungsmuster der Blutungssymptomatik (Abb. 3.1.) erstellt:

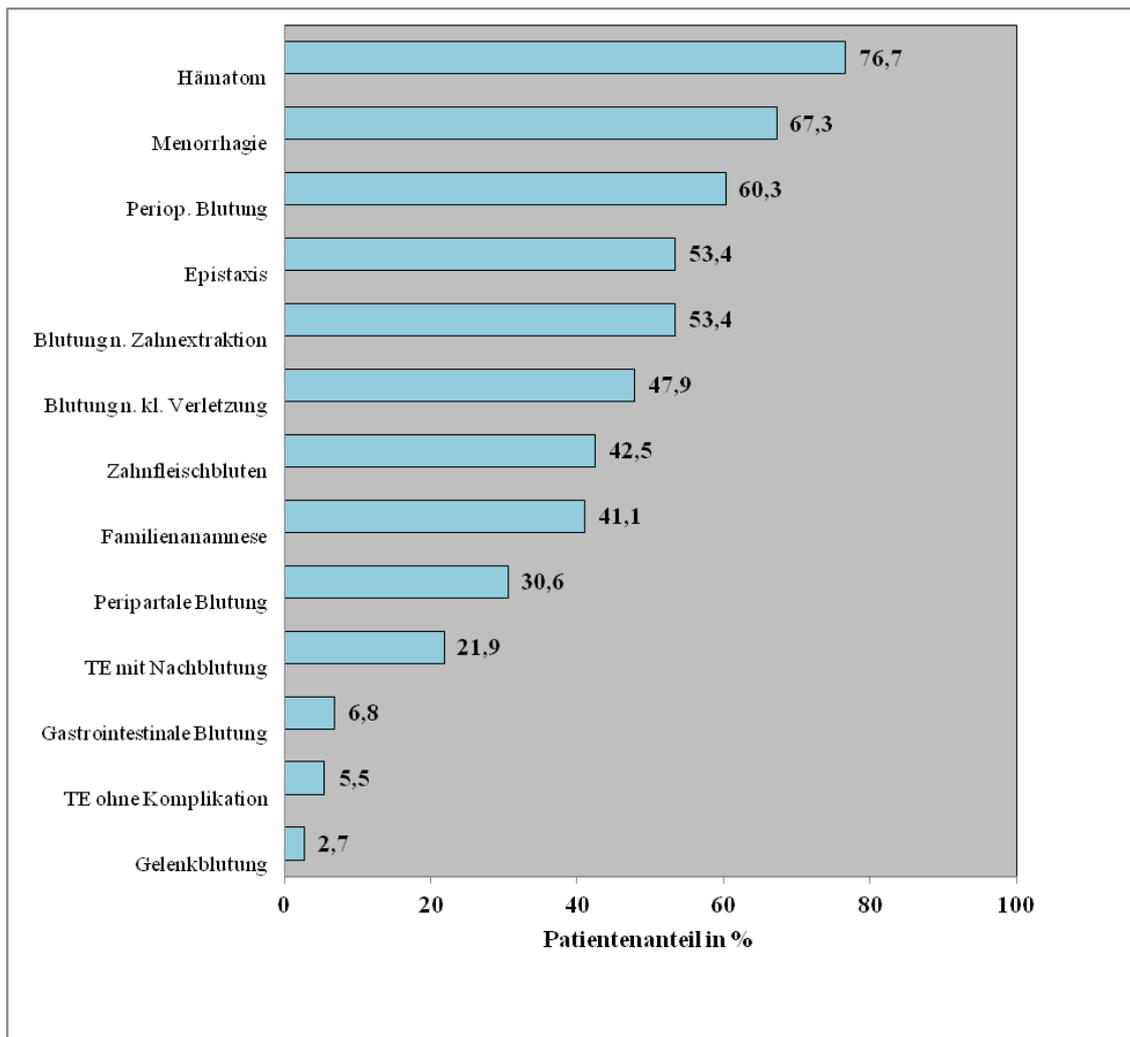


Abbildung 3.1.: Die Darstellung bietet eine Übersicht zur Blutungssymptomatik bei allen VWS Typ 1 Patienten. Sie zeigt, bei welchem Anteil der Patienten in Prozent die einzelnen Symptome auftraten.

Die Familienanamnese war bei 30 der 73 Patienten mit VWS Typ 1 positiv, das bedeutet, dass bei 41,1% bei Verwandten ersten oder zweiten Grades weitere Fälle des VWS diagnostiziert worden waren bzw. eine auffällige Blutungsneigung mit ungeklärter Ursache bestand.

Bei 20 Patienten war bereits eine Tonsillektomie durchgeführt worden, die bei 80% mit starker Blutung bzw. Nachblutung verbunden war.

3.2.2. Blutungsscore

Durch exakte Auswertung der Blutungsanamnese konnte anhand eines Blutungsscore-Systems das Krankheitsbild jedes einzelnen Patienten mit VWS Typ 1 einem Schweregrad (1-4) zugeteilt werden. Bei fast allen Patienten war der Blutungstyp mit sowohl petechialen als auch großflächigen unscharf begrenzten Blutungen, wie bei kombinierten Hämostasestörungen typisch, nachzuweisen.

3.2.3. Verteilung nach Blutungsscore

Nach der Auswertung der Blutungssymptomatik konnten 19 Patienten dem Blutungsscore 1 zugeordnet werden. Die dabei auftretenden Blutungssymptome waren überwiegend petechiale Blutungen, auch in die Mundschleimhaut, häufiges Zahnfleisch- und Nasenbluten, verstärkte Neigung zu Hämatombildung, längeres Nachbluten nach kleineren Verletzungen und bei den weiblichen Patienten Menorrhagien. Zum Blutungsscore 2 konnte der Großteil, nämlich 36 Patienten gezählt werden. Bei diesen Patienten waren, zusätzlich zu den oben genannten Beschwerden, die hier aber mit höherer Intensität (v.a. Nasenbluten und Hämatom-Neigung) auftraten, verstärkte Blutungen während bzw. nach operativen Eingriffen (z.B. Tonsillektomie) und Zahnextraktionen sehr häufig.

Blutungsscore 3 wurden 14 Patienten zugeordnet. Operative Eingriffe mit starken Blutungen bzw. Nachblutungen, welche die Behandlung erschwerten, die Behandlungsdauer verlängerten, Bluttransfusionen erforderlich machten oder nur durch eine erneute chirurgische Intervention therapiert werden konnten sowie peripartale Blutungsereignisse begründeten bei diesen Patienten häufig die Schwere der Symptomatik.

Blutungsscore 4 wurde bei 4 Patienten festgestellt, bei denen zusätzlich zu dem genannten Symptomenkomplex auch Gelenkblutungen oder schwere gastrointestinale Blutungen auftraten.

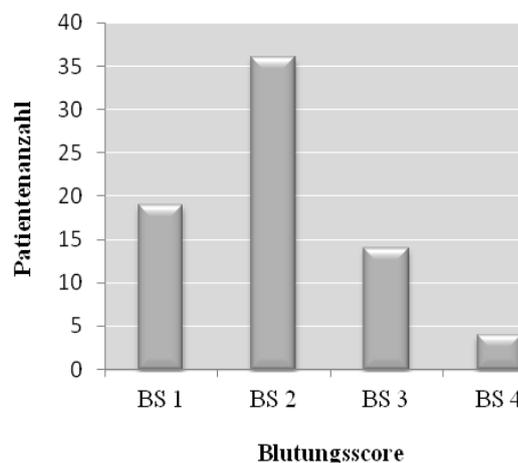


Abbildung 3.2.: Verteilung der Patienten mit VWS Typ 1 nach Blutungsscore.

3.2.4. Blutungssymptomatik in Bezug auf Lebensalter und Geschlecht

Die Korrelation zwischen Ausprägung der Blutungsneigung und Lebensalter wurde geprüft. Ferner wurde die Verteilung des Schweregrads der Blutungssymptomatik bei den weiblichen im Vergleich zu den männlichen Patienten ermittelt. Von den Patienten, mit Blutungsscore 1 waren 11 weiblichen und 8 männlichen Geschlechts und es ergab sich insgesamt ein Durchschnittsalter von 32,0 Jahren. Die zu Blutungsscore 2 zählenden Patienten wiesen ein Durchschnittsalter von 43,1 Jahren auf; von ihnen waren 25 weiblich und 11 männlich. Bei den Patienten mit Blutungsscore 3 waren 10 weiblich und 4 männlich und das Durchschnittsalter beider Geschlechter zusammen belief sich auf 43,8 Jahre. Blutungsscore 4 war durch 3 weibliche und einen männlichen Patienten vertreten, mit dem Durchschnittsalter von 61,0 Jahren.

Tabelle 3.2.

| Bltg.-Score | Median (Jahre) | Minimum (Jahre) | Maximum (Jahre) | Mittelwert (Jahre) | Standard- abweichung | Standard- fehler |
|-------------|-------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------|
| 1 (n=19) | 34 | 13 | 49 | 32,0 | 12,1 | 2,8 |
| 2 (n=36) | 38 | 16 | 77 | 43,1 | 17,3 | 2,9 |
| 3 (n=14) | 40 | 12 | 83 | 43,8 | 19,1 | 5,1 |
| 4 (n=4) | 60,5 | 49 | 74 | 61,0 | 11,2 | 5,6 |

Tabelle 3.2.: Altersverteilung (Median, Minimum, Maximum, Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler) in Zusammenhang mit der klinischen Blutungsneigung bei allen Patienten mit VWS Typ 1. Die Verteilung nach Blutungsscore 1-4 wurde zum Vergleich separat dargestellt.

Tabelle 3.3.

| Bltg.-Score | Median (Jahre) | Minimum (Jahre) | Maximum (Jahre) | Mittelwert (Jahre) | Standard- abweichung | Standard- fehler |
|-------------|-------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------|
| 1 (n=11) | 30 | 13 | 49 | 31,7 | 14,1 | 4,3 |
| 2 (n=25) | 39 | 22 | 71 | 42,4 | 15,2 | 3,0 |
| 3 (n=10) | 44 | 29 | 63 | 43,1 | 13,1 | 4,1 |
| 4 (n=3) | 55 | 49 | 74 | 59,3 | 13,1 | 7,5 |

Tabelle 3.3.: Altersverteilung (Median, Minimum, Maximum, Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler) nach Schweregraden der klinischen Blutungsneigung bei den weiblichen Patienten.

Tabelle 3.4.

| Bltg.-Score | Median (Jahre) | Minimum (Jahre) | Maximum (Jahre) | Mittelwert (Jahre) | Standard- abweichung | Standard- fehler |
|-------------|-------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------|
| 1 (n=8) | 35 | 21 | 43 | 32,3 | 9,5 | 3,4 |
| 2 (n=11) | 37 | 16 | 77 | 44,6 | 22,1 | 6,7 |
| 3 (n=4) | 28,5 | 12 | 83 | 38 | 31,6 | 15,8 |
| 4 (n=1) | 66 | 66 | 66 | 66 | - | - |

Tabelle 3.4.: Altersverteilung (Median, Minimum, Maximum, Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler) nach Schweregraden der klinischen Blutungsneigung bei den männlichen Patienten, wobei Blutungsscore 4 (n=1) keinen statistischen Aussagewert darstellt.

Eine zweifaktorielle Varianzanalyse bezüglich des Alters in den Faktoren klinischen Blutungsneigung (BS 1-4) und Geschlecht ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern ($p=0,635$).

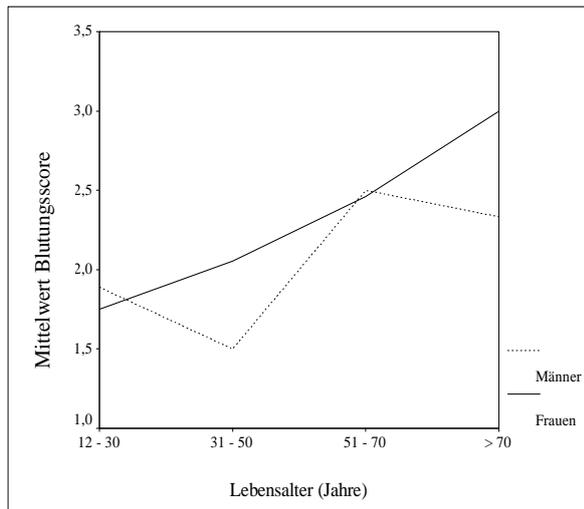


Abbildung 3.3.: Verteilung der Mittelwerte der Blutungsscores nach Altersgruppen von weiblichen und männlichen Patienten.

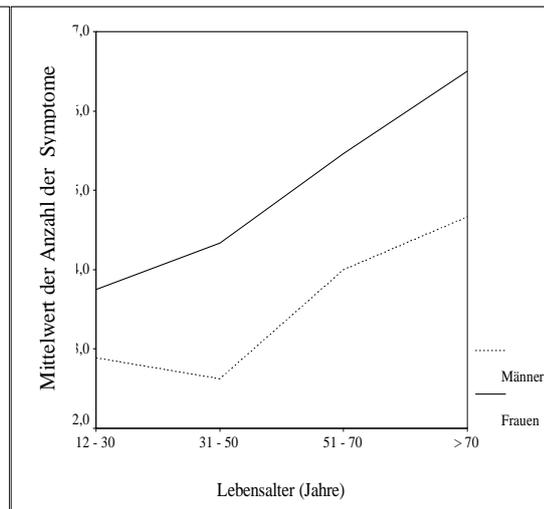


Abbildung 3.4.: Mittelwerte der Anzahl der Blutungssymptome nach Altersgruppen von weiblichen und männlichen Patienten.

3.3. Gerinnungsparameter

Die Diagnostik bezüglich einer hämorrhagischen Diathese beinhaltet eine orientierende laboranalytische Untersuchung, die in der Regel Thrombozytenzahl sowie ein komplettes Blutbild, aPTT, TPZ und optional die Fibrinogenbestimmung umfasst. Mit diesen Tests kann ein VWS weder diagnostiziert, noch ausgeschlossen werden, aber abnorme Werte können einen Hinweis auf anderer Hämostasestörungen wie Gerinnungsfaktormangel oder Thrombozytopenie als mögliche Ursache der klinischen Blutungsneigung bieten.

Folgende Gerinnungsparameter wurden bei den Patienten mit VWS Typ 1 analysiert. In den Tabellen wurde jeweils der Median-Wert (mit Minimum und Maximum) aufgeführt und zusätzlich der Mittelwert mit Standardabweichung und Standardfehler angegeben. Die einzelnen Werte der 73 Patienten wurden in der jeweiligen Abbildung dargestellt.

3.3.1. Thrombozytenzahl

Die Werte der Thrombozytenzahlen der Patienten mit VWS Typ 1 lagen bis auf zwei Werte, von denen einer im Sinne einer mutmaßlich reaktiven Thrombozytose stark erhöht und der andere vermindert war, im Normbereich von 150 bis 400 Giga/l.

Tabelle 3.5.

| Geschlecht | Median Giga/l | Minimum Giga/l | Maximum Giga/l | Mittelwert Giga/l | Standard- abweichung | Standard- fehler |
|------------------|------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|
| W (N=49) | 249 | 56 | 432 | 242,2 | 56,7 | 8,1 |
| M (N=24) | 231 | 180 | 950 | 284,3 | 156,1 | 31,9 |
| Gesamt (N=73) | 242 | 56 | 950 | 256,0 | 101,6 | 11,9 |

Tabelle 3.5.: Thrombozytenzahlen (Median, Minimum, Maximum, Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler) der Patienten mit Typ 1 VWS. Die Werte der 49 weiblichen wurden von denen der 24 männlichen Patienten separat dargestellt.

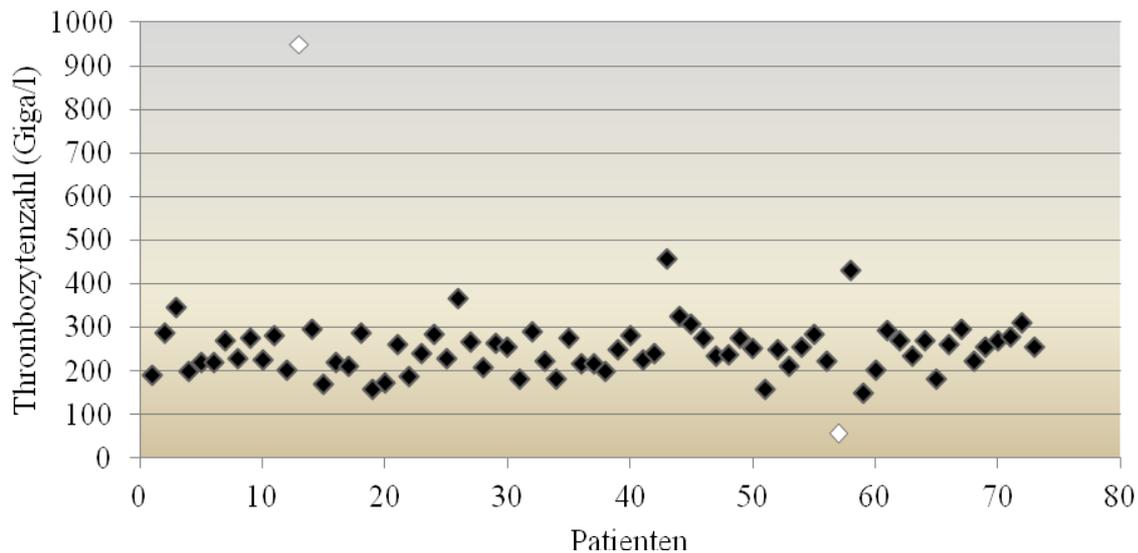


Abbildung 3.5.: Thrombozytenzahlen (Einzelwerte) von den Typ 1 VWS-Patienten. Die zwei von der Norm abweichenden Werte sind durch die weißen Punkte gekennzeichnet.

3.3.2. Aktivierte Partielle Thromboplastinzeit

Die Werte der aPTT waren bei 47 Patienten mit VWS Typ 1 im Normbereich, bei 26 Patienten allerdings gab es Abweichungen vom Referenzbereich im Sinne einer mäßigen bis starken Verlängerung. Für die hier angewandte Methode liegt der Normbereich der aPTT zwischen 26 und 36 Sekunden.

Tabelle 3.6.

| Geschlecht | Median (sec) | Minimum (sec) | Maximum (sec) | Mittelwert (sec) | Standardabweichung | Standardfehler |
|---------------|--------------|---------------|---------------|------------------|--------------------|----------------|
| W (N=49) | 32,5 | 25 | 52 | 34 | 5,4 | 0,8 |
| M (N=24) | 37 | 30 | 57 | 38 | 6,2 | 1,3 |
| Gesamt (N=73) | 35 | 25 | 57 | 35 | 6,0 | 0,7 |

Tabelle 3.6.: aPTT-Werte (Median, Minimum, Maximum, Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler) aller Patienten mit VWS Typ 1. Die Werte der 49 weiblichen wurden von denen der 24 männlichen Patienten separat dargestellt.

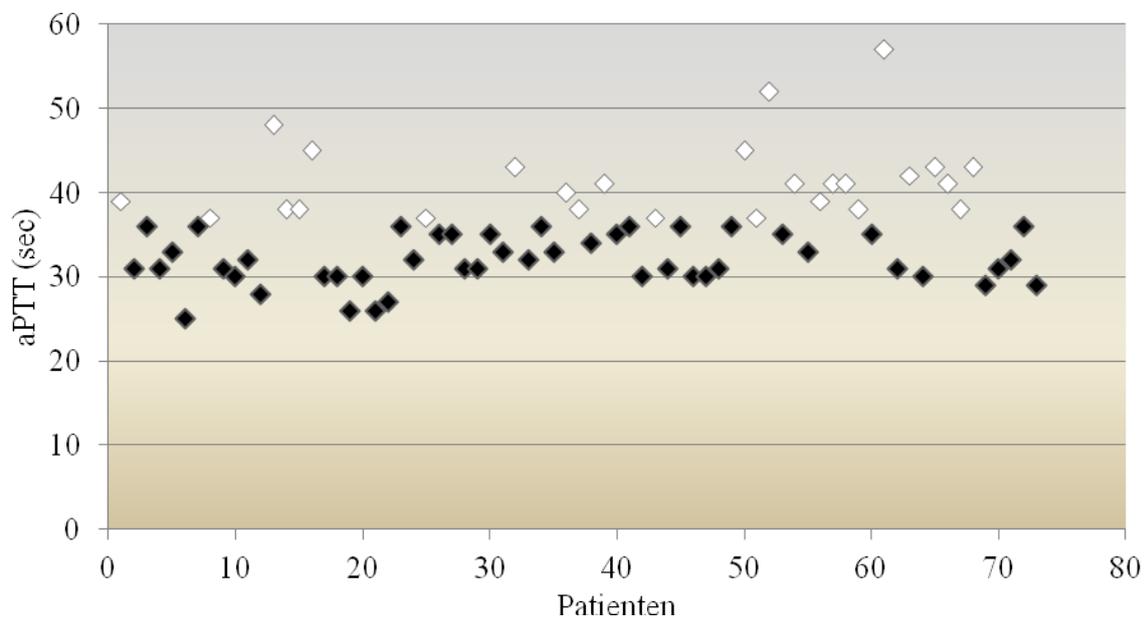


Abbildung 3.6.: aPTT-Werte (Einzelwerte) von allen Typ 1 VWS-Patienten. Die weiß gekennzeichneten Punkte zeigen die Fälle mit mäßig oder stark verlängerter aPTT an.

3.3.3. Thromboplastinzeit

Die Bestimmung der Thromboplastinzeit (TPZ) ist die häufigste laborchemische Untersuchung zur Beurteilung der plasmatischen Gerinnung. Die Werte der TPZ, die mit der Methode nach Quick bestimmt wurden, lagen bei unseren VWS-Patienten im Normbereich, der mit 70-130% definiert ist.

Tabelle 3.7.

| Geschlecht | Median (%) | Minimum (%) | Maximum (%) | Mittelwert (%) | Standardabweichung | Standardfehler |
|---------------|------------|-------------|-------------|----------------|--------------------|----------------|
| W (N=49) | 104 | 79 | 130 | 104,5 | 10,4 | 1,5 |
| M (N=24) | 101,5 | 76 | 120 | 101,1 | 11,4 | 2,3 |
| Gesamt (N=73) | 102 | 76 | 130 | 103,5 | 10,8 | 1,3 |

Tabelle 3.7.: Quick-Werte (Median, Minimum, Maximum, Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler) aller Patienten mit Typ 1 VWS. Die Werte der weiblichen Patienten wurden von denen der männlichen Patienten separat dargestellt.

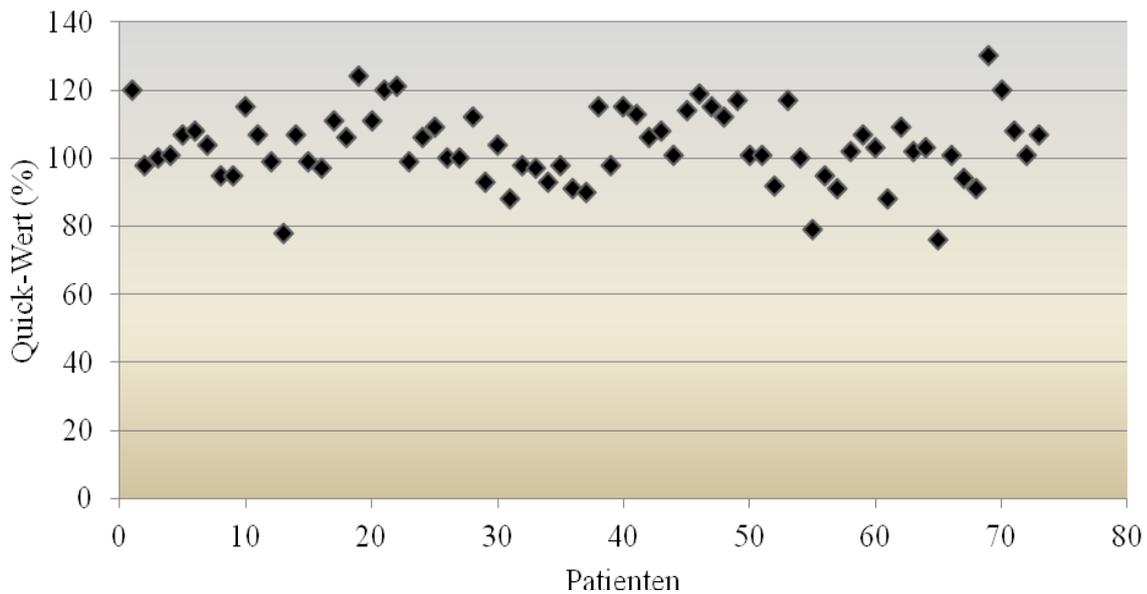


Abbildung 3.7.: Einzelwerte der Thromboplastinzeit von allen Patienten mit VWS Typ 1. Alle Werte der TPZ lagen im Referenzbereich von 70-130%.

3.3.4. Fibrinogen

Fibrinogen ist ein lösliches Protein im Blut oder der interstitiellen Flüssigkeit, das in Gegenwart von Thrombin und Kalzium zu Fibrin umgewandelt wird.

Die Werte des Fibrinogens waren bei den meisten unseren Patienten im Normbereich, in einigen Fällen aber mäßig erhöht (Referenzbereich: 1,77-4,0 g/l).

Tabelle 3.8.

| Geschlecht | Median g/l | Minimum g/l | Maximum g/l | Mittelwert g/l | Standard- abweichung | Standard- fehler |
|------------------|---------------|----------------|----------------|-------------------|-------------------------|---------------------|
| W (N=49) | 3,3 | 2,34 | 5,41 | 3,34 | 0,77 | 0,11 |
| M (N=24) | 3,2 | 2,10 | 5,97 | 3,40 | 0,98 | 0,20 |
| Gesamt (N=73) | 3,3 | 2,10 | 5,97 | 3,36 | 0,84 | 0,10 |

Tabelle 3.8.: Fibrinogen-Werte (Median, Minimum, Maximum, Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler) aller Patienten mit Typ 1 VWS. Die Werte der weiblichen wurden von denen der männlichen Patienten separat dargestellt.

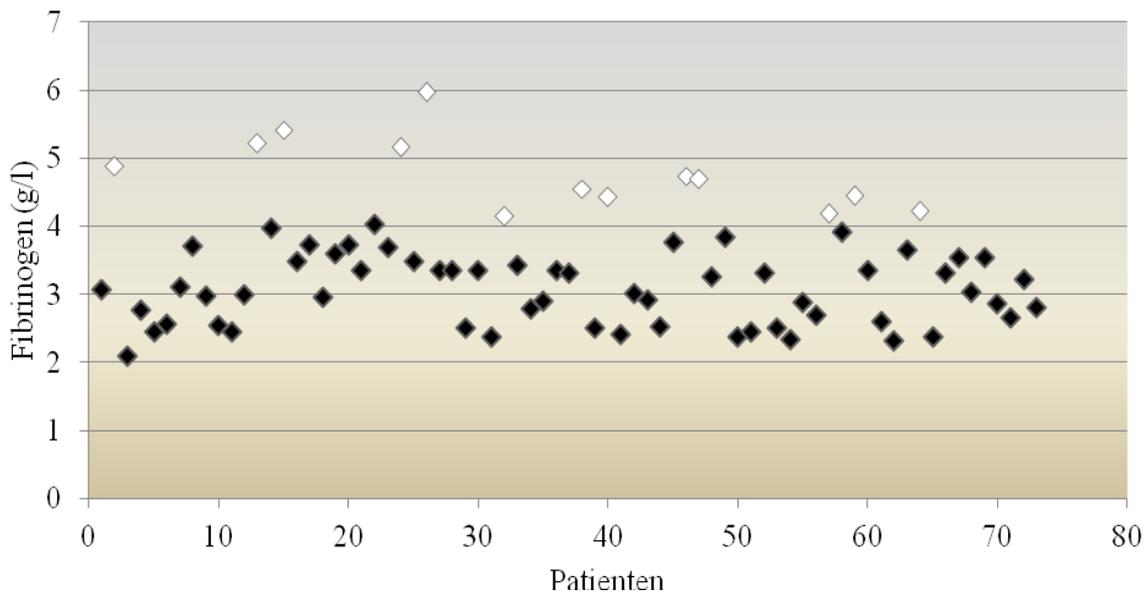


Abbildung 3.8.: Fibrinogen-Werte (Einzelwerte) von allen Typ 1 VWS-Patienten. Keiner der Werte lag unterhalb des Normbereichs. Bei 13 Patienten fanden sich mäßig erhöhte Werte, die als weiße Punkte gekennzeichnet sind.

3.3.5. Faktor VIII-Aktivität

Der Faktor VIII ist ein Gerinnungsfaktor, der im Plasma in inaktiver Form als Proenzyme vorliegt und erst bei Provokation der Gerinnung aktiviert wird. Im Blut ist der Faktor VIII an ein Trägerprotein, den VWF, gebunden und wird somit vor proteolytischem Abbau geschützt. Ohne diese Bindung, beispielsweise bei stark vermindertem VWF, wird die Halbwertszeit von FVIII reduziert und es kann ein sekundärer FVIII-Mangel resultieren.

Die Bestimmung der FVIII-Aktivität erfolgte mit dem Einstufentest, der eine Variante der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit mit der Fibrinbildung als Endpunktmessung darstellt. Die Gerinnungszeit wird dabei primär von der Faktor VIII-Aktivität durch Thrombin bestimmt. Die Aktivität des FVIII wird im aPTT-System mit spezifischen Mangelplasmen ermittelt.

Die bei VWS-Patienten häufig erniedrigte FVIII-Aktivität konnte bei den Patienten der gießener Gerinnungsambulanz nur in 7 Fällen nachgewiesen werden. Bei den meisten Patienten aber lagen die Werte im Normbereich (50-150%).

Tabelle 3.9.

| Geschlecht | Median (%) | Minimum (%) | Maximum (%) | Mittelwert (%) | Standardabweichung | Standardfehler |
|---------------|------------|-------------|-------------|----------------|--------------------|----------------|
| W (N=49) | 101,6 | 33,30 | 154,10 | 98,18 | 30,25 | 4,70 |
| M (N=24) | 97,5 | 22,50 | 146,90 | 91,38 | 30,86 | 6,43 |
| Gesamt (N=73) | 99,9 | 22,50 | 154,10 | 95,95 | 31,74 | 3,79 |

Tabelle 3.9.: Faktor VIII:C-Werte (Median, Minimum, Maximum, Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler) aller Patienten mit VWS Typ 1. Die Werte der 49 weiblichen wurden von denen der 24 männlichen Patienten separat dargestellt.

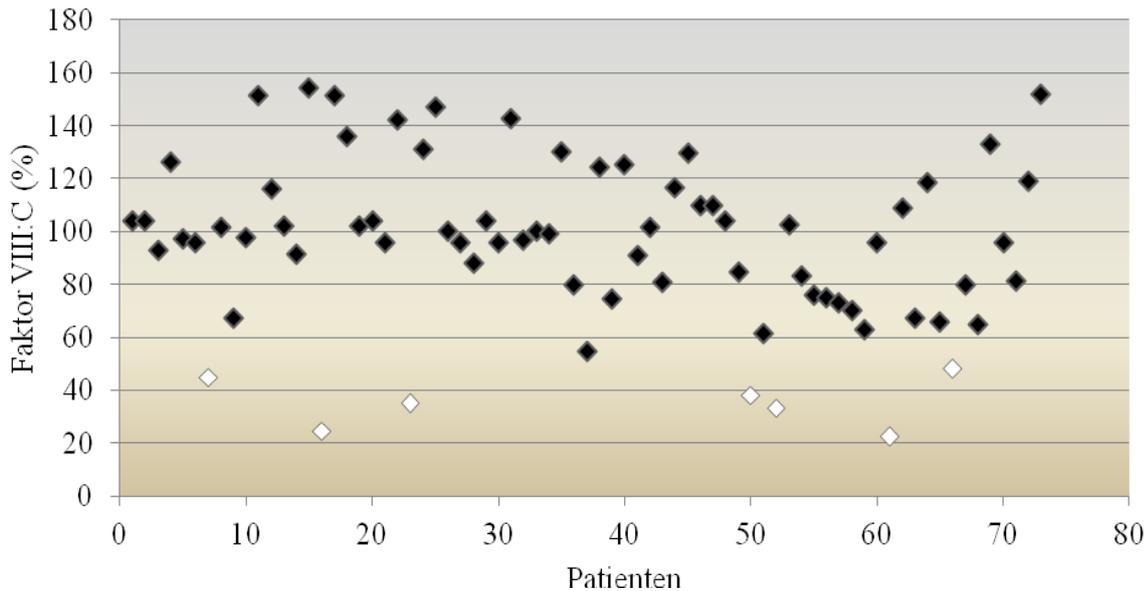


Abbildung 3.9.: Faktor VIII:C-Werte (Einzelwerte) von allen Patienten mit VWS Typ 1. Bei 7 Patienten war eine verminderte Aktivität nachzuweisen, diese Werte sind als weiße Punkte dargestellt.

3.4. VWF-Antigen und Ristocetin-Cofaktor-Aktivität

Im Rahmen von Diagnostik und Verlauf des VWS sind die Bestimmungen des VWF-Antigens (%) sowie der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (%) wichtige laboranalytische Parameter. Die vorhandenen Daten der Patienten der Gerinnungsambulanz wurden dabei folgendermaßen ausgewertet:

3.4.1. Einteilung in Gruppen

Um die laboranalytischen Befunde von VWF-Antigen und Ristocetin-Cofaktor-Aktivität als Vergleichsparameter nutzen zu können, wurde ein Mittelwert aus beiden gebildet. Der Gruppe A konnten 14 Patienten, deren Mittelwerte aus VWF-Antigen und Ristocetin-Cofaktor-Aktivität zwischen 0 und 40% lagen, zugeordnet werden. Der Gruppe B ließen sich 43 Patienten zuteilen, deren Mittelwerte zwischen 41% und 65% lagen. Zur Gruppe C zählten 16 Patienten mit Mittelwerten >65%.

3.4.2. Alters- und Geschlechterverteilung in den Gruppen

Der Gruppe A (0-40%) konnten 14 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 33,6 Jahren, davon 9 weiblichen und 5 männlichen Geschlechts zugeordnet werden. In die

Gruppe B (41-65%) ließen sich 44 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 41,9 Jahren einteilen, wovon 29 weiblich und 15 männlich waren. Zur Gruppe C (>65%) zählten 15 Patienten mit dem Durchschnittsalter von 46,2 Jahre von denen 11 weiblich und 4 männlich waren.

Tabelle 3.10.

| Gruppe | Median (Jahre) | Minimum (Jahre) | Maximum (Jahre) | Mittelwert (Jahre) | Standardabweichung | Standardfehler |
|--------|----------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|----------------|
| A | 29,5 | 16 | 74 | 33,6 | 16,3 | 4,4 |
| B | 41,0 | 12 | 77 | 42,0 | 16,7 | 2,6 |
| C | 46,2 | 18 | 83 | 46,2 | 17,3 | 4,6 |

Tabelle 3.10.: Altersverteilung (Median, Minimum, Maximum, Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler) in den drei Gruppen A-C (Mittelwert aus Ristocetin-Cofaktor-Aktivität und VWF-Antigen).

3.4.3. Laborparameter und klinische Blutungsneigung

Der Zusammenhang zwischen Laborparametern (Ristocetin-Cofaktor-Aktivität und VWF-Antigen) und dem Schweregrad der Blutungssymptomatik (Blutungsscore 1-4) wurde geprüft, insbesondere die Korrelation zwischen den verminderten VWF-Werten und der stärkeren Ausprägung der Blutungsneigung.

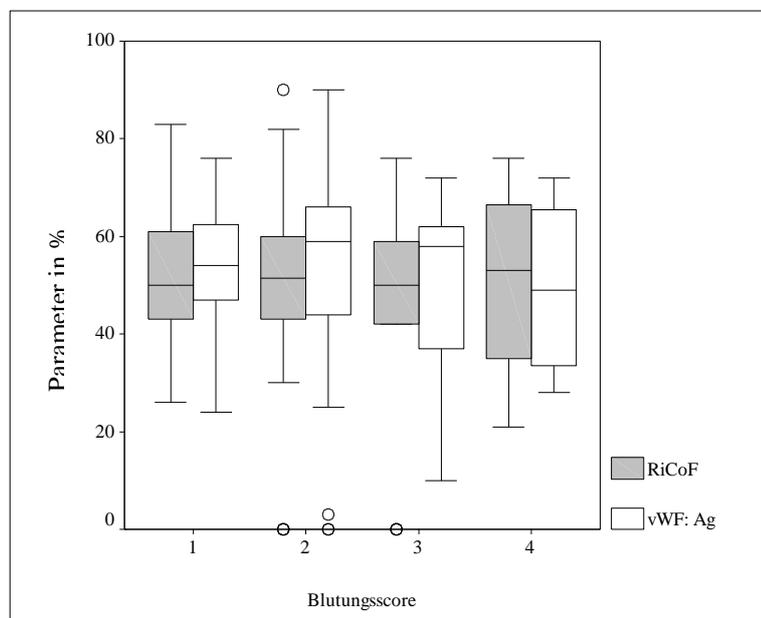


Abbildung 3.10.: Darstellung der Schwankungen der Laborparameter (RiCoF/VWF:Ag) innerhalb der nach Blutungsscore (1-4) eingeteilten Patientenkollektive.

Tabelle 3.11.

| Blutungsscore Gruppe | BS 1 | BS 2 | BS 3 | BS 4 | Gesamt |
|----------------------|---------------|---------------|--------------|-------------|------------------------------|
| A | 4 (28,6%) | 6 (42,9%) | 3 (21,4%) | 1 (7,1%) | 14 (100,0%) |
| B | 10 (22,7%) | 24 (54,6%) | 8 (18,2) | 2 (4,5%) | 44 (100,0%) |
| C | 5 (33,3%) | 6 (40,0%) | 3 (20,0%) | 1 (6,7%) | 15 (100,0%) |
| Gesamt | 19 | 36 | 16 | 4 | 73 (100,0%) |

Tabelle 3.11.: Verteilung der Patienten mit VWS Typ 1 nach Blutungsscore (1-4) in den Gruppen A-C. Aufgrund des Chi²-Tests mit $p=0,580$ muss die Unabhängigkeit der beiden Parameter angenommen werden.

3.5. Glykoprotein Ia-Polymorphismus

Anhand aus Vollblut isolierter DNA ist es mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion möglich die Genotypvariante des GP Ia-Polymorphismus an Position 807 des ITGA2 Gens eines Individuums zu bestimmen.

Dabei erfolgt die Differenzierung in drei Genotypen: homozygot C oder T und heterozygot CT.

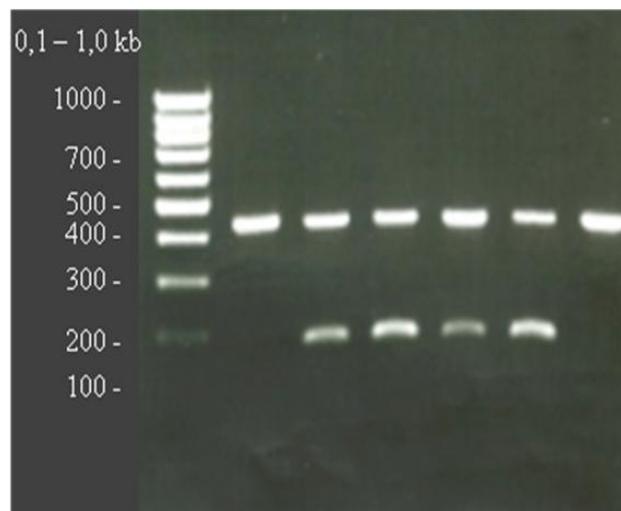


Abbildung 3.11.: DNA-Auszug - PCR Produkt aus Genom

Spur 1: Standard (100bp DNA-Leiter); Spur 2 und 3: oben interne Positivkontrolle (Fragment aus dem Gen für HGH) für den Nachweis von DNA, unten DNA-Probe markiert nur für T →homozygot 807T (hohe Rezeptordichte); Spur 4 und 5: oben interne Positivkontrolle, unten DNA-Probe markiert für C und T →heterozygot CT

(mittlere Rezeptordichte); Spur 6 und 7: oben interne Positivkontrolle, unten DNA-Probe markiert nur für C →homozygot 807C (niedrige Rezeptordichte).

3.5.1. Genotypfrequenz der Patienten mit VWS Typ 1

Bei dem C807T-Polymorphismus lassen sich drei genotypische Varianten unterscheiden: Die heterozygote Ausprägung CT, die homozygote Ausprägung C und die homozygote Ausprägung T. Die Häufigkeit, in der die drei Varianten auftreten wurde für alle Patienten mit VWS Typ 1 ermittelt. Dabei ergab sich, dass 35 Patienten heterozygot CT, 27 Patienten homozygot C und 11 Patienten homozygot T waren. Die Häufigkeit beider Allele war: 0,61 für 807C und 0,39 für 807T.

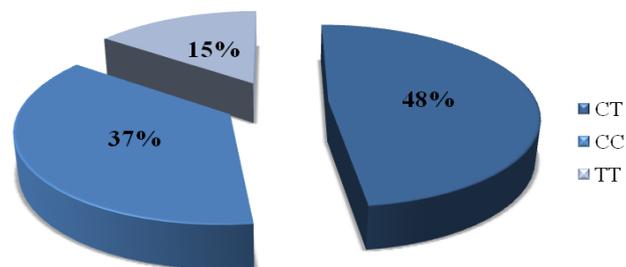


Abbildung 3.12.: Genotypfrequenz des GP Ia-Polymorphismus der VWS Typ 1 Patienten.

3.5.2. Kontrollgruppe

Um einen Vergleich zur Normalbevölkerung zu erlangen, wurde die Genotypfrequenz des C807T-Polymorphismus einer Kontrollgruppe erfasst. Hierbei handelte es sich um Personen, die im Gerinnungslabor des Uniklinikums Gießen untersucht worden waren, und bei denen weder eine hämorrhagische Diathese noch eine Mutation (Faktor V Leiden/ Prothrombin / MTHFR) bestand. Bei 72 Personen, die in Bezug auf Lebensalter und Geschlecht der Gruppe der untersuchten Patienten mit VWS Typ 1 entsprachen, wurde ebenfalls die Häufigkeitsverteilung der Genotypen des C807T-Polymorphismus ermittelt.

3.5.2.1. Genotypfrequenz der Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe waren 40 Personen heterozygot CT, 26 homozygot C und 6 homozygot T. Die Häufigkeit beider Allele war hier: 0,64 für 807C und 0,36 für 807T.

Mit dem Chi²-Test wurde bestimmt, dass die Allelfrequenz von 807C, die eine niedrige Rezeptordichte vermittelt, in der Kontrollgruppe ebenso häufig auftrat, wie bei den VWS Typ 1 Patienten ($p = 0,403$).

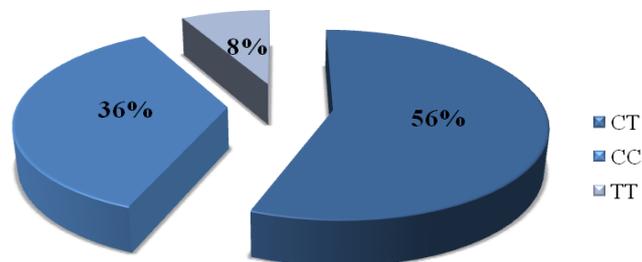


Abbildung 3.13.: Genotypfrequenz des GP Ia-Polymorphismus in der Kontrollgruppe.

3.5.3. Einfluss des GP Ia-Polymorphismus auf die Blutungssymptomatik

Um einen Zusammenhang zwischen dem C807T-Polymorphismus und der Blutungssymptomatik zu klären, wurde die ermittelte Genotypfrequenz der VWS-Patienten den Schweregraden der klinischen Blutungsneigung zugeordnet. Der Basenaustausch von C zu T an der Position 807 des ITGA2 Gens bewirkt eine Dichteerhöhung der GP Ia/IIa-Rezeptoren an der Thrombozytenoberfläche, woraus eine erhöhte Thrombozytenadhäsion resultiert. Damit haben Patienten mit dem Genotyp homozygot C eine niedrigere Expression des Rezeptors. Der Genotyp homozygot T dagegen ist mit einer erhöhten Rezeptordichte verbunden. Geprüft wurde, ob diese Dichteunterschiede der GP Ia/IIa-Rezeptoren einen Einfluss auf die Variabilität der Ausprägung der Blutungsneigung zeigen.

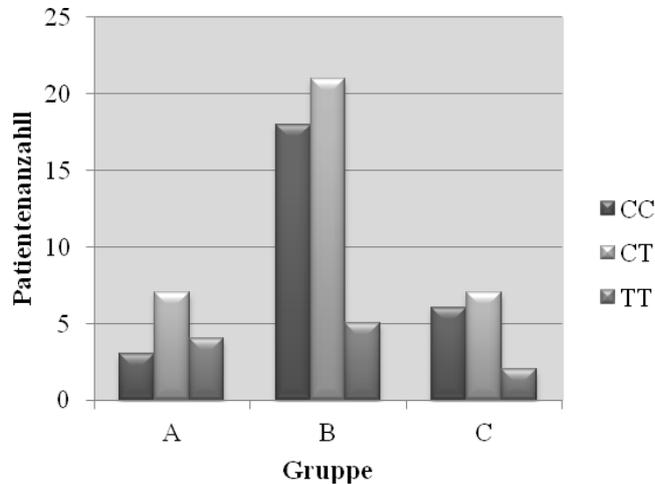
Tabelle 3.12.:

| | | Kontroll n (%) | Score 1 n (%) | Score 2 n (%) | Score 3 n (%) | Score 4 n (%) |
|--------------|-----------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| C807T | CC | 26 (36%) | 10 (53%) | 13 (36%) | 3 (21%) | 1(25%) |
| | CT | 40 (56%) | 7 (37%) | 19 (53%) | 6 (43%) | 3(75%) |
| | TT | 6 (8%) | 2 (10%) | 4 (11%) | 5 (36%) | 0 |

Tabelle 3.12.: Verteilung der drei Genotypvarianten des GP Ia-Polymorphismus nach Schweregrad der Blutungsneigung. Aufgrund des Chi²-Tests mit $p=0,180$ muss die Unabhängigkeit der Parameter angenommen werden.

3.5.4. GP Ia-Polymorphismus in den Gruppen A-C

Die Häufigkeitsverteilung der Genotypvarianten des GP Ia-Polymorphismus war in den drei Gruppen A-C vergleichbar. Die unterschiedlichen Genotypen, homozygot C,



heterozygot CT und homozygot T waren in allen drei Gruppen in ähnlichem Verhältnis vertreten. In der Gruppe A mit niedrigen VWF-Parametern (0-40%) war der Genotyp homozygot T, der eine erhöhte GP Ia/IIa-Rezeptordichte bewirkt, im Verhältnis sogar häufiger nachweisbar als in den anderen Gruppen.

Abbildung 3.14.: Häufigkeitsverteilung der Genotypvarianten des GP Ia-Polymorphismus in den Gruppen A-C.

Ein Zusammenhang zwischen Laborparametern (Ristocetin-Cofaktor-Aktivität und VWF-Antigen) in den Gruppen A-C und der Genotypfrequenz des GP Ia-Polymorphismus konnte nicht festgestellt werden. Es besteht keine Abhängigkeit der beiden Parameter.

Tabelle 3.13.:

| Gruppe Genotyp | A | B | C | Gesamt |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| CC | 3 (11,1%) | 18 (66,7%) | 6 (22,2%) | 27 (100,0%) |
| CT | 7 (20,0%) | 21 (60,0%) | 7 (20,0%) | 35 (100,0%) |
| TT | 4 (36,4%) | 5 (45,4%) | 2 (18,2%) | 11 (100,0%) |
| Gesamt | 14 (19,2%) | 44 (60,3%) | 15 (20,5%) | 73 (100,0%) |

Tabelle 3.13.: Verteilung der drei Genotypvarianten des GP Ia-Polymorphismus in den Gruppen A-C. Aufgrund des Chi²-Test mit $p=0,415$ muss die Unabhängigkeit der beiden Parameter angenommen werden.

4. DISKUSSION

4.1. Von Willebrand-Syndrom

Das VWS ist eine Erkrankung des Gerinnungssystems, die durch eine quantitative und/oder qualitative Bildungsstörung des VWF und dadurch ausgelöste Thrombozytenfunktionsstörung sowie eine sekundär verminderte Aktivität des FVIII charakterisiert ist (Mazurier et al, 1998). Es ist die häufigste hereditäre Gerinnungsstörung, die Männer und Frauen in allen Ländern betrifft, und sollte bei Patienten mit ungeklärter hämorrhagischer Diathese immer in Betracht gezogen werden (Sadler et al, 2000; Rodeghiero, 2002). Die Prävalenz in der Normalbevölkerung wird mit 0,8% bis 1,3% beschrieben (Rodeghiero et al, 1987; Werner et al, 1993; Budde et al, 2002) und kann laboranalytisch bei etwa 1% der Bevölkerung nachgewiesen werden. Eindeutige Symptome bzw. klinische Relevanz weist jedoch nur ein geringer Teil der Betroffenen auf (1:3000 bis 1:10000) (Budde et al, 2004).

Das Krankheitsbild ist insbesondere beim VWS Typ 1 sehr unterschiedlich. Abgesehen von der Variabilität der klinischen Ausprägung gibt es erhebliche Differenzen bei den zu Diagnostik und Verlauf erhobenen Laborparametern.

Die Schwankungen der Laborbefunde sind sowohl auf die heterogene Natur der Defekte beim VWS als auch auf die Tatsache zurückzuführen, dass der VWF durch vasoaktive Stimuli, wie z.B. Stress oder körperliche Anstrengung aus den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen freigesetzt werden kann, was zu einem vorübergehenden Anstieg des Plasmaspiegels führt. Bei hormonellen Veränderungen (insbesondere Schwangerschaft) sowie systemischen Entzündungen und Infektionen wird vermehrt VWF synthetisiert (Beers et al, 2000).

Der Plasmaspiegel wird ebenso von Lebensalter und Geschlecht sowie vom AB0-Blutgruppentyp beeinflusst. Bei Personen mit der Blutgruppe 0 wurden signifikant niedrigere Werte des VWF gefunden (Gill et al, 1987). Der VWF von Personen mit der Blutgruppe 0 hat im Vergleich zu den anderen Blutgruppen eine deutlich kürzere Halbwertszeit im Blut. Dies erhöht aber nicht zwangsläufig das Risiko für Blutungsereignisse. Allerdings steigt damit die Wahrscheinlichkeit, dass ein VWS diagnostiziert wird (Favaloro et al, 2005).

4.1.1. Symptomatik des von Willebrand-Syndroms

Die typische Symptomatik des VWS besteht aus mukokutanen Blutungen (Epistaxis, Zahnfleischbluten), Ekchymosen, sowie ausgeprägten Menorrhagien. Weiterhin können unvorhersehbare perioperative Blutungen auftreten. Die Blutungsneigung nimmt unter Kontrazeption, am Ende der Schwangerschaft (Ostendorf et al, 1991) sowie nach der Menopause und im Alter (ab ca. 40 Jahren (Gill et al, 1987)) ab (Scharrer, 1997).

Neben den Abweichungen der Hämostase werden auch Veränderungen der Gefäßmorphologie beschrieben, die sich durch abnormen Gefäßverläufe sowie einer Dilatation der arteriellen und venösen Kapillarschenkel darstellen (Stephan et al, 1997). Es wird vermutete, dass diese Veränderungen der Gefäßstruktur in engem Zusammenhang mit der Interaktion von Thrombozyten und Gefäßwand (O'Brien, 1996), insbesondere der VWF-induzierten Interaktion stehen. Dabei sind besonders kapilläre Blutungen und extravasale Blutzellen in unterschiedlicher Ausprägung auffällig (Mörsdorf et al, 1997).

4.1.2. Variabilität der klinischen Ausprägung

Wie oben schon erwähnt, ist das Leitsymptom des VWS die verlängerte Schleimhautblutung (Rodeghiero et al, 2001), die als Blutung bei Zahnwechsel, nach Tonsillektomie, Adenoidektomie und Zahnextraktion auftritt. Insbesondere bei diesen Operationen im Schleimhautbereich kann es bei Patienten mit unauffälliger Anamnese bezüglich einer hämorrhagischen Diathese zu nicht vorhersehbaren Blutungsereignissen kommen. Ein besonderes Problem bei Frauen sind Menorrhagien und peripartale Blutungen. Selbst bei den leichteren Formen des VWS, zu denen der Typ 1 zählt, leidet ein Großteil der Frauen unter Menorrhagien. Patientinnen mit VWS Typ 1 können auch erst im Wochenbett mit Blutungskomplikationen auffällig werden, da das während der Schwangerschaft oft nahezu normwertige VWF-Antigen postpartal wieder abfällt und eine ausreichende Hämostase nicht mehr gewährleistet werden kann (Schneppenheim/Budde, 2010).

In der vorliegenden Datenanalyse von 49 weiblichen und 24 männlichen Patienten mit diagnostiziertem VWS Typ 1 konnte folgendes Verteilungsmuster der Blutungssymptomatik erstellt werden. Die Vergleichsangaben dazu sind dem „von Willebrand Disease Expert Panel, National Heart Lung and Blood Institute (NHLBI), 2007“ entnommen.

Nasenbluten, das bei VWS Patienten als sehr häufig beschrieben wird, trat bei 48,6% der Patienten mit variabler Frequenz und Intensität auf. Die Angaben in der Literatur liegen vergleichend dazu mit 53-61% etwas höher. Von den weiblichen Patienten litten 67,3% an mehr oder minder ausgeprägten Menorrhagien. Dieses Ergebnis ist mehr als doppelt so hoch im Vergleich zu den sonst beschriebenen 32%. Ebenso überstieg der Anteil der Patienten mit behandlungsbedürftigen Blutungen nach Zahnextraktionen mit 53,4% andere Angaben von 17-32%. Zudem traten Zahnfleischblutungen mit 42,5% zu den bereits angegebenen 29-31% häufiger auf. Deutlich war auch die Differenz bei der verstärkten Neigung zur Hämatombildung mit 76,7% bei den Patienten gegenüber 50% in der Literatur. Blutungen nach kleineren Verletzungen traten bei 47,9% auf. Auch hier liegen andere Angaben mit 36% niedriger. Die Daten der Patienten bezüglich dem Vorkommen von Gelenkblutungen (2,7%) und gastrointestinalen Blutungen (6,8%) waren mit anderen Untersuchungen nahezu identisch (2-3% bzw. 5%).

Die Auswertung klinischer Symptome von Schneppenheim, die auf Untersuchungen von Rodeghiero und Castaman aus dem Jahre 2001 beruhen, entsprechen größtenteils denen, der oben angegebenen Vergleichsliteratur.

Ein Grund für die teils erheblichen Abweichungen unserer Resultate kann die Patientenauswahl sein. Viele unserer Patienten wurden aufgrund einer stärker ausgeprägten Blutungssymptomatik auffällig, infolgedessen auf Gerinnungsstörungen untersucht, diagnostiziert und falls nötig auch therapiert. Dies kann als Einschränkung beim Datenvergleich mit anderen Analysen von nicht nur in Spezialzentren untersuchten Patienten gewertet werden. Gerade Patienten, die in diesen Spezialzentren untersucht und möglicherweise auch behandelt werden, können unter Umständen ausgeprägter symptomatisch sein oder exakter über ihre Blutungssymptomatik berichten als andere weniger selektierte VWS Typ 1 Patienten.

Da die Symptome bei einem Großteil der VWS-Patienten nur in Sondersituationen bzw. unter Provokation der Blutgerinnung auftreten, wird bei der Mehrheit der Patienten das VWS erst spät oder infolge erheblicher Komplikationen beispielsweise bei operativen Eingriffen diagnostiziert. Zugleich kann diese Feststellung die Häufigkeit der perioperativen Blutungsereignisse (60,3%) unserer Patienten begründen.

Einen weiteren Erklärungsversuch bietet die in den letzten Jahren vielfach diskutierte Diagnostik und Klassifikation des VWS, die wenig patientenorientiert (Schneppenheim/Budde, 2010) und für den klinischen Einsatz nur eingeschränkt brauchbar ist, worauf im Folgenden noch näher eingegangen wird.

Die Aussagen zur positiven Familienanamnese sind sehr unterschiedlich, obgleich diese ein wichtiges Kriterium für die richtige Diagnosestellung darstellt. Eine Einschränkung in der Beurteilbarkeit positiver Familienanamnesen ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass Familienmitglieder betroffener Patienten oft allein auf abnormen laboranalytischen Werten basierend, anstatt aufgrund der Kombination aus Abweichungen der Laborparameter und einer manifesten Blutungssymptomatik, diagnostiziert werden (Tosetto et al, 2006).

Bei 41,1% unserer Patienten war bei Verwandten ersten oder zweiten Grades auch ein VWS diagnostiziert bzw. eine Blutungssymptomatik unklarer Genese nachzuweisen.

Dabei ist die klinische Beurteilung einer Blutungssymptomatik eine große Herausforderung, da milde Formen von Blutungsereignissen auch bei der gesunden Normalbevölkerung sehr häufig auftreten (Laffan et al, 2004).

4.2. Diagnostik des VWS Typ 1

Obgleich das VWS seit vielen Jahrzehnten bekannt ist, stehen keine evidenzbasierten Diagnosekriterien für seine häufigste Erscheinungsform, den Typ 1, zur Verfügung. Die Diagnose des VWS Typ 1 für den einzelnen Patienten beruht auf dem Nachweis der Präsenz hämorrhagischer Symptome, reduzierten VWF-Werten ohne Hinweis auf einen qualitativen Defekt sowie dem autosomalen Erbgang (Sadler et al, 2005), wobei die letzten zwei Kriterien einfach definiert werden können. Eine Vererbung kann vorausgesetzt werden, wenn wenigstens ein Familienmitglied ein ähnliches Krankheitsbild und den quantitativen Mangel an VWF, der unter dem ABO-Blutgruppensystem angepassten Referenzbereich liegt, aufweist (Rodeghiero et al, 2001). Demgegenüber wurde die charakteristische Blutungsanamnese als entscheidendes Kriterium vorgeschlagen, aber nie auf Sensitivität oder Spezifität bezüglich der Diagnose VWS überprüft.

Die Diagnosestellung des VWS Typ 1 ist oft sehr schwierig (Eikenboom et al, 1993; Sadler et al, 2004; Sadler et al, 2005), bedingt dadurch, dass nicht alle Personen mit niedrigen VWF-Werten auch molekulare Defekte des VWF-Gens aufweisen. Ob bei diesen Personen ohne Aberration des VWF-Gens ein VWS diagnostiziert oder eine andere Bezeichnung gewählt werden sollte, wird weiterhin diskutiert. Eine Begründung für reduzierte VWF-Werte bei vielen der Betroffenen mit normaler VWF-Gensequenz fehlt. Ein niedriger VWF-Wert wird mutmaßlich trotz normalem VWF-Gen mit einem Blutungsrisiko in Verbindung gebracht und die Personen mit klinischer

Blutungssymptomatik und niedrigen VWF-Werten können von einer Therapie zur Anhebung des VWF profitieren. Die meisten Kliniker würden darin übereinstimmen, dass Betroffene mit VWF-Werten unter 30 IU/dl wahrscheinlich ein VWS haben (Bethesda et al, 2007).

Die Diagnose der Patienten mit VWS Typ 1 der vorliegenden Datenanalyse wurde unter Berücksichtigung mehrerer Kriterien gestellt. Ein Merkmal boten Blutungssymptomatik, Blutungsanamnese und Blutungstyp. Ein weiteres Kriterium waren die laboranalytischen Bestimmungen von reduzierter Ristocetin-Cofaktor-Aktivität und gleichsam erniedrigtem VWF-Antigen, sowie die Ratio der beiden Parameter. Die Ratio von Ristocetin-Cofaktor-Aktivität und VWF-Antigen dient der Unterscheidung der einzelnen Typen und sollte beim VWS Typ 1 $> 0,5 - 0,7$ (Bethesda et al, 2007) sein. Die reduzierte Kollagenbindungskapazität wurde ebenso mit einbezogen. Zur Differenzierung von den anderen VWS Typen wurde letztlich auch die Multimeranalyse berücksichtigt.

Per Definition ist das VWS eine Blutgerinnungsstörung mit Schleimhautblutungen als Leitsymptom, verursacht durch einen qualitativen oder quantitativen VWF-Mangel, resultierend aus einem VWF-Gendefekt. Um die definitive Diagnose eines VWS zu stellen, muss eine Person demnach Schleimhautblutungen in der Anamnese, verminderte funktionelle VWF-Werte und eine Mutation des VWF-Gens oder eine positive Familienanamnese mit nachgewiesenem VWF-Defizit vorweisen. In der klinischen Anwendung wirft jedes dieser Kriterien eine Anzahl praktischer Probleme auf. Demzufolge könnte eine persönliche Blutungsanamnese aufgrund von mangelnder Provokation der Blutstillung oder bereits prophylaktisch getroffener Maßnahmen fehlen. Ferner ist nicht sicher, ob die Beurteilung der VWF-Funktion in vitro die adäquate VWF-Funktion in vivo widerspiegelt. Dies kann auf das Zusammenwirken mit anderen genetischen Faktoren zurückzuführen sein. Das Ergebnis ist, dass eine gesteigerte Tendenz zu Blutungsereignissen nicht überzeugend prognostiziert werden kann und eine große, an den unteren Normbereich der VWF-Werte grenzende Grauzone entsteht (Laffan et al, 2004).

Da das VWF-Gen groß und seine Analyse kompliziert ist, wird in vielen Fällen kein genetischer Defekt erkannt. Dies ist für das VWS Typ 1 nur teilweise korrekt. Außerdem ist die Bedeutung vieler identifizierter Mutationen fraglich. Letztendlich wurde festgestellt, dass einige VWS-Patienten überhaupt keine Aberrationen des VWF-Gens aufweisen (Castaman et al, 1999). Wie schon diskutiert wurde, wird der Plasma-

VWF durch zahlreiche andere genetische, physiologische und umweltbedingte Faktoren beeinflusst, die eine unvollständige Ausprägung des VWS zur Folge haben. Betroffene Patienten können zusätzlich eine leere Familienanamnese aufweisen. Trotz alledem ist die Diagnose in vielen Fällen eindeutig und die diagnostischen Schwierigkeiten sind größtenteils auf die mutmaßlich mildere Form des VWS Typ 1 beschränkt. Für viele Patienten ist es oft nicht möglich, alle erforderlichen diagnostischen Kriterien mit Sicherheit zu erfüllen (Laffan et al, 2004).

Um die Probleme, die bei der Klassifikation entstehen können, zu umgehen, sollte individuell abgeklärt werden, ob entweder spontan, infolge einer Verletzung oder einer invasiven Behandlung eine Blutungsgefährdung besteht. Außerdem stellt sich die Frage, ob andere Familienmitglieder betroffen sind, an der gleichen Gerinnungsstörung zu leiden und welche Behandlung gegebenenfalls nötig ist. Es ist somit pragmatischer, das VWS klinisch als eine Gerinnungsstörung, verursacht durch einen quantitativen oder qualitativen Mangel an VWF, zu betrachten, anstatt sich nach den strikten Definitionen des VWS zu richten (Laffan et al, 2004).

Dieser Ansatz würde einige Patienten ohne Mutation des VWF-Gens miteinschließen, bei denen eine gesicherte Familien- oder Eigenanamnese mit Schleimhautblutungen fehlt, die aber dennoch einer Behandlung von Blutungsepisoden oder der Prophylaxe bei invasiven Prozeduren bedürfen (Laffan et al, 2004).

Das Vorgehen dabei wurde von einer Studie unterstützt, die zeigte, dass Personen mit VWF-Werten zwischen 35 und 50 IU/dl ein ähnliches Blutungsrisiko und einen entsprechenden Behandlungsbedarf haben, unabhängig davon, ob deren niedrige VWF-Werte auf ein klar definiertes VWS oder die Blutgruppe 0 zurückzuführen sind (Nitu Whalley et al, 2000).

Die in der Normalbevölkerung gemessenen VWF-Werte können einem bestimmten Bereich zugeordnet werden. Die Verbindung von Blutungsrisiken mit verminderten VWF-Werten ist nachgewiesen. Der Punkt, an dem eine Blutungsneigung oder ein Blutungsrisiko auffällig bzw. inakzeptabel wird, ist zwangsläufig nicht eindeutig definierbar, sollte aber für jeden Patienten individuell bestimmt werden. Demnach kann die Verdachtsdiagnose eines VWS gestellt werden, wenn entweder eine persönliche oder familiäre Blutungsanamnese in Kombination mit verminderten VWF-Werten nachweisbar ist (Laffan et al, 2004).

4.3. Schweregradeinteilung nach Blutungssymptomatik

Zu den Eigenschaften des VWS Typ 1 zählt die unvollständige Penetranz, die auf ca. 60% geschätzt wird (Miller et al, 1979), das heißt, dass 40% der VWS Typ 1 Allel tragenden Patienten asymptomatisch sind. Gerade unter betroffenen Individuen sind Symptome und Schweregrad äußerst variabel (Levy et al, 2001).

In der vorliegenden Datenanalyse konnten deutliche Variationen der Blutungssymptomatik und des Schweregrads bei Patienten mit diagnostiziertem VWS Typ 1 herausgearbeitet werden. Die Resultate bestärken die Annahme, dass nicht nur die verminderte Aktivität des VWF die Blutungsneigung bei VWS Typ 1 Patienten bestimmt.

Es existieren einige Ansätze, die den Nutzen einer Blutungsanamnese bei verschiedenen erblichen Gerinnungsstörungen abwägen (McKay et al, 2004; Sramek et al, 1995; Buchanan et al, 2002), dennoch liegen Standardkriterien zur Beurteilung von Blutungssymptomen derzeit nicht vor (Tosetto et al, 2006).

Die meisten Kenntnisse über das Krankheitsbild des VWS basieren auf ausführlichen Berichten über die Präsenz der Blutungssymptomatik, die genaue bzw. quantitative Analyse dieser Symptome fehlt aber größtenteils (Tosetto et al, 2006).

In der vorliegenden Datenanalyse basierte der von den Patienten ausgefüllte Fragebogen (s. Anhang) auf der Symptomatik hämorrhagischer Diathesen, speziell des VWS Typ 1. Anhand dieses Fragebogens konnte die genaue Blutungsgeschichte jedes Patienten ausgewertet werden. Die Einteilung nach Schweregrad der Erkrankung erfolgte durch die Anzahl und Ausprägung der Blutungssymptome. Um die Differenzen in der klinischen Ausprägung des VWS darzustellen, wurden die einzelnen Patientendaten einem quantitativer Blutungsscore zugeordnet.

Blutungsscore 1 umfasste überwiegend petechiale Blutungen, auch in die Mundschleimhaut, häufiges Zahnfleisch- und Nasenbluten, verstärkte Neigung zu Hämatom-Bildung, längeres Nachbluten nach kleineren Verletzungen und bei den weiblichen Patienten Menorrhagien. Diese leichtere Blutungssymptomatik war bei 19 Patienten nachzuweisen. Dem Blutungsscore 2 wurden 36 Patienten zugeordnet, bei denen zusätzlich zu den oben genannten Beschwerden, die hier aber mit höherer Intensität (v.a. Nasenbluten und Hämatome) auftraten, verstärkte Blutungen während bzw. nach operativen Eingriffen (z.B. Tonsillektomie) und Zahnextraktionen sehr häufig waren. Zum Blutungsscore 3 wurden 14 Patienten gezählt. Operative Eingriffe mit starken Blutungen bzw. Nachblutungen, welche die Behandlung erschwerten, die

Behandlungsdauer verlängerten, Bluttransfusionen erforderlich machten oder nur durch eine erneute chirurgische Intervention therapiert werden konnten, sowie peripartale Blutungsereignisse begründeten bei diesen Patienten die Schwere der Symptomatik. Bei 4 Patienten waren zusätzlich zu dem genannten Symptomenkomplex auch Gelenkblutungen oder schwere gastrointestinale Blutungen aufgetreten. Diese Patienten wurden dem Blutungsscore 4 zugeordnet.

4.4. Verteilung der Patienten in den Gruppen A - C

Durch die Bestimmung des VWF-Antigens ist eine Differenzierung zwischen vermindertem und dysfunktionellem VWF möglich. Es handelt sich um ein immunoelektrophoretisches Verfahren, mit dem die Gesamtkonzentration des von Willebrand-Proteins im Plasma gemessen wird. Die vollständige Untersuchung bei Verdacht auf ein VWS beinhaltet aber die Kombination mit einer Methode, durch die die Funktion des VWF erfasst werden kann.

Eine funktionelle Eigenschaft des VWF ist die Ristocetin-Cofaktor-Aktivität, die quantitativ bestimmt werden kann, indem Thrombozyten *in vitro* in Anwesenheit von Ristocetin und VWF untereinander reagieren. Das Antibiotikum Ristocetin (Ristomycin) spielt keine physiologische Rolle bei der Thrombozytenaktivierung, reflektiert aber die Interaktion zwischen VWF und dem GP Ib/IX-Rezeptor. Die Agglutination von Thrombozyten, die von funktionierendem VWF abhängig ist, wird durch die Bindung von Ristocetin an VWF und GP Ib/IX verursacht (Budde et al, 2004). Dies erlaubt einen Rückschluss auf die Aktivität des VWF.

Da dem VWF multiple Funktionen zukommen, können sehr unterschiedliche Defekte auftreten und zur klinisch differenten Manifestation der Blutungsneigung führen. Bei rein quantitativen Defekten des VWF ist eine Verminderung des VWF-Antigens und der Funktion zu erwarten. Dagegen betreffen qualitative Defekte des VWF einzelne Funktionen ohne Verminderung des VWF-Antigens.

Das VWS Typ 1 wird durch ein partielles quantitatives Defizit des VWF verursacht, das bedeutet, es sind alle Formen der VWF-Multimere vorhanden, allerdings in reduzierter Konzentration und dadurch tritt die parallele Verminderung des VWF-Antigens und der Ristocetin-Cofaktor- Aktivität auf (Schneppenheim/Budde, 2010).

In der vorliegenden Datenanalyse wurde ein Mittelwert aus VWF-Antigen (%) und Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (%) für jeden Patienten bestimmt, um anhand der diagnostischen Laborparameter eine Gruppenzuordnung festlegen zu können.

Bei der Aufteilung in die Gruppen A, B und C wurde deutlich, dass bei der Mehrzahl der Patienten die Laborwerte nur leicht erniedrigt waren und sie damit der Gruppe B zugeordnet werden konnten. Die übrigen Patienten wurden in nahezu gleichen Anteilen sowohl der Gruppe mit sehr niedrigen VWF-Parametern (Gruppe A), als auch der Gruppe, deren Befunde die Grenze zum Normbereich überschritten (Gruppe C) zugeteilt. Diese Befunde stimmen mit den bekannten Fluktuationen der VWF-Werte überein (Abildgaard et al, 1980). Weibliche und männliche Patienten waren in Bezug auf die drei Gruppen in nahezu gleichem Verhältnis vertreten. Das Durchschnittsalter der Patienten war in Gruppe A am niedrigsten und in Gruppe C am höchsten. Übereinstimmend mit diesen Befunden wird eine Geschlechtsabhängigkeit des VWF nicht beschrieben. Ferner steigt der VWF ab dem 40. Lebensjahr um etwa 0,06 U/ml für jedes Jahrzehnt an (Schneppenheim/Budde, 2010), was die Altersverteilung unserer Patienten erklären könnte.

Nicht alle Faktoren, die zu der Streuung der VWF-Werte beitragen, sind bekannt: Ungefähr 60% der Schwankungen der VWF-Werte in der Normalbevölkerung sind auf genetische Faktoren zurückzuführen, die verbleibenden 40% sind abhängig von Umwelteinflüssen, wie Alter, Stress und Hormonen. Ein Drittel der genetischen Variabilität der VWF-Werte ergibt sich aus dem ABO-Blutgruppensystem. Die Identifikation der Einflüsse, die zu den restlichen zwei Dritteln der genetischen Komponenten beisteuern, steht noch aus (Levy et al, 2001).

4.5. Beurteilung der Gerinnungsparameter

Im Rahmen der Diagnostik bezüglich einer Blutungsneigung bzw. des Verlaufs einer Erkrankung und vor allem zum Ausschluss anderer Hämostasestörungen werden bei Patienten mit VWS weitere Gerinnungsparameter bestimmt.

Eine initiale laborchemische Gerinnungsdiagnostik umfasst in der Regel die Thrombozytenzahl sowie ein komplettes Blutbild, aPTT, TPZ und optional die Fibrinogenbestimmung. Mit diesen Untersuchungen kann ein VWS weder diagnostiziert, noch ausgeschlossen werden, aber sie können bezüglich einem Mangel an Gerinnungsfaktoren bzw. einer Thrombozytopenie als mögliche Ursache der klinischen Blutungsneigung wegweisend sein (Bethesda et al, 2007).

4.5.1. Thrombozytenzahl

Die Bestimmung der Thrombozytenzahl dient, wie schon erwähnt, vielmehr dem Ausschluss einer anderen primären Hämostasestörung. Bei Patienten mit VWS Typ 1 sind keine ursächlich zusammenhängenden Thrombozytopenien beschrieben, das bedeutet, dass eine Abweichung der Thrombozytenzahl vom Referenzbereich nicht zum Symptomenkomplex des VWS zählt.

Eine auffällige Thrombozytenzahl liefert demnach keinen Aufschluss bezüglich des Verdachts auf ein VWS, aber anhand dieser Untersuchung kann eine Aussage über eine Thrombozytopenie als potentielle Ursache für eine klinisch manifeste Blutungsneigung getroffen werden (Bethesda et al, 2007).

Die Thrombozytenzahl ist beim VWS Typ 1 im Normbereich (Laffan et al, 2004).

Die vorliegende Datenanalyse ergab, dass die Thrombozytenzahlen unserer Patienten mit VWS Typ 1 bis auf zwei Werte, wovon einer im Sinne einer Thrombozytose stark erhöht war, im Normbereich (150-400 Giga/l) lagen. Damit konnte eine Thrombozytopenie als Ursache für die klinische Blutungsneigung ausgeschlossen werden.

4.5.2. Aktivierte Partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

Die aPTT ist ein Funktionstest, mit dem Störungen im intrinsischen Gerinnungssystem festgestellt werden können. Die Aktivierung erfolgt durch ein partielles Thromboplastin. Es handelt sich dabei um Phospholipide, denen der Proteinanteil fehlt und die daher als partielle Thromboplastine bezeichnet werden. Für den vollständigen Ablauf der endogenen Gerinnung wird zusätzlich ein Oberflächenaktivator benötigt. Daher wird der Test aktivierte Thromboplastinzeit genannt (Thomas, 2008). Die aPTT reagiert auf Störungen der Faktoren I, II, V, VIII, IX, X, XI und XII (Favaloro et al, 1999).

Die orientierende Gerinnungsdiagnostik (Routinediagnostik) ist bei den meisten VWS Patienten unauffällig oder kann eine isolierte verlängerte aPTT aufweisen. Diese hängt von der verbleibenden Faktor VIII-Aktivität ab (Laffan et al, 2004) bzw. korreliert mit der Faktor VIII-Aktivität (Israels et al, 2002). Schwere Formen des VWS mit deutlicher FVIII-Verminderung fallen durch eine verlängerte aPTT auf.

In der vorliegenden Datenanalyse lagen bei 47 Patienten die Werte der aPTT im Normbereich (26-36 sec). Auffällig war eine mäßig bis stark verlängerte aPTT bei 26 unserer Patienten, wobei nur bei 5 dieser Patienten eine zusätzliche Verminderung der

Faktor VIII-Aktivität nachweisbar war. Demgegenüber steht die Aussage, dass speziell bei der milderen Form des VWS, dem Typ 1, die aPTT meistens normwertig ist und eine Verlängerung nur in Kombination mit verminderter Faktor VIII-Aktivität imponiert (Israels et al, 2002). Da jedoch Faktor XII-Verminderungen beim VWS nicht selten sind, kann ein VWS durch eine verlängerte aPTT in der Routineuntersuchung auffallen, auch wenn die FVIII-Aktivität normal ist (Schneppenheim/Budde, 2010).

In der Literatur wird einheitlich beschrieben, dass die aPTT vermutlich nur in Bezug auf die Diagnosefindung eines schweren VWS Typ 3 wegweisend ist. Bei der Diagnostik von milderen Formen des VWS wird deutlich, dass die meisten Patienten Werte im Normbereich aufweisen (Nichols et al, 2009).

Obleich die aPTT beim VWS verlängert sein kann, schließt ein Wert im Normbereich, da die Faktor VIII-Aktivität oftmals im normalen Messbereich liegt, die Diagnose eines VWS nicht aus. Überdies sollten bei Verdacht auf ein VWS immer spezifische Untersuchungen durchgeführt werden (Bethesda et al, 2007).

Somit ist die aPTT aufgrund der biologischen, pathologischen und analytischen Variabilität kein sensitiver Test für das VWS (Schneppenheim/Budde, 2010).

4.5.3. Thromboplastinzeit (TPZ)

Die Bestimmung der TPZ ist die häufigste laborchemische Untersuchung zur Beurteilung der plasmatischen Gerinnung. Bei der Methode nach Quick wird im thrombozytenarmen Plasma nach Zusatz von Gewebsthromboplastin und Kalziumionen die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin gestartet und Fibrinogen in Fibrin überführt. Die Fibrinbildungszeit (Gerinnungszeit) wird in Sekunden gemessen.

Die Gerinnungsaktivität des TPZ-Tests wird meist in Prozent der Norm angegeben. Die Umrechnung der gemessenen Sekundenwerte in Prozent erfolgt anhand einer Bezugskurve, die unter anderem durch Verwendung käuflicher Kalibrationsplasmen erstellt wird (Thomas, 2008).

Die Thromboplastinzeit (Quick-Test) lag bei allen Patienten im Normbereich (70-130%), sodass eine zusätzliche Hämostasestörung im extrinsischen System ausgeschlossen werden konnte.

4.5.4. Fibrinogen

Fibrinogen (Gerinnungsfaktor I) ist ein Glykoprotein und wird bei der Blutgerinnung durch Thrombin (Faktor IIa) und Kalzium (Faktor IV) in Fibrin umgewandelt und bildet zusammen mit den Thrombozyten den Thrombus. Es ist als lösliches Protein im Blut oder der interstitiellen Flüssigkeit definiert, das in Gegenwart von Thrombin in eine unlösliche Netzwerkstruktur umgewandelt wird. Dieses Netzwerk dient der Stabilisierung von adhärennten und aggregierten Thrombozyten einen soliden Blutpfropfen zu bilden und ihn mit der Umgebung zu fixieren.

Die Fibrinogenbestimmung gehört zu den globalen Gerinnungstests und liegt aufgrund fehlender Sensitivität für das VWS meist im Referenzbereich (Budde et al, 2004).

Die Fibrinogen-Werte sind bei Patienten mit VWS immer normal (Laffan et al, 2004).

Eine Verminderung des Fibrinogens konnte anhand der Daten unserer Patienten ebenfalls in keinem Fall nachgewiesen werden. Im Widerspruch dazu war bei 13 Patienten sogar ein mäßig erhöhter Fibrinogen-Wert auffällig (Normbereich 1,77-4,00g/l). Diese erhöhten Werte könnten mutmaßlich in Zusammenhang mit einem zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestehenden Infekt oder aber mit einer Fehlbestimmung bei nicht sachgemäßer Probenentnahme, Lagerung und Aufbereitung erklärt werden. Eine Korrelation zwischen den erhöhten Werten und der Ausprägung der hämorrhagischen Diathese kann jedenfalls ausgeschlossen werden.

4.5.5. Faktor VIII-Aktivität

Der VWF hat eine Bindungsregion für den FVIII, die D'-Domäne. Zwischen freiem und an VWF gebundenem FVIII besteht ein Gleichgewicht, bei dem ca. 95% des zirkulierenden FVIII an VWF gebunden sind und so vor proteolytischem Abbau geschützt werden. Ohne diese Bindung hat der FVIII eine Halbwertszeit von 3 Stunden, an VWF gebunden dagegen ist die Halbwertszeit mit 12-14 Stunden deutlich länger. Sobald die VWF-Konzentration nicht ausreicht, den FVIII effektiv zu stabilisieren, kommt es zur FVIII-Verminderung. Die Mehrzahl der VWS Patienten haben jedoch eine normale FVIII-Aktivität, solange genügend VWF (>0,3U/ml) im Plasma vorhanden ist, um den FVIII zu stabilisieren (Schneppenheim/Budde, 2010).

Prinzipiell gibt es verschiedene Möglichkeiten der FVIII-Messung. Die häufigste Bestimmung der FVIII-Aktivität erfolgt mit dem sogenannten Einstufentest, der am ehesten dem biologischen Milieu entspricht. Er ist eine Variante der aPTT mit der Fibrinbildung als Endpunktmessung. Die Gerinnungszeit wird dabei wie bei der aPTT

primär von der FVIII-Aktivität durch Thrombin bestimmt (Hemker et al, 1991). Die Aktivität des FVIII wird im aPTT-System mit spezifischen Mangelplasmen ermittelt. Die Werte sollten zwischen 50% bis 150% (Mannucci et al, 1999) liegen. Personen mit der Blutgruppe 0 zeigen niedrigere Werte, erhöhte Werte werden bei Einnahme von Ovulationshemmern, Schwangerschaft, Akutphasereaktionen (CRP-Erhöhung), Stress, nach Operationen, Lebererkrankungen, Tumoren, Gefäßerkrankungen und steigendem Alter gefunden (Barthels, 2013).

Bei der vorliegenden Datenanalyse konnte die bekannte und nicht seltene Verminderung der FVIII-Aktivität im Zusammenhang mit dem VWS nur bei 7 Patienten nachgewiesen werden. Allerdings trat dieser FVIII-Mangel nur in 5 Fällen in der typischen Kombination mit besonders niedrigen Werten des VWF-Antigens auf.

Ogleich die FVIII Halbwertszeit durch den VWF reguliert wird und beim VWS nicht selten vermindert ist, entsprechen die FVIII:C-Werte nicht immer den Werten des Plasma VWF und können beim VWS auch normwertig sein. Eine Bestimmung der FVIII-Aktivität im Referenzbereich schließt demzufolge ein VWS nicht aus (Laffan et al, 2004).

Eine weitere Erklärung für die geringe Anzahl der Patienten mit niedrigen FVIII:C-Werten könnten die drei bekannten Mechanismen, die zum VWS Typ 1 führen können, liefern. Einer dieser Mechanismen ist die verminderte Synthese des VWF, die zu einer erniedrigten Konzentration des VWF im Plasma und auch in den Thrombozyten führt. Da die FVIII-Bindungskapazität des VWF sehr groß ist und im Normalfall nur etwa 2% der Bindungsstellen besetzt sind, ist die FVIII-Aktivität bei diesem Mechanismus deutlich höher als das VWF-Antigen. Die Konstellation FVIII-Aktivität > VWF-Antigen ist ebenfalls bei einigen Typ 2- Mutationen typisch, die stark abnorm gefaltete Produkte produzieren. Diese werden intrazellulär zerstört und daher nicht sezerniert, so dass die in geringer Menge produzierten normalen Dimere, die weiter den Prozess der Multimerisierung, Speicherung und Sekretion durchlaufen, übrig bleiben (Schneppenheim/Budde, 2010).

Mit diesen beiden Mechanismen könnten die normwertigen FVIII:C-Werte, die bei den meisten unserer Patienten nachweisbar waren, begründet werden.

Zur Erklärung der verminderten FVIII:C-Werte kommt der dritte bekannte Mechanismus, der beschleunigte Abbau in der Zirkulation, in Betracht, bei dem der FVIII/VWF-Komplex aus dem Plasma entfernt wird. Der beschleunigte Abbau bei der Blutgruppe 0 im Vergleich zu den anderen Blutgruppen ist lange bekannt. Dabei sind

FVIII-Aktivität und VWF-Antigen gleichermaßen vermindert (Schneppenheim/Budde, 2010).

4.6. Zusammenhang von klinischer Blutungssymptomatik mit Lebensalter und Geschlecht

In der vorliegenden Datenanalyse zeigte die Einteilung nach Schweregrad der Blutungssymptomatik in Korrelation mit dem Lebensalter ein deutlich höheres Durchschnittsalter bei den Patienten, die dem Blutungsscore 3 und 4 zugeteilt wurden. Dies lässt darauf schließen, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines schweren Blutungsereignisses mit der Lebensdauer steigt bzw., dass der Einfluss von Vorerkrankungen und die Häufigkeit von Operationen ein höheres Blutungsrisiko darstellen.

Insgesamt waren bei der Analyse mehr Daten von weibliche Patienten (n=49) vorhanden. Im Verhältnis von weiblichen und männlichen Patienten war die Ausprägung der Blutungssymptomatik ähnlich, sodass geschlechtsspezifisch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Blutungsscore-Zuteilung festgestellt werden konnten.

Die Mehrzahl der Patienten konnte mit mäßiger Blutungssymptomatik dem Blutungsscore 2 zugeordnet werden.

Unsere Ergebnisse bezüglich des Alters in Korrelation mit der klinischen Blutungsneigung (Blutungsscore 1-4) und dem Geschlecht lieferten keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Patienten. Eine milde oder moderate Blutungssymptomatik konnte wesentlich häufiger nachgewiesen werden als die schwere Form. Eine Wechselwirkung zwischen den Faktoren konnte ausgeschlossen werden.

Eine Studie zeigte in Übereinstimmung mit unseren Resultaten, dass Patienten mit schweren Blutungsereignissen durchschnittlich ein höheres Lebensalter aufweisen als die mit milderer Symptomatik ($p=0,01$). Die zusätzlich formulierte Prädominanz von weiblichen Patienten ($p=0,018$) bezüglich stärker ausgeprägter Blutungsneigung (Pereira et al, 2003) konnten wir nicht bestätigen.

In einer weiteren Untersuchung wurde das Blutungsrisiko von Patienten mit VWS als scheinbar lebenslang konstant erhöht, vermittelt durch höhere Blutungsscores mit zunehmendem Alter und bei Männern und Frauen gleichermaßen vertreten (Tosetto et al, 2006), beschrieben.

4.7. Zusammenhang von klinischer Blutungssymptomatik und Funktion des VWF

Im Wesentlichen ist nicht bekannt, ob verschiedene Blutungssymptome speziell bei bestimmten Formen des VWS auftreten, und ob die Präsenz gewisser Blutungssymptome Blutungsereignisse in bestimmten Situationen, wie beispielsweise einer chirurgischen Behandlung, sogar prognostizieren kann. Ebenfalls unbekannt ist der Grad des Zusammenhangs von Blutungssymptomen und laboranalytischen VWF-bezogenen Messwerten. Anhand der Resultate einer europäischen Multicenter-Studie zur quantitativen Analyse der Blutungssymptomatik bei VWS Typ 1 wird eine enge Korrelation von Ausprägung der Blutungssymptome und der laboranalytisch ermittelten VWF-Werte beschrieben. Hierbei wird ein deutlicher Zusammenhang zwischen Schwere des klinischen Krankheitsbilds und Werten an zirkulierendem Plasma-VWF und FVIII herausgearbeitet. Die Zuweisung zum höchsten Blutungsscore ist dabei mit den niedrigsten Werten sowohl der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität als auch des VWF-Antigens sowie der FVIII-Aktivität assoziiert. Interessanterweise wird diese Verbindung als linear dargestellt. Zudem wird festgestellt, dass Patienten mit stark ausgeprägten Schleimhautblutungen häufiger Blutungskomplikationen nach invasiven Prozeduren (Zahnextraktion oder chirurgische Intervention) aufweisen. Ferner kann die Verwendung eines standardisierten Blutungsscores unter Umständen sinnvoll sein, um den Zusammenhang der VWF-Funktion mit der Blutungsneigung zu analysieren, ein mögliches VWS Typ1 zu diagnostizieren und das Blutungsrisiko für Patienten mit VWS zu beurteilen (Tosetto et al, 2006).

Die Ergebnisse unserer Datenanalyse aber verdeutlichen, dass aufgrund der Laborparameter keine Prognose für den Schweregrad der Blutungsneigung möglich ist bzw. kein Zusammenhang zwischen Laborwerten und klinischer Expressivität hergestellt werden kann. Die Variation der Werte von Ristocetin-Cofaktor-Aktivität und VWF-Antigen waren sowohl bei Patienten mit schwerer Blutungssymptomatik als auch bei Patienten mit einer milderer klinischen Ausprägung ähnlich. So liegt die Vermutung nahe, dass andere Faktoren die Blutungssymptomatik mitbestimmen bzw. dass der Funktion der Thrombozyten ebenfalls eine entscheidende Bedeutung bezüglich der klinischen Expressivität bei VWS Typ 1 zukommt.

Die Interaktion zwischen umweltbedingten und genetischen Faktoren, wie dem ABO-Blutgruppensystem und anderen, noch nicht erkannten Einflüssen, führt zu einem Spektrum an VWF-Werten bei nicht erkrankten Personen, die sich signifikant mit den bei VWS-Patienten gemessenen VWF-Werten überschneiden. In Anbetracht dieser

Schwankungen und der Schwierigkeit einen Grenzwert für den VWF festzulegen, könnte es hilfreich sein, den Wert des VWF nicht als komplexes oder quantitatives Merkmal zu betrachten (Levy et al, 2001). Vergleichsweise gemessen an begrenzten Cholesterin- oder Blutdruckwerten, die das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen reduzieren, könnte die empirische Behandlung zur Anhebung des VWF-Spiegels bei Patienten mit vermindertem VWF das Blutungsrisiko minimieren bzw. Blutungsereignisse kontrollieren (Sadler et al, 2003).

Die genetische Komponente von komplexen Merkmalen beinhaltet oft eine Vielzahl von Genen, von denen jedes nur einen kleinen Effekt beiträgt, was aber in Kombination zu einer klinisch bedeutsamen Erkrankung führen kann (Levy et al, 2001).

Demzufolge wird die Variabilität der klinischen Ausprägung des VWS unter anderem sowohl durch genetische Faktoren, die den VWF direkt als Molekül betreffen als auch durch seine Bildungsweise beeinflusst. Einer dieser Faktoren ist die Vielzahl von Mutationen des VWF-Gens (Eikenboom et al, 1993). Die Verbindung der Blutgruppe 0 mit leicht erniedrigten VWF-Werten (Gill et al, 1987) wurde bereits erläutert. Außerdem wurde dem Mitwirken des in den Thrombozyten gebildeten VWF bei deren Adhäsion an Kollagen in Bezug auf das VWS Typ 1 eine besondere Bedeutung zugesprochen (D'Alessio et al, 1990).

Der VWF wird in Megakaryozyten synthetisiert. Bis eine Sezernierung aus den Thrombozyten ins Plasma stattfindet, ist der VWF vor spaltenden Proteasen geschützt. Dabei repräsentiert der thrombozytäre VWF das ursprünglich gebildete Molekül (Budde et al, 2004). Die durch Thrombin gesteuerte lokale Freisetzung von thrombozytärem VWF erhöht die lokale VWF-Konzentration an verletzten Gefäßarealen und kann so niedrige Plasmaspiegel des VWF kompensieren. Daher ist die Blutungsneigung bei Patienten mit erniedrigtem thrombozytärem VWF trotz gleicher Konzentration an plasmatischem VWF wesentlich stärker ausgeprägt als bei Patienten mit normalem intrathrombozytärem VWF (Schneppenheim/ Budde, 2010).

Die Analyse von thrombozytärem VWF-Antigen und Multimeren kann bei Diagnostik und Identifikation der VWS Subtypen von Wert sein (Ruggeri et al, 1987). Schwere Formen des VWS Typ 1 können durch das Vorhandensein des thrombozytärem VWF vom VWS Typ 3 unterschieden werden. Für die Bestimmung des thrombozytärem VWF ist die Herstellung eines Thrombozytenlysats nötig, wobei die Kontamination der Thrombozyten mit Plasma-VWF ausgeschlossen werden muss. Diese Bestimmungen sind brauchbar, wenn die Blutungstendenz diskrepant zum Wert des Plasma-VWF

erscheint (Laffan et al, 2004). Bislang gibt es aber für die Bestimmung des thrombozytären VWF-Antigens keinen Standard und somit existieren keine anerkannten Untergrenzen des thrombozytären VWF.

Für die Methode zur Lyse von Thrombozyten ist ebenfalls kein Standard festgelegt (Budde et al, 2004).

Die Unabhängigkeit der klinischen Blutungsneigung von laborchemischen Messungen, wie für das VWS Typ 1 als typisches Merkmal beschrieben, wird anhand unserer Analyse bestätigt. Es besteht kein kennzeichnender Zusammenhang zwischen den Laborparametern und der Ausprägung der hämorrhagischen Ereignisse. So gibt es bei unseren Patienten in der Gruppe A mit niedrigen VWF-Werten sowohl schwere als auch milde Blutungsereignisse, ebenso, wie in der Gruppe C, in der Patienten mit an den Normbereich grenzenden VWF-Werten erfasst waren. Die Mehrzahl der Patienten konnte, wie oben schon beschrieben, dem mittleren Bereich (Gruppe B) zugeordnet werden, in dem ebenfalls alle vier Schweregrade der Blutungssymptomatik in ähnlichem Verhältnis wie bei den Gruppen A und C vorhanden waren.

Da Blutungsereignisse eine hohe Prävalenz in der Normalbevölkerung aufweisen, könnte es nahezu unmöglich sein einen kausalen Zusammenhang zwischen Blutung und niedrigem VWF-Werten zu etablieren (Bethesda et al, 2007).

Viele Menschen haben unspezifische Blutungssymptome. VWF-Werte zeigen eine geringe Reproduzierbarkeit und niedrige VWF-Werte sind ein schwacher Risikofaktor für Blutungsereignisse. Demzufolge treten Blutungen und niedrige VWF-Werte oft zufällig zusammen auf. Gerade mit strengen Diagnosekriterien, basierend auf der Kombination von Blutungssymptomen, niedrigem VWF-Wert und einer positiven Familienanamnese, ist das Vorkommen von falsch-positivem VWS Typ 1 mit der publizierten Prävalenz der Erkrankung vergleichbar. Demzufolge haben viele Patienten mit der Diagnose VWS Typ 1 überhaupt keine spezifische Hämorrhagie, was den Nutzen der Diagnose in Frage stellt (Sadler et al, 2003).

Für die Schwierigkeit beim VWS eine typische Blutungsanamnese zu definieren, gibt es zumindest zwei Erklärungen. Zum einen zeigt das VWS Typ 1 eine hoch variable Heterogenität der klinischen und laboranalytischen Eigenschaften, möglicherweise aufgrund zusätzlicher genetischer Mechanismen (Kunicki et al, 2004) und daraus resultierend eine erhebliche Überschneidung von hämorrhagischen Symptomen bei betroffenen Patienten und gesunden Individuen (Abildgaard et al, 1980; Gill et al, 1987). Zum anderen existiert eine enorme Unentschiedenheit, brauchbare Kriterien für

eine klinisch sinnvolle Diagnose eines VWS Typ 1 festzulegen (Sadler et al, 2000). Beispielsweise, gerade vermeintlich konservative Kriterien verwendend (wenigstens zwei Familienmitglieder mit jeweils zwei hämorrhagischen Symptomen und erniedrigten VWF-Werten), kann bei bis zu 1% der Normalbevölkerung ein VWS Typ 1 diagnostiziert werden (Rodeghiero et al, 1987). Doch werden die meisten dieser Familien auch zukünftig keinerlei medizinische Hilfe benötigen (Castaman et al, 1999). Sicherlich können diese Kriterien dem klinischen Alltag nicht gerecht werden und es besteht ein dringendes Bedürfnis, bessere, stringenter Kriterien, möglicherweise mit dem Ergebnis einer spezifischeren und klinisch sinnvollen Diagnose (Rodeghiero et al, 2005) zu etablieren.

4.8. Einfluss des GP Ia-Polymorphismus

4.8.1. GP Ia/IIa-Rezeptor

Dem Kollagen kommt bezüglich der Thrombozytenadhäsion bei Läsionen des Subendothels eine wichtige Rolle zu. Zudem stellt Kollagen eine wichtige Bindungsstelle für Thrombozyten dar, denn es löst die Thrombozytenaktivierung und damit die Aggregation aus (Sixma et al, 1997).

An der Mediation der Thrombozytenadhäsion ans Subendothel sind einige Glykoproteine an der Thrombozytenoberfläche beteiligt. Der erste Mechanismus, die Bindung der Thrombozyten an subendotheliale Strukturen hängt von der Interaktion des GP Ib/IX-Rezeptors mit dem VWF ab. Im zweiten Mechanismus bindet der GP Ia/IIa-Rezeptor auf der Thrombozytenmembran an das subendotheliale Kollagen, was einen entscheidenden Faktor im Hinblick auf die Thrombozytenaktivierung bzw.- aggregation darstellt (Kritzik et al, 1998; Galnick et al, 1996; Nieuwenhuis et al, 1985; Santoro et al, 1995).

Untersuchungen zu diesem Kollagen-Rezeptor GP Ia/IIa wurden bereits flächendeckend durchgeführt und sind ausführlich dokumentiert. (Simax et al, 1997; Santoro et al, 1995).

Das GP Ia/IIa ist ein bedeutsamer Kollagenrezeptor, der an den ersten Schritten der Thrombozytenadhäsion an Kollagen unter fließenden Bedingungen mit hohen Scherkräften beteiligt ist (Alberio et al, 1999; Verkleij et al, 1998). Es wurde gezeigt, dass der GP Ia/IIa-Rezeptor von verschiedenen Agonisten aktiviert wird, einschließlich

Thrombin und Adenosindiphosphat (ADP) und dies zu unterschiedlicher Affinität der Kollagenbindung am Rezeptor führt (Jung et al, 2000).

4.8.2. GP Ia-Polymorphismus

Die Variabilität der GP Ia/IIa-Rezeptordichte auf der Thrombozytenoberfläche wurde an stichprobenartig ausgewählten Individuen untersucht (Kunicki et al, 1993). Einige Zeit später konnte ein genetischer Marker für diese Variabilität als ITGA2-Gen identifiziert werden (Kunicki et al, 1997).

Der Zusammenhang eines Einzelnukleotidpolymorphismus an Position 807 des ITGA2 Gens mit der thrombozytären GP Ia/IIa-Rezeptordichte wurde statistisch belegt. Dabei korrelierte das Allel TTC...ACG mit einer niedrigen GP Ia/IIa-Rezeptordichte auf der Thrombozytenoberfläche, wohingegen das komplementäre Allel (TTT...ACA) mit einer hohen Rezeptordichte verbunden war. Die Unterschiede der Rezeptordichte konnten in direkten Zusammenhang mit dem Verhältnis der Thrombozytenadhäsion an Kollagen unter fließenden Bedingungen gebracht werden (Kritzik et al, 1998).

Die Präsenz des Allels 807T korreliert mit einer erhöhten Reaktivität der Thrombozyten. So konnte nach Thrombozytenaktivierung mittels ADP (Adenosindiphosphat) festgestellt werden, dass der Genotyp homozygot T zu einer intensivierten Thrombozytenadhäsion an Kollagen Typ I führt (Boguslawka et al, 2003).

Entsprechend dazu, dass die Funktion der Thrombozytenadhäsion in der Hämostase bzw. die Thrombusbildung und das vermutete Zusammenwirken von umweltbedingten und genetischen Faktoren das Gesamtrisiko für Thrombosen bestimmen, könnte eine Dichteerhöhung der Kollagenrezeptoren einen potentiellen Risikofaktor für thrombotische Ereignisse repräsentieren (Corral et al, 1999).

Zudem konnte die Schlüsselrolle des GP Ia/IIa-Rezeptors, der primär die Thrombozytenadhäsion an Kollagen unter fließenden Bedingungen vermittelt, bezüglich der Thrombozytenfunktion und der Hämostase durch die Blutungstendenz bei Patienten mit Rezeptordefizit, bei denen die Bindung der Thrombozyten an Kollagen ausblieb, gezeigt werden (Saelman et al, 1994; Nieuwenhuis et al, 1985; Santoro et al, 1995; Sixma et al, 1995). Zusätzlich wurde beobachtet, dass Thrombozytenfunktionsstörungen in Bezug auf Adhäsion und Aggregation von GP Ia/IIa-Autoantikörpern im Serum verursacht werden können (Deckmyn et al, 1990).

4.8.2.1. Genotypfrequenz des GP Ia-Polymorphismus

In der vorliegenden Datenanalyse wurden die drei genotypischen Varianten des GP Ia-Polymorphismus, heterozygot CT, homozygot C und homozygot T von jedem Patient mit VWS Typ 1 erfasst, um einen möglichen Bezug zur Schwere der Blutungsneigung festzustellen.

Dabei wurde die Häufigkeitsverteilung der drei Genotypen ermittelt. Daraus resultierte, dass 35 Patienten den Genotyp heterozygot CT, 27 Patienten den Genotyp homozygot C und 11 Patienten den Genotyp homozygot T aufwiesen.

Das Allel 807C trat mit einer Häufigkeit von 0,61 auf und das Allel 807T konnte mit einer Frequenz von 0,39 nachgewiesen werden.

Um einen Vergleich zur Normalbevölkerung zu erlangen, wurde die Genotypfrequenz bei einer Kontrollgruppe ausgewertet, bei der es sich um Personen handelte, die im Gerinnungslabor des Universitätsklinikums Gießen untersucht und bei denen weder eine Blutungsneigung noch eine Mutation (Faktor V Leiden /Prothrombin /MTHFR) diagnostiziert worden war. Die Genotypfrequenz in dieser Kontrollgruppe war mit der Häufigkeitsverteilung bei den Patienten mit VWS Typ 1 vergleichbar.

Bei der Kontrollgruppe (n=72) waren die genotypischen Varianten folgendermaßen vertreten: Den Genotyp heterozygot CT wiesen 40 Personen, den Genotyp homozygot C 26 und den Genotyp homozygot T 6 Personen auf.

Die Allelfrequenz konnte mit 0,64 für 807C und 0,36 für 807T dargestellt werden.

Ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung des Allels 807C, das mit einer niedrigen GP Ia/IIa-Rezeptordichte korreliert, konnte zwischen unseren Patienten und Kontrollgruppe somit nicht gezeigt werden.

Diese Resultate entsprachen einer Studie, bei der die Allelfrequenz des C807T-Polymorphismus von 290 Personen aus der polnischen Bevölkerung ermittelt wurde. Hierbei wurde die Allelfrequenz für 807C mit 0,612 und für 807T mit 0,388 beschrieben (Boguslawa et al, 2003). In einer anderen Studie wurde der Zusammenhang von primären zerebralen Blutungsereignissen und thrombozytären Glykoproteinen, unter anderem GP Ia/IIa, geprüft. Dabei wurde die Allelfrequenz des GP Ia-Polymorphismus mit 0,617 für 807C und 0,383 für 807T bei den Studienpatienten nahezu übereinstimmend mit 0,624 für 807C und 0,376 für 807T bei der entsprechenden Kontrollgruppe bestimmt. Auch mit der regionalen Durchschnittsbevölkerung war die ermittelte Allelfrequenz vergleichbar (Iniesta et al, 2003). Auf die Konkordanz mit früheren Berichten über andere kaukasische

Populationen (Corral et al, 1999; Zhu et al, 2000; Lopez et al, 1994) wurde hingewiesen.

In einer weiteren Untersuchung dagegen konnte das Allel 807C bei Patienten mit VWS Typ 1 signifikant häufiger ($p = 0,007$) nachgewiesen werden als bei der entsprechenden Kontrollgruppe. Hier wurde die Allelfrequenz für 807C mit 0,71 und für 807T mit 0,29 angegeben (Di Paola et al, 1999). Diese häufigere Ausprägung des Allels 807C wurde mit dem Zusammenhang von stärkerer Blutungssymptomatik bei den Studienpatienten mit niedriger Rezeptordichte erklärt.

Ferner stellte sich die Häufigkeit des Genotyps homozygot T in den Kontrollgruppen zweier Studien (Morita et al, 2001; Croft et al, 1999) ebenfalls diskrepant zu unseren Ergebnissen dar. Dabei wurden die Ausprägungen des Allels 807T in beiden Kontrollgruppen höher als in der kaukasischen oder asiatischen Durchschnittspopulation beschrieben (Santoso et al, 1999; Matsubara et al, 1999). Somit wird deutlich, dass ein Selektionseffekt der Patienten und Kontrollgruppen von derartigen klinischen Studien unter Berücksichtigung von ethnischen und rassischen Einflüssen auf Allelfrequenzen ausgeräumt werden muss (Kunicki et al, 2001).

Demgegenüber wurde in einer weiteren Fall/Kontroll-Studie mit selektierten Risikofaktoren für arterielle Thrombosen kein signifikanter Unterschied in der Prävalenz der Allelfrequenz des GP Ia-Polymorphismus zwischen Studienpatienten und Kontrollgruppe gefunden. Das Allel 807C wurde hier bei 65% von 284 Blutspendern aufgezeigt, während das Allel 807T bei 35% nachweisbar war. Durch diese Verteilung der Allelvarianten des GP Ia-Polymorphismus bei Patienten mit hypertensiver Herzkrankheit, koronarer Herzerkrankung, sowie tiefer Beinvenenthrombosen konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die dazu gehörenden Kontrollgruppen herausgearbeitet werden. Außerdem entsprachen diese Resultate den Befunden, die in der Normalbevölkerung erhoben wurden (Corral et al, 1999).

4.8.3. GP Ia-Polymorphismus und VWF

Der VWF ist in inaktiver Form im Plasma, in einer aktiven Konfiguration im Subendothel, sowie in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen und den α -Granula der Thrombozyten, aus denen durch adäquate Stimuli die lokale Freisetzung erfolgt, enthalten. Bei Verletzung der Gefäßwand in einem Gebiet mit höheren Strömungsgeschwindigkeiten und größeren Scherkräften als im venösen System werden aktivierte Gerinnungsfaktoren weggeschwemmt, bevor der Gerinnungsprozess einsetzen

kann. An der Läsion führt die Interaktion zwischen GP Ib/IX-Komplex auf der Thrombozytenmembran, der keiner Aktivierung bedarf, und dem durch Scherstress aktivierten VWF zu initialen Thrombozytenadhäsion. Dies ist ein reversibler Vorgang, der nicht die stabile Anheftung, sondern lediglich die Verlangsamung der Bewegung fördert. Bei der gleichzeitigen Aktivierung der Thrombozyten dominieren die Kollagenrezeptoren GP Ia/IIa und GP VI. Zur stabilen Adhäsion an die Verletzungsstelle kommt es durch den aktivierten GP IIb/IIIa-Rezeptor. Die Brückenbildung zwischen diesem Rezeptor, Fibrinogen und VWF führt durch Thrombozyt-Thrombozyt-Interaktion zu Thrombozytenaggregation. Dieser Mechanismus ist insbesondere für die Gebiete mit hohen Scherkräften von Bedeutung, spielt aber auch im Niederdrucksystem der Venen und Venolen eine Rolle (Schneppenheim/Budde, 2010).

Die Vermutung, dass bei diesem schrittweise ablaufenden Vorgang der primären Hämostase eine Wechselwirkung zwischen Funktion des VWF und der Expression des Kollagenrezeptors GP Ia/IIa besteht, konnte anhand unserer Resultate nicht bestätigt werden. Ein Zusammenhang zwischen den zu Diagnostik und Verlauf erstellten Laborparametern von VWF-Antigen und Ristocetin-Cofaktor-Aktivität und der genotypischen Variante des GP Ia-Polymorphismus wurde nicht gefunden.

In einer anderen Untersuchung wurde beschrieben, dass die Thrombozytenadhäsion an Kollagen Typ I und III vom plasmatischen VWF abhängt, und dass sich diese Relation bei erhöhter GP Ia/IIa-Rezeptordichte auf der Thrombozytenoberfläche verstärkt. Dabei wurde die Vermutung unterstützt, dass die Thrombozytenadhäsion an Kollagen ein komplexer Mechanismus ist, bei dem die Geschwindigkeit der zirkulierenden Thrombozyten durch die Interaktion von GP Ib/IX mit an Kollagen Typ I und III gebundenen VWF vermindert wird, gefolgt von einer festen Bindung von GP Ia/IIa-Rezeptoren an Kollagen und anschließender Thrombozytenaktivierung und -aggregation (Verkleij et al, 1998; Savage, 1998). Ferner wurde aus den Befunden gefolgert, dass durch die Unterschiede des plasmatischen VWF und der GP Ia/IIa-Rezeptordichte auf der Thrombozytenmembran bei normalen Individuen eine Prognose für die Bindungsfähigkeit der Thrombozyten an Kollagen Typ I und III gemacht werden kann (Roest et al, 2000). Das Resultat, dass die Thrombozytenadhäsion an Kollagen Typ IV vorwiegend von der Expression der GP Ia/IIa-Rezeptoren sowie dem thrombozytären VWF abhängt, und nicht vom plasmatischen VWF, bestätigte die Aussage früherer

Befunde, dass der VWF ohne die Anwesenheit von Thrombozyten nicht an die Oberfläche von Kollagen Typ IV binden kann (van Zanten et al, 1996).

Um diese Befunde der Arbeitsgruppe um Roest nachzuvollziehen und einen möglichen Einfluss auf das klinische Ausmaß des VWS Typ 1 zu prüfen, müsste zusätzlich zu den Werten des Plasma-VWF, die Werte für den thrombozytären VWF bestimmt werden. Da es aber bislang für die Bestimmung des thrombozytären VWF-Antigens keinen Standard gibt und somit keine Festlegung von Grenzbereichen des thrombozytären VWF existiert, könnte eine Auswertung der Befunde schwierig werden.

Trotz der bisherigen Kenntnisse über den Ablauf der primären Hämostase und die Wechselwirkungen der einzelnen Komponenten kann anhand unserer Datenanalyse keine Prognose zur Ausprägung des klinischen Krankheitsbilds gemacht werden.

4.8.3.1. Genotypfrequenz des GP Ia-Polymorphismus in den Gruppen A-C

In der vorliegenden Datenanalyse wurde die Genotypfrequenz des GP Ia-Polymorphismus auf ihre Häufigkeitsverteilung in den drei Gruppen A-C überprüft. Dabei konnte keine Abhängigkeit der beiden Parameter festgestellt werden. Die unterschiedlichen Genotypen, heterozygot CT, homozygot C und homozygot T wurden in allen drei Gruppen in nahezu gleicher Verteilung gefunden. In der Gruppe A mit niedrigen VWF-Parametern (0-40%) war der Genotyp homozygot T, der eine erhöhte GP Ia/IIa-Rezeptordichte bewirkt, im Verhältnis sogar häufiger nachweisbar als in den anderen Gruppen.

Ein Zusammenhang der Genotypfrequenz mit den VWF-Werten und der daraus resultierenden Gruppeneinteilung konnte anhand unserer Ergebnisse nicht herausgearbeitet werden.

4.8.4. GP Ia-Polymorphismus bei thromboembolischen Ereignissen

Da ein Zusammenhang zwischen der Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen und der GP Ia/IIa-Rezeptordichte nachgewiesen werden konnte (Corral et al, 1999), ist es möglich, dass die variable Ausprägung der Rezeptordichte das Risiko sowohl für thromboembolische als auch für hämorrhagische Ereignisse in vivo beeinflusst. Während das Risiko für Gesunde offenbar zu vernachlässigen ist (Di Paola et al, 1999), kann es bei Personen, die aufgrund einer Hämostasestörung, unabhängig ob vererbt oder erworben, zu Thromboembolien oder Hämorrhagien neigen, zu einem entscheidenden Faktor werden.

Die Ausprägung des Allels 807T konnte mit einem erhöhten Risiko für thromboembolische Ereignisse in Korrelation gebracht werden. Beispielsweise wurde der Zusammenhang des GP Ia-Polymorphismus mit koronarer Herzerkrankung und Myokardinfarkt untersucht. Dabei konnte bei Patienten, die sich aufgrund einer bekannten koronaren Herzerkrankung oder zur diagnostischen Abklärung einer Koronarangiographie unterzogen, eine deutliche Verbindung des Allels 807T mit nichttödlichen Myokardinfarkten bei den Patienten, deren Lebensalter unter 62 Jahren lag, herausgearbeitet werden. Ein noch stärkerer Zusammenhang wurde bei den jüngsten 10% der Studienteilnehmer (<49 Jahre) gefunden (Santoso et al, 1999). Der Rückschluss, dass die Variation der GP Ia/IIa-Rezeptordichte einen wichtigen Einfluss auf akute thrombotische Ereignisse bei jüngeren Individuen haben könnte, wurde durch einige andere Studien bestätigt (Moshfegh et al, 1999; Corral et al, 1999; Roest et al, 2000).

Ergänzend dazu wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Ausprägung des Allels 807T und dem Risiko für ein ungünstiges Outcome jüngeren Patienten mit zerebrovaskulärer Erkrankung bzw. Hirninfarkt (Carlsson et al, 1999; Sacchi et al, 1999; Reiner et al, 2000) sowie diabetischer Retinopathie (Matsubara et al, 2000) gefunden.

Die meisten Gencodierungen für thrombozytäre Membranglykoproteine enthalten Polymorphismen, die potentiell die Rezeptorfunktion dieser Glykoproteine beeinflussen. Bei einigen dieser Polymorphismen wurde ein Zusammenhang mit vermehrter Thrombozytenadhäsion und -aggregation festgestellt. In einigen Studien wurde gezeigt, dass sie einen Risikofaktor für arterielle Thrombosen darstellen (Reiner et al, 2001).

Demgegenüber konnten andere wissenschaftliche Untersuchungen keinen Zusammenhang der Ausprägung des Allels 807T mit dem Auftreten eines Herzinfarkts nachweisen (Croft et al, 1999; Morita et al, 2001; Anvari et al, 2000). Allerdings wurden in zwei dieser Studien (Croft et al, 1999; Morita et al, 2001) die Häufigkeit des Genotyps homozygot T in den Kontrollgruppen höher als bei der kaukasischen oder asiatischen Durchschnittspopulation beschrieben (Santoso et al, 1999; Matsubara et al, 1999), und könnte damit die Ergebnisse deutlich beeinflusst haben (Kunicki, 2001).

Der Einfluss der GP Ia/IIa-Rezeptordichte als Risikofaktor für venöse Thrombosen konnte nicht nachgewiesen werden (Corral et al, 1999; Carlsson, 1999). Ein häufiger Befund ist die fehlende Korrelation von allen thrombozytären Glykoprotein-

Polymorphismen in Bezug auf thrombotische Ereignisse im venösen System (Kunicki, 2001).

4.8.5. GP Ia-Polymorphismus und Blutungsneigung

Obgleich demonstriert wurde, dass Polymorphismen der thrombozytären Membranglykoproteine eine Risikoerhöhung sowohl für Blutungsereignisse als auch für Thrombosen bieten können, wurde bei den Untersuchungen der prothrombotische Charakter stärker fokussiert. Allerdings kann es sein, dass unter bestimmten Bedingungen genetischen Varianten, die beeinträchtigend auf Struktur und Menge von thrombozytären Glykoproteinen wirken, ebenso eine Rolle bei hämorrhagischen Ereignissen zukommt. Nur wenige Studien haben den Einfluss dieser Polymorphismen mit hämorrhagischen Gerinnungsstörungen in Verbindung gebracht. In einer Studie wurde die schwere klinische Ausprägung der Blutungssymptomatik beim VWS assoziiert mit einer niedrigen GP Ia/IIa-Rezeptordichte demonstriert (Di Paola et al, 1999).

Desweiteren wurde die entscheidende Rolle des GP Ia/IIa als primärer Rezeptor, der die Thrombozytenadhäsion an Kollagen unter fließenden Bedingungen mediiert, in einem Bericht über einen Patienten mit komplettem GP Ia/IIa-Defizit, bei dem die Thrombozytenbindung an Kollagen ausblieb, beschrieben (Nieuwenhuis, 1985).

In einer anderen Studie über Patienten mit Glanzmann-Thrombasthenie, einer hereditären Thrombopathie mit stark erhöhter Blutungsneigung, die mit einer Genmutation verbunden ist, deren Defekte eine fehlende oder zumindest stark reduzierte Expression des Glykoproteinkomplexes GP IIb/IIIa auf der Thrombozytenoberfläche und daraus resultierend eine thrombozytäre Dysfunktion zur Folge haben (Caen, 1990), konnte der Zusammenhang von milderen Krankheitsverläufen mit einer bestimmten Allelvariante belegt werden (Ghosh et al, 2002).

Allerdings konnte der Zusammenhang zwischen erniedrigter Dichte der GP Ia/IIa - Rezeptoren an der Thrombozytenoberfläche, durch die die Bindung an Kollagen und damit die Adhäsion an subendotheliales Gewebe beeinträchtigt wird, und der Ausprägung der klinischen Blutungssymptomatik anhand unserer Resultate nicht bestätigt werden. Die Hypothese, dass bei Patienten mit dem Genotyp homozygot C häufiger schwere Blutungsereignisse auftreten, konnte durch unsere Datenanalyse nicht unterstützt werden. Ferner waren sogar die meisten Patienten mit dem Genotyp

homozygot C bezüglich ihrer Blutungsanamnese vielmehr der milderen Form der klinischen Ausprägung zuzuordnen. Ein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung des GP Ia-Polymorphismus zwischen VWS Typ 1 Patienten mit ausgeprägter Blutungssymptomatik und Patienten mit milden Verlaufsformen wurde nicht gefunden. Die Vermutung, dass die Existenz des Allels 807C einen zusätzlichen Risikofaktor für schwere Blutungsereignisse bei Patienten mit VWS Typ 1 bietet, konnte so durch unsere Ergebnisse nicht belegt werden.

Außerdem zeigten unsere Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine höhere Prävalenz für das mit der niedrigen Rezeptordichte assoziierte Allel 807C.

In einer Studie, die mehrere thrombozytäre Glykoproteine im Zusammenhang mit VWS Typ 1 untersuchte, konnten ebenso keine signifikanten Unterschiede zwischen symptomatisch auffälligen Patienten, asymptomatischen Studienteilnehmern und der Kontrollgruppe aufgezeigt werden. Gleichmaßen wurden keine signifikanten Differenzen in Bezug auf die Allelfrequenz an Position 807 des ITGA2 Gens in den Gruppen untereinander gefunden (Pereira et al, 2003).

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wurde in einer oben schon erwähnten Untersuchung die Ausprägung des Allels 807C bei Patienten mit VWS Typ 1 als signifikant höher ($p = 0,007$) als in der dazu gehörenden Kontrollgruppe beschrieben (Di Paola et al, 1999). In dieser Studie wurde bei Patienten mit VWS die Korrelation zwischen dem GP Ia-Polymorphismus und der Verschlusszeit in einem Plättchen-Funktions-Analysator (PFA-100), der die kapilläre Blutstillung durch Thrombozyten in vitro simuliert, untersucht. Dabei fließt antikoaguliertes Blut über eine Kapillare durch eine Öffnung in einer mit aktivierenden Substanzen beschichteten Membran. Durch Thrombozytenadhäsion und -aggregation verschließt sich die Öffnung und die Zeit bis zum Stillstand des Blutflusses wird als Verschlusszeit in Sekunden gemessen. Der PFA-100 ist somit eine schnelle und simple Methode, um funktionelle Defekte in der Interaktion zwischen Thrombozyten und VWF zu detektieren. Dabei wird die primäre Hämostase in einer Umgebung mit hohen Scherkräften, die bei Verletzungen von kleinen Blutgefäßen auftreten, simuliert (Laffan et al, 2004). Die verlängerten Verschlusszeiten im PFA-100 wurden dabei stellvertretend für die Ausprägung der Blutungsneigung bei Patienten mit VWS Typ 1 ($n=32$) analysiert. Bei kritisch niedriger Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (<30 IU/dl) konnte kein Alleleffekt bezüglich der Verschlusszeit festgestellt werden. Bei diesen Patienten mit VWS Typ 1, bei denen die Ristocetin-Cofaktor-Aktivität mit weniger als 30 IU/dl bestimmt wurde, wurde der

Kollagenrezeptordichte eine untergeordnete Rolle zugeschrieben, da die Thrombozytenadhäsion dieser Patienten ohnehin gestört war. Dies wiederum könnte eine Erklärung dafür liefern, dass Patienten mit VWS Typ 3 keine signifikanten Unterschiede der Allelfrequenz im Vergleich zur Normalbevölkerung aufweisen (Di Paola et al, 1999). Allerdings konnte bei Patienten mit Ristocetin-Cofaktor-Aktivität im Bereich zwischen 40 IU/dl und 80 IU/dl der Einfluss des GP Ia-Polymorphismus für die Thrombozytenadhäsion an Kollagen als evident dargestellt werden, da Patienten mit dem Genotyp homozygot C mit ähnlicher oder identischer Ristocetin-Cofaktor-Aktivität in diesem Bereich eine signifikant längere Verschlusszeit aufwiesen. So könnte eine niedrige GP Ia/IIa-Rezeptordichte, die wie dargestellt mit verminderter Adhäsion an Kollagen korreliert, in Kombination mit niedriger VWF-Aktivität zusätzlich die Adhäsion von Thrombozyten an verletztes Endothel beeinträchtigen. Die Differenzen in den Verschlusszeiten zwischen Patienten mit dem Genotyp homozygot C und denen mit dem Genotyp homozygot T waren statistisch signifikant ($p = 0,018$). Demnach zeigte diese Studie an Patienten mit VWS Typ 1 eine signifikant höhere Prävalenz des Allels 807C, das mit einer niedrigen Rezeptordichte verbunden ist. Eine Begründung für diese erhöhte Prävalenz war die größere Wahrscheinlichkeit, mit der Patienten mit niedrigen VWF-Werten und einer ausgeprägten Blutungssymptomatik diagnostiziert wurden. Da ein Zusammenhang zwischen verlängerter Verschlusszeit und dem Genotyp für niedrige Rezeptordichte bei Patienten mit VWS Typ 1, deren Werte der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität im Bereich von 40 IU/dl bis 80 IU/dl lagen, hergestellt werden konnte, wurde der Einfluss der GP Ia/IIa-Rezeptordichte auf die Thrombozytenadhäsion und die damit verbundene Tendenz zu schweren hämorrhagischen Ereignissen als ursächlich für die Variabilität der Blutungssymptomatik beschrieben (Di Paola et al, 1999).

Die Diskrepanz in den Ergebnissen der oben aufgeführten Untersuchungen wurde darauf zurückgeführt, dass in der Pereira-Studie fast alle Studienpatienten eine Ristocetin-Cofaktor-Aktivität unter 50 IU/dl aufwiesen, was in der Studie von Di Paola nicht der Fall war. Dort wurde aber dargestellt, dass der Alleleffekt bei niedriger Ristocetin-Cofaktor-Aktivität bei der Verschlusszeit-Bestimmung im PFA-100 System entfällt. Diese Beobachtung wiederum konnte von Pereira bei VWS Typ 1 Patienten (n=52) bestätigt werden.

Unsere Ergebnisse aber zeigen, dass die Dichte der GP Ia/IIa-Rezeptoren an der Thrombozytenoberfläche keinen zusätzlichen Faktor darstellt, der die Schwere der Blutungssymptomatik bei Patienten mit VWS Typ 1 beeinflusst, unabhängig von

niedrigen oder an den Referenzbereich grenzenden VWF-Werten. Mit unseren Resultaten kann ein signifikanter Zusammenhang der Genotypfrequenz weder mit der klinischen Ausprägung noch mit den laboranalytischen Werten (VWF-Antigen und Ristocetin-Cofaktor-Aktivität) hergestellt werden.

Ein Erklärungsversuch für diese differenten Resultate im Vergleich zu den oben beschriebenen Studien könnte in den Abweichungen der Untersuchungsdurchführung zu finden sein. In Übereinstimmung mit der Studie von Peirera zeigen auch unsere Ergebnisse keinen evidenten Zusammenhang zwischen GP Ia-Polymorphismus und Blutungstendenz, obgleich unsere Patienten sowohl niedrige als auch an den Normbereich grenzende VWF-Werte aufwiesen. Von Di Paola allerdings wurde der Einfluss der GP Ia/IIa-Rezeptordichte mittels Bestimmung der Verschlusszeit in einem PFA repräsentativ für die Ausprägung der Blutungssymptomatik bei Patienten mit VWS Typ 1 dargestellt. Eine genaue Blutungsanamnese der Patienten wurde dabei nicht berücksichtigt. Der PFA-100 scheint aufgrund der hohen Sensitivität ein brauchbarer Screening-Test für das VWS zu sein und die Bestimmung der Verschlusszeit im PFA-100-System erfasst zwar zuverlässig moderate und schwere Erkrankungen, kann aber die natürlichen Schwankungen, die die Beurteilung der VWF-Werte so schwierig machen, nicht umgehen. Der PFA-100 kann bei der initialen Untersuchung von Patienten mit einer mutmaßlichen Gerinnungsstörung als Alternative zur Blutungszeit genutzt werden, bedarf aber weiterer Kontrollbestimmungen (Laffan et al, 2004). Somit ist die laboranalytische Untersuchung im PFA-100 eine Momentaufnahme und kann daher im Grunde nicht stellvertretend für eine über den gesamten Lebenszeitraum erhobene Blutungsanamnese gewertet werden.

Obgleich Patienten mit auffälliger Blutungsneigung mutmaßlich mit höherer Wahrscheinlichkeit diagnostiziert werden, konnte in der vorliegenden Datenanalyse dennoch keine gehäufte Verbindung zu dem Genotyp mit Rezeptormangel hergestellt werden. Entsprechend konnte mit unseren Resultaten anhand der Genotypverteilung des GP Ia-Polymorphismus die Variabilität der klinischen Blutungssymptomatik bei Patienten mit VWS Typ 1 nicht erklärt werden.

5. Schlussfolgerung für die klinische Praxis

Das von Willebrand-Syndrom ist eine komplexe und sehr unterschiedlich ausgeprägte Blutungsneigung. In Bezug auf den molekularen Charakter, die Diagnostik und die Behandlung des VWS wurden im Laufe der Zeit viele Fortschritte gemacht. Die Erkrankung hat aufgrund der quantitativen oder qualitativen Abweichungen des VWF einen sehr heterogenen Charakter. Bei den meisten Fällen besteht ein partieller quantitativer Mangel des VWF (VWS Typ 1), das autosomal dominant vererbt wird und generell eine milde bis moderate Blutungsneigung aufweist. Eine bedeutsame Eigenschaft des VWS Typ 1 ist die extrem variable Ausprägung mit signifikanten Unterschieden in der Blutungstendenz der Betroffenen (Levy et al, 2001; Rodeghiero et al, 2002). Aus klinischer Sicht ist es schwierig, die erheblichen Variationen hinsichtlich der Häufigkeit und dem Schweregrad der Blutungssymptome bei Patienten mit ähnlichen Laborparametern bezüglich der Menge und der Aktivität des VWF zu verstehen.

Trotz der offenkundigen Differenzen der klinischen Ausprägung bei Patienten mit VWS Typ 1 sind die Aktivitätsunterschiede des VWF sowohl bei schwerer Blutungssymptomatik als auch bei den mildereren Formen ähnlich, so liegt die Vermutung nahe, dass andere sowohl genetische als auch nicht genetische Faktoren die Wahrscheinlichkeit von Blutungsereignissen bei diesen Patienten beeinflussen. In diesem Kontext wurde angedeutet, dass Unterschiede in der Thrombozytenfunktion die klinische Expressivität verschlimmern bzw. mildern könnten (Di Paola et al, 1999; Rodeghiero et al, 2002).

Da eine Verbindung zwischen Polymorphismen thrombozytärer Glykoproteine und damit verbundener Varianten der Rezeptorfunktion und dem erhöhten Risiko für arterielle Thrombosen hergestellt werden konnte, wurde geprüft, ob die Existenz einer dieser Polymorphismen die Blutungsmanifestation von Patienten mit VWS Typ 1 zusätzlich beeinflusst.

Entsprechend der entscheidenden Rolle der Thrombozyten bei der Blutstillung bezüglich der initiierten Bildung des Thrombozytenpfropfes und der Exposition von gerinnungsfördernder Aktivität, wurde überprüft, ob einem Einzelnukleotidpolymorphismus an Position 807 des ITGA2 Gens bzw. der damit verbundenen Dichte der GP Ia/IIa-Rezeptoren an der Thrombozytenoberfläche in Hinsicht auf die Blutungsneigungen bei Patienten mit VWS Typ 1 eine besondere Bedeutung zukommt.

Anhand unserer Ergebnisse aber kann die Hypothese, dass aus der verminderten Dichte der GP Ia/IIa-Rezeptoren, die eine Verzögerung der primären Thrombozytenadhäsion an subendotheliales Gewebe bewirkt, eine stärkere Ausprägung der Blutungsneigung bei Patienten mit VWS Typ 1 resultiert, nicht bestätigt werden.

Das bedeutet, dass anhand der Kenntnis des Genotyps des GP Ia-Polymorphismus keine Einschätzung bzw. Charakterisierung der Ausprägung der Blutungssymptomatik bei Patienten mit VWS Typ 1 möglich ist und daher in der klinische Praxis für die Prognose der Blutungsneigung keine Vorteile erbringt.

Weiterhin gilt es nach anderen genetischen oder nicht genetischen Faktoren, die die Variabilität erklären könnten, zu suchen.

6. Zusammenfassung

Das von Willebrand-Syndrom ist eine komplexe Gerinnungsstörung und durch signifikante Differenzen in der Schwere der Blutungsneigung bei Patienten mit ähnlichen Laborparametern und äquivalenten Werten des VWF-Spiegels bzw. der VWF-Aktivität charakterisiert. Insbesondere das VWS Typ 1, bei dem ein quantitativer Mangel an VWF vorliegt, fällt durch seine äußerst heterogene Natur auf. Trotz der zunehmenden Kenntnisse bezüglich des molekularen Charakters, der Diagnostik und der Therapie des VWS, konnte der Einfluss genetischer oder umweltbedingter Faktoren, die die extrem variable Ausprägung mit signifikanten Unterschieden in der Blutungstendenz der Betroffenen verursachen, bisher nicht eindeutig geklärt werden. In Anbetracht dessen, dass Glykoprotein-Polymorphismen der Thrombozytenmembran und daraus resultierende Varianten der Rezeptoren-Funktion in der Regulation thromboembolischer oder hämorrhagischer Erkrankungen eine entscheidende Rolle zukommen kann, wurde eine Datenanalyse durchgeführt. Dabei wurde überprüft, ob einer dieser Polymorphismen (GP Ia) das Ausmaß der klinischen Blutungsneigung bei VWS Typ 1 Patienten beeinflusst.

Zu den verwendeten Daten von 73 Patienten mit VWS Typ 1 zählte ein von den Patienten ausgefüllter Fragebogen zur exakten Blutungssymptomatik anhand dessen mittels einer quantitativen Auswertung ein Blutungsscore festgelegt wurde. Als laboranalytische Daten wurden Gerinnungsparameter, wie Thrombozytenzahl, aPTT, TPZ, Fibrinogen und FVIII:C, sowie VWF-Parameter, nämlich VWF-Antigen und Ristocetin-Cofaktor-Aktivität und letztlich der Genotyp des Einzelnukleotid-polymorphismus an Position 807 des ITGA2 Gens ausgewertet.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den VWF-Werten und dem Schweregrad der Blutungsneigung (Blutungsscore 1-4) konnte nicht hergestellt werden. Es gab keine signifikanten Differenzen in der Genotypverteilung des GP Ia-Polymorphismus zwischen den vier verschiedenen Kategorien der Blutungstendenz.

Unsere Ergebnisse können die Hypothese, dass eine verminderte Rezeptordichte bedingt durch den GP Ia-Polymorphismus die klinische Ausprägung des VWS Typ 1 beeinflusst, nicht unterstützen. Es bedarf weiterer Untersuchungen anderer Faktoren, die an der variablen Expressivität des VWS Typ 1 mitwirken.

7. Summary

Von Willebrand disease is a involved bleeding disorder and characterized by significant variations in severity of bleeding tendency among patients with similar laboratory profiles and equivalent values of VWF level respectively VWF activity. Particularly VWD type 1, whereby a quantitative lack of VWF presences, is apparent due to its extremely heterogenous disposition. In contempt of progressiv knowledge regarding molecular character, diagnosis and treatment of VWD, the influence on genetic or environmental factors, that determine extremely variable form including significant differences in bleeding tendency of affected persons, failed to be clearly resolved so far. Considering the suggestion that platelet membran glycoprotein polymorphisms and consequent variations of receptor function may play an instrumental role as modulators of thromboembolic and hämorrhagic disease, a data analysis was in progress. Thereby the impact of one of these polymorphisms (GP Ia) to the clinical expression of patients with VWD type 1 was reviewed.

A questionnaire to the exact bleeding symptoms belonged to the data used on 73 with VWD type 1 by means of which a bleeding score was determined employing a quantitativ analysis. Futhermore laboratory findings such as platelet count, aPTT, TPZ and FVIII:C and also VWF levels in particular VWF:Ag and VWF:RCo and lately the single nucleotid polymorphism on position 807 of ITGA2 gen were evaluated.

A significant correlation between VWF levels and severity of bleeding tendency (bleeding score 1-4) could not be prepared. There were no differences in the genotype distribution between the four various categories of bleeding tendency.

Our results can not support the hypothesis that a decreased density of receptor attributable to the GP Ia polymorphism influences the clinical expressivity of VWD type 1. There need to be additional investigations of other factors that may contribute to the variable expressivity of VWD type 1.

8. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|--|
| A | Adenin |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| aPTT | aktivierte partielle Thromboplastinzeit |
| C | Cytosin |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| FVIII | Faktor VIII |
| FVIII:C | Faktor VIII-Aktivität |
| FVIIIa | aktivierter Faktor VIII |
| G | Guanin |
| GP | Glykoprotein |
| HGH I | Human Growth Hormon I |
| HGH II | Human Growth Hormon II |
| IU/dl | International Units/ Deziliter |
| MTHFR | Methyltetrahydrofolatreduktase Mutationen |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PFA | Platelet function analyser |
| RIPA | Ristocetin-induzierte Aggregation |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| T | Thymin |
| Taq | DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i> |
| TPZ | Thromboplastinzeit |
| U | Umdrehung |
| VWF | von Willebrand-Faktor |
| VWF:Ag | von Willebrand-Faktor Antigen |
| VWF:CB | Von Willebrand-Faktor Kollagenbindungskapazität |
| VWF:FVIII B | von Willebrand-Faktor Faktor VIII-Bindungskapazität |
| VWF:RiCoF | von Willebrand-Faktor Ristocetin-Cofaktor-Aktivität |
| VWS | von Willebrand-Syndrom |

9. Abbildungs- und TabellenverzeichnisAbbildungsverzeichnis

| | |
|---------------------|----|
| Abbildung 1.1..... | 3 |
| Abbildung 1.2..... | 6 |
| Abbildung 3.1..... | 30 |
| Abbildung 3.2..... | 31 |
| Abbildung 3.3..... | 34 |
| Abbildung 3.4..... | 34 |
| Abbildung 3.5..... | 35 |
| Abbildung 3.6..... | 36 |
| Abbildung 3.7..... | 37 |
| Abbildung 3.8..... | 38 |
| Abbildung 3.9..... | 40 |
| Abbildung 3.10..... | 41 |
| Abbildung 3.11..... | 42 |
| Abbildung 3.12..... | 43 |
| Abbildung 3.13..... | 44 |
| Abbildung 3.14..... | 45 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|-------------------|----|
| Tabelle 2.1..... | 16 |
| Tabelle 3.1..... | 29 |
| Tabelle 3.2..... | 32 |
| Tabelle 3.3..... | 33 |
| Tabelle 3.4..... | 33 |
| Tabelle 3.5..... | 35 |
| Tabelle 3.6..... | 36 |
| Tabelle 3.7..... | 37 |
| Tabelle 3.8..... | 38 |
| Tabelle 3.9..... | 39 |
| Tabelle 3.10..... | 41 |
| Tabelle 3.11..... | 42 |
| Tabelle 3.12..... | 44 |
| Tabelle 3.13..... | 46 |

10. Literatur

Abildgaard CF, Suzuki Z, Harrison J, Jefcoat K, Zimmerman TS: Serial studies in von Willebrand's disease: variability versus variants. *Blood* 1980; 56: 712-716.

Alberio L, Dale GL. Review article: Platelet-collagen interactions: Membrane receptors and intracellular signalling pathways. *Eur J Clin Invest* 1999; 29: 1066-1076.

Anvari A, Janisiw M, Turel Z, et al: Platelet glycoprotein Ia gene dimorphism alpha 2 – 807 in malignant arrhythmia in coronary artery disease. *Thromb Res* 2000; 98: 281-286.

Barthels M: *Das Gerinnungskompodium; Schnellorientierung, Befundinterpretation und klinische Konsequenz; 2. Auflage, Thieme-Verlag* 2013: 475-476, 480-481, 543, 892.

Baumgartner HR: Platelet interaction with collagen fibrils in flowing blood. I. Reaction of human platelets with alpha chymotrypsin-digested subendothelium. *Thromb Haemost* 1977; 37: 1-16.

Beers MH, Berkow R: *Das MSD Manual der Diagnostik und Therapie, 6. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 2000; 1126-1127.*

Behrends JC: *Physiologie; Duale Reihe; Thieme-Verlag* 2010; 183.

Berliner S, Nijja K, Roberts JR, Houghten RA, Ruggeri ZM: Generation and characterization of peptide-specific antibodies that inhibit von Willebrand factor binding to glycoprotein IIb-IIIa without interaction with other adhesive molecules. *J Biol Chem*, 1988; 263: 7500-7505.

Bethesda MD et al: *The Diagnosis, Evaluation and Management of von Willebrand Disease. National Institutes of Health Publication 08-5832. The National Heart, Lung, and Blood Institute* 2007; 19-21, 24, 31-32, 36.

Boguslawa L, Golanski J, Rozalski M, Watala C: Effect of the 807 C/T polymorphism in glycoprotein Ia on blood platelet reactivity. *J Biomed Sci* 2003; 10: 731-737.

Buchanan GR, Adix L: Grading of hemorrhage in children with idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Pediatr* 2002; 141: 683–688.

Budde U, Schäfer G, Müller N et al: Acquired von Willebrand's disease in the myeloproliferative syndrome. *Blood*, 1984, 64: 981-985.

Budde U, Pötzsch B: von-Willebrand-Faktor und Von-Willebrand-Erkrankung in: Müller-Berghaus G, Pötzsch B: *Hämostasiologie – Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik*, Springer-Verlag, 1999; 228-237.

Budde U, Drewke E, Mainusch K, Schneppenheim R: Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand disease. *Sem Thromb Haemost* 2002; 28: 173-189.

Budde U, Drewke E, Will K, Schneppenheim R: Standardisierte Diagnostik des von-Willebrand-Syndroms; Schattauer GmbH 2004; 12-25.

Caen JP: Glanzmann's thrombasthenia. *Baillieres Clin Haematol* 1989; 2(3): 609-625.

Carlsson LE, Santoso S, Spitzer C, et al: The alpha 2 gene coding sequences T807/A873 of the platelet collagen receptor integrin alpha2 beta1 might be a genetic risk factor for the development of stroke in younger patients. *Blood* 1999; 93: 3583-3586.

Castaman G, Eikenboom JC, Bertina RM, Rodeghiero: Inconsistency of association between type 1 von Willebrand disease phenotype and genotype in families identified in an epidemiological investigation. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1065–1070.

Clemetson KJ, Clemetson JM: Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* 2001; 86: 189– 197.

Corral J, Rivera J, Gonzales-Conejero R, et al: The number of platelet glycoprotein Ia molecules is associated with the genetically linked 807 C/T and HPA-5 polymorphisms. *Transfusion* 1999; 39: 372-378.

Corral J, González-Conejero R, Rivera J, Ortuño F, Aparicio P, Vicente V: Role of the 807 C/T Polymorphism of the $\alpha 2$ Gene in Platelet GP Ia Collagen Receptor Expression and Function. *Thromb Haemost* 1999; 81: 951-956.

Croft SA, Hampton KK, Sorell JA, et al: The GP Ia C807T dimorphism associated with platelet collagen receptor density is not a risk factor for myocardial infarction. *Br J Haematol* 1999; 106: 771-776.

D'Alessio P, Zwaginga JJ, de Boer HC, Federici AB, Rodeghiero F, Castaman G, Mariani G, Mannucci PM, de Groot PG, Sixma JJ: Platelet adhesion to collagen in subtypes of type 1 von Willebrand's disease is dependent on platelet von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 1990; 64: 227.

Deckmyn H, Chew SL, Vermynen J: Lack of platelet response to collagen associated with an autoantibody against glycoprotein Ia: a novel cause of acquired qualitative platelet dysfunction. *Thromb Haemost* 1990; 13, 64 (1): 74-79.

Di Paola J, Federici AB, Mannucci PM, et al: Low platelet $\alpha 2 \beta 1$ levels in type I von Willebrand disease correlate with impaired platelet function in a high shear stress system. *Blood* 1999; 93: 3578-3582.

Eikenboom JCJ, Reitsma PH, Peerlinck KMJ, Briet E: Recessive inheritance of von Willebrand's disease type 1. *Lancet* 1993; 341: 982-986.

Favaloro EJ: Laboratory assessment as a critical component of the appropriate diagnosis and subclassification of von Willebrand's disease. *Blood Review* 1999; 13: 185-204.

Favaloro EJ, Soltani S, McDonald J, et al: Reassessment of ABO Blood group, sex and age on laboratory parameters used to diagnosis von Willebrand disorder. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 910-917.

Federici AB, Bader R, Pagani S et al: Binding of von Willebrand factor to glycoproteins Ib and IIb/IIIa complex: affinity is related to multimeric size. *Br J Haematol* 1989; 73: 93-99.

Gawaz M: Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung. G. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York 1999; 30-37.

Gibson G: Rare and common variants: twenty arguments. *Nature reviews: Genetics* 2011; 13(2): 135–145.

Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ Jr., Montgomery RR: The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 1987; 69: 1691-1695.

Gralnick HR, Kramer WS, McKeown LP, Garfinkel L, Pinot A, Williams SB, Krutzsch H: Platelet adhesion at high shear rates: The roles of von Willebrand factor/GPIb and the beta 1 integrin alpha 2 beta 1. *Thromb Res* 1996; 81(1): 113-119.

Ghosh K, Kulkarni B, Nair S, Shetty S, Mohanty D: Human platelet alloantigen polymorphism in Glanzmann's thrombasthenia and its impact on the severity of the disease. *Br J Haematol* 2002; 119(2): 348-353.

Groth J: *Meine Moleküle Deine Moleküle – Von der molekularen Identität*; Version 1,0; 2013.

Hemker HC, Kessels H.: Feedback mechanisms in coagulation. *Haemost* 1991; 21: 189-196.

Hiller E, Riess H, Auberger K: *Hämorrhagische Diathese und Thrombose*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1998; 63-68.

Iniesta JA, Corral J, González-Conejero R, Piqueras C, Vicente V: Polymorphisms of Platelet Adhesive Receptors: Do They Play a Role in Primary Intracerebral Hemorrhage. *Cerebrovasc Dis* 2003; 15: 51–55.

Israels LG, Israels ED: Mechanisms of Hematology, Core Health Service Inc. 2002; 341-348.

Jakway JL: Acquired von Willebrand's disease in malignancy. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 1992; 18: 434-439.

Jung SM, Moroi M: Activation of the platelet collagen receptor integrin alpha 2 beta1: Its mechanism and participation in the physiological functions of platelets. Trends Cardiovasc Med 2000; 10: 285-292.

Jung SM, Moroi M: Signal-transducing mechanisms involved in activation of the platelet collagen receptor integrin alpha 2 beta 1. J Biol 2000; 275: 8016-8026.

Kaufmann JE, Oksche A, Wollheim CB, Gunther G, Rosenthal W, Vischer UM: Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP. J Clin Invest. Jul 2000;106(1):107-116.

Kaufman RJ, Stylianos EA, Fay PJ: Factor VIII and hemophilia A. In : Coleman RW, Marder VJ, Clowes AW, Georje JN, Goldhaber SZ: Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. 5th edition. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins 2006; 151-175.

Kretschmer V, Gomboltz H, Rump G: Transfusionsmedizin - Klinische Hämotherapie; Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2008; 52.

Kritzik M, Savage B, Nugent DJ, Santoso S, Ruggeri ZM, Kunicki T: Nucleotide polymorphisms in the alpha 2 gene define multiple alleles that are associated with differences in platelet alpha 2 beta 1 density. Blood 1998; 92: 2382-2388.

Kunicki TJ, Nurden AT, Pidard D, Russel NR, Caen JP: Characterization of human platelet glycoprotein antigens giving rise to individual immunoprecipitates in crossed immunoelectrophoresis. Blood 1981; 58: 1190.

Kunicki TJ, Nugent DJ, Staats SJ, Orchekowski RP, Wayner EA, Carter WG: The human fibroblast class II extracellular matrix receptor mediates platelet adhesion to collagen and is identical to the platelet glycoprotein Ia/IIa complex. *J Biol Chem* 1988; 263: 4516.

Kunicki TJ: Platelet membrane glycoproteins and their funktion: An overview: *Blood* 1989; 59: 30-34.

Kunicki TJ, et al: Variability of integrin alpha 2 beta 1 activity on human platelets. *Blood* 1993; 82(9): 2693-2703.

Kunicke JM, Kritzik M, Annis DS, Nugent D: Hereditary variation in platelet integrin $\alpha 2\beta 1$ density is associated with two silent polymorphisms in the $\alpha 2$ gene coding sequence. *Blood* 1997; 89: 1939.

Kunicki TJ: The role of platelet collagen receptor (glycoprotein Ia/IIa; integrin $\alpha 2\beta 1$) polymorphism in thrombotic disease. *Cur Opin Haematol* 2001; 8(5): 277-285.

Kunicki TJ, Federici AB, Salomon DR, Koziol JA, Head SR, Mondala TS, Chismar JD, Baronciani L, Canciani MT, Peake IR: An association of candidate gene haplotypes and bleeding severity in von Willebrand disease (VWD) type 1 pedigrees. *Blood* 2004; 104: 2359–2367.

Laffan M, Brown SA, Collins PW, Cumming AM, Hill FGH, Keeling D, Peake IR, Pasi KJ: The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors Organization. *Haemophilia* 2004; 10: 199–217.

Levy G, Ginsburg D: Getting at the Variable Expressivity of Von Willebrand Disease *Thromb Haemost* 2001; 86: 144–148.

López JA: The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1994; 5(1): 97-119.

Mannucci PM, Tripodi A: Factor VIII clotting activity. In: Jespersen J, Bertina RM, Haverkate F, et al: Laboratory Techniques in Thrombosis – A Manual. Second ed. Dordrecht- Boston-London: Kluwer Academic Publisher; 1999; 107-113.

Matsubara Y, Mutara M, Maruyama T, et al: Association between diabetic retinopathy and genetic variations in alpha 2 beta1 integrin, a platelet receptor for collagen. *Blood* 2000; 95: 1560-1564.

Mazurier C: Von Willebrand disease masquerading as haemophilia A. *Thromb Haemost* 1992; 67(4): 391-396.

Mazurier C, Meyer D: Molecular basis of von Willebrand disease. *Baillier's clinical Haematology*, 1996; 9(2): 229-241.

Mazurier C, Ribba AS, Gaucher C, Meyer D: Molecular genetics of von Willebrand disease. *Ann Génét* 1998; 41: 34-43.

McKay H, Derome F, Haq MA, Whittaker S, Arnold E, Adam F, Heddle NM, Rivard GE, Hayward CP: Bleeding risks associated with inheritance of the Quebec platelet disorder. *Blood* 2004; 104: 159–165.

Miller CH, Graham JB, Goldin LR, Elston RC: Genetics of classic von Willebrand's disease. I. phenotypic variation within families. *Blood* 1979; 54: 117-45.

Mörsdorf S, Jung F, Mrowietz C, Koscielny J, Seyfert UT, Wenzel E: Hämorheologische Veränderungen bei hereditärer und erworbener Angiodysplasie in: Anders O, Jacob J: Hämostase und Entzündung, 7. Rostocker Symposium über klinische Probleme in der Hämostaseologie, 1997: 118-123.

Morita H, Kurihara H, Imai Y, et al: Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and myocardial infarction in Japanese. An approach entailing melting curve analysis with specific fluorescent hybridization probes. *Thromb Haemost* 2001, 85: 226-230.

Moshfegh K, Wuillemin WA, Redondo M, et al: Association of two silent polymorphism of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study. *Lancet* 1999, 353: 351-354.

Müller U, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH; Persönliche Mitteilung, 2013.

Nichols WC, Ginsburg D: Von Willebrand disease. *Medicine* 1997, 76: 1-20.

Nichols WL, Rick ME, Ortel TL, Montgomery RR, Sadler JE, Yawn BP, James AH, Hultin MB, Manco-Johnson MJ, Weinstein M: Clinical and laboratory diagnosis of von Willebrand disease: A synopsis of the 2008 NHLBI/NIH guidelines; *Am J Hematol* 2009; 84: 366–370.

Nieuwenhuis HK, Akkerman JWN, Houdijk WPM, Sixma JJ: Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature* 1985; 318: 470.

Nitu Whalley IC, Lee CA, Griffioen A, Jenkins PV, Pasi K: Type 1 von Willebrand disease – a clinical retrospective study of the diagnosis, the influence of the ABO blood group and the role of the bleeding history. *Br J Haematol* 2000; 108: 259–264.

O'Brien JR: Angiodysplasia, haemostasis and capillaries. A hypothesis. *Thromb Res* 1996; 84: 365-387.

Ostendorf PC, Adam W, Anger B, Arndt R, Aumiller J, Beeser H, Begent NA, Born GVR, et al: *Hämatologie*, Urban und Schwarzenberg, 1991: 524-539.

Pereira J, Quiroga T, Pereira ME, Morales M, Goycoolea M, Hildalgo P, Prieto C, Mezzano D: Platelet membrane glycoprotein polymorphisms do not influence the clinical expressivity of von Willebrand disease type I. *Thromb Haemost* 2003; 90(6): 1135-1140.

Pischel KD, Bluestein HG, Woods VL: Platelet glycoprotein Ia, Ic and IIa are physicochemically indistinguishable from the very late activation antigens adhesion related proteins of lymphocytes and other cells types. *J Clin Invest* 1988; 81: 505.

Reiner AP, Kumar PN, Schwartz SM, et al: Genetic variants of platelet glycoprotein receptors and risk of stroke in young women. *Stroke* 2000; 31(7): 1628-1633.

Reiner AP, Siscovick DS, Rosendaal FR: Platelet glycoprotein gene polymorphisms and risk of thrombosis: facts and fancies. *Rev Clin Exp Hemtol* 2001; 5(3): 262-287.

Reitze J, Moredata GmbH Gießen; Persönliche Mitteilung, 2013.

Pöttsch B, Gawaz MP, Madlener K: *Hämostaseologie - Grundlagen, Diagnostik, Therapie*; 2. Auflage; Springer-Verlag : 2010; 359.

Rodeghiero F, Castaman G, Dini E: Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood* 1987; 69: 454-459.

Rodeghiero F, Castaman G. Willebrand disease type I: definition, phenotypes, clinical and laboratory assessment. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14(2): 321-335.

Rodeghiero F: Von Willebrand disease: still an intriguing disorder in the era of molecular medicine. *Haemophilia* 2002; 8: 292-300.

Rodeghiero F, Castaman G, Tosetto A, Battle J, Baudo F, Cappelletti A, Casana P, De Bosch N, Eikenboom JC, Federici AB, Lethagen S, Linari S, Srivastava A: The discriminant power of bleeding history for the diagnosis of von Willebrand disease type 1: an international, multicenter study. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2619-2626.

Roest M, Sixma JJ, Wu YP, Ijsseldijk MJW, Tempelman M, Slootweg PJ, de Groot PG, van Zanten GH: Platelet adhesion to collagen in healthy volunteers is influenced by variation of both $\alpha 2\beta 1$ density and vonWillebrand factor. *Blood* 2000; 96: 1433-1437.

Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Willebrand factor and von Willebrand disease. *Blood* 1987; 70: 895–904.

Ruggeri ZM: Structure and Function of von Willebrand Factor. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; 82: 576-584.

Sacchi E, Tagliabue L, Duca F, et al: A C807T substitution in the coding sequence of the platelet collagen receptor integrin 1 as a genetic risk factor for stroke in young patients. *Thromb Haemost* 1999, Supplement (August): 848.

Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E, Bochkov N, Boulyjenkov V, Ginsburg D, Meyer D, Peake I, Rodeghiero F, Srivastava A: Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 2000; 84: 160–174.

Sadler JE: Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. *Blood* 2003; 101: 2089-2093.

Sadler JE: Slippery criteria for von Willebrand disease type 1. *J Thromb Haemost* 2004; 2(10): 1720–1723.

Sadler J, Rodeghiero F: Provisional criteria for the diagnosis of VWD type 1; on behalf of the SSC Subcommittee on von Willebrand factor. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 775–777.

Sadler JE: New concepts in von Willebrand disease. *Annu Rev Med* 2005; 56: 173–191.

Saelman EUM, Nieuwenhuis HK, Hese KM, De Groot PG, Heijnen HFG, Sage EH, Williams S, McKeown L, Gralnick HR, Sixma JJ: Platelet adhesion to collagens types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1 integrin). *Blood* 1994; 83: 1244.

Santoro SA, Zutter MM: The alpha 2 beta 1 integrin: A collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Haemost* 1995; 74: 813.

Santoso S, Kunicki TJ, Kroll H, et al: Association of the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism with myocardial infarction in younger patients. *Blood* 1999; 93: 2449-2453.

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

Scharrer I: Diagnostik des v. Willebrand-Syndroms. In: Herrmann FH: Molekulargenetik hereditärer Hämostasedefekte. Lengerich, 1997: 77-81.

Schneppenheim R: Molekulargenetische Diagnostik beim von Willebrand-Syndrom. In: Herrmann FH, Molekulargenetik hereditärer Hämostasedefekte. Lengerich, 1997: 82-89.

Schneppenheim R, Budde U: Phenotypic and genotypic diagnosis of von Willebrand disease: a 2004 update. *Semin Hematol* 2005; 42(1): 15-28.

Schneppenheim R, Budde U: Von Willebrand-Syndrom und von Willebrand-Faktor; Aktuelle Aspekte der Diagnostik und Therapie; 3. Auflage; Uni-Med-Verlag, 2010; 12-13, 16-17, 27-29, 32-35, 40, 42-43, 72.

Schlokot U, Fischer B, Mitterer A, Falkner FG, Reiter M, Grillberger L, Mundt W, Preininger A, et al: Herstellung und Charakterisierung von rekombinantem von Willebrand-Faktor zur therapeutischen Anwendung. In: Scharrer I, Schramm W: 26. Hämophilie-Symposium, Hamburg, 1995: 147-158.

Sixma JJ, Henrita van Zanteen G, Saelman EUM, Verkleij M, Lankhof H, Nieuwenhuis HK, de Groot PG: Platelet adhesion to collagen. *Thromb Haemost* 1995; 74: 454.

Siegenthaler W: Siegenthalers Differentialdiagnose: Innere Krankheiten - vom Symptom zur Diagnose, 19. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart, 2005; 457-460.

Stephan B, Gross J, Mörsdorf S, Mrowietz C, Koscielny J, Jung F, Wenzel E: Mikroangiopathie und von Willebrand-Jürgens-Syndrom: Zur Aussagekraft kapillarmikroskopischer Befunde. In: Scharrer I, Schramm W: 28. Hämophilie-Symposium, Hamburg, 1997: 237-240.

Sramek A, Eikenboom JC, Briet E, Vandenbroucke JP, Rosendaal F: Usefulness of patient interview in bleeding disorders. *Arch Intern Med* 1995; 155: 1409–1415.

Takada Y, Wayner EA, Carter WG, Hemler ME: Extracellular matrix receptors, ECMR II and ECMR I, for collagen and fibronectin correspond to VLA-2 and VLA-3 in the family of heterodimers. *J Cell Biochem* 1988; 37: 385.

Thomas L: Labor und Diagnostik - Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, TH-Books, 7. Auflage 2008; 840-841, 844, 1953, 1970.

Tosetto A, Rodeghiero F, Castman G, Goodeve A, Federici AB, Batlle J, Meyer D, Fressinaud E, Mazurier C, Goudemand J, Eikenboom J, et al: A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J Thromb Haemost.* 2006; 4(4): 766-773.

Van Zanten GH, Saelman EU, Schut-Hese KM, et al: Platelet adhesion to collagen type IV under flow conditions. *Blood* 1996; 88: 3862.

Verkleij MW, Morton LF, Knight CG, de Groot PG, Barnes MJ, Sixma JJ: Simple collagen-like peptides support platelet adhesion under static but not under low conditions: Interaction via alpha 2 beta 1 and von Willebrand factor with specific sequences in native collagen is a requirement to resist shear forces. *Blood* 1998; 91: 3808-3816.

Von Depka Prondzinski M: Blutgerinnung, aktuelle Aspekte der Physiologie, Pathophysiologie, Klinik, Diagnostik, Prophylaxe und Therapie, Uni-Med 2002: 18-25; 69.

Von Willebrand EA: Hereditär pseudohämofili. Finska Läkaresällsk. Handl 1926; 67: 87-112.

Werner EJ, Emmet H, Tucker E, Giroux D, Schultz J, Abshire T: Prevalence of von Willebrand disease in children. A multiethnic study. J Pediatr 1993; 123(6): 93-98.

Zhu MM, Weedon J, Clark LT: Meta-analysis of the association of platelet glycoprotein IIIa PlA1/A2 polymorphism with myocardial infarction. Am J Cardiol 2000; 86(9): 1000-1005.

Fragebogen zur Blutungsneigung

(Bitte ausfüllen bzw. Zutreffendes ankreuzen)

Geschlecht:

Alter:(Jahre)

- 1.) Bekommen Sie leicht Blutergüsse? Ja Nein
 Wie waren diese bisher ausgebildet?
 klein und punktförmig großflächig so ausgeprägt, dass medizinische Hilfe benötigt wurde
- 2.) Blutet bei Ihnen bei kleinen Verletzungen (z.B.: Schürfwunde) die Wunde lange nach ? Ja Nein
 Wurde dabei eine medizinische Behandlung notwendig? Ja Nein
 Musste die Wunde chirurgisch versorgt werden oder wurde eine Bluttransfusion nötig? Ja Nein
- 3.) Haben bzw. hatten Sie Nasenbluten? Ja Nein
 Wie häufig? täglich wöchentlich monatlich seltener
 War die Blutung sehr stark? Ja Nein
 Mussten Sie aufgrund des Nasenblutens medizinische behandelt werden? Ja Nein
- 4.) Haben bzw. hatten Sie häufig Zahnfleischbluten? Ja Nein
 Waren die Blutungen stark ausgeprägt? Ja Nein
 Wurde medizinische Hilfe notwendig? Ja Nein
- 5.) Hatten Sie Zahnbehandlungen (Ziehen von Zähnen), die mit starkem Nachbluten verbunden waren? Ja Nein
 Mussten Sie aufgrund der Nachblutung erneut zum Zahnarzt? Ja Nein
 Oder in eine Klinik zur stationären Aufnahme? Ja Nein
- 6.) Gab es bei einer oder mehreren Operationen starke Blutungen bzw. Nachblutungen? Ja Nein
 Falls Ja, wann? : Bei welcher Operation? :
 Mussten aufgrund der Blutung eine erneute Operation erfolgen? Ja Nein
 Haben Sie aufgrund dieser Blutung eine Bluttransfusion erhalten? Ja Nein
- 7.) Haben bzw. hatten Sie Blutungen im Magen-Darm-Bereich? Ja Nein
 (sehr dunklen Stuhl / Blutauflagerungen auf dem Stuhl)
 Wurde eine medizinische Behandlung notwendig? Ja Nein
 Musste eine Operation erfolgen oder haben sie Bluttransfusionen erhalten? Ja Nein
- 8.) Haben bzw. hatten Sie Einblutungen in Gelenke? Ja Nein
 Wurde eine medizinische Behandlung notwendig? Ja Nein
 Musste eine Operation erfolgen oder haben sie Bluttransfusionen erhalten? Ja Nein
- 10.) Ist bei Ihnen eine Thrombose festgestellt worden? Ja Nein
- 11.) Ist bei Ihnen eine Lungenembolie festgestellt worden? Ja Nein
- 12.) Ist das von-Willebrand-Syndrom auch bei einem Ihrer Verwandten festgestellt worden? Ja Nein
 Verwandtschaftsgrad:
- Nur für weibliche Patienten:**
- 13.) Haben bzw. hatten Sie eine starke Regelblutung? Ja Nein
 War eine medizinische Behandlung nötig (Ausschabung/ Eisenpräparateinnahme)? Ja Nein
 Haben Sie Bluttransfusionen erhalten oder musste die Gebärmutter entfernt werden? Ja Nein
- 14.) Hatten Sie während oder nach der Entbindung starke Blutungen? Ja Nein
 Haben Sie Bluttransfusionen erhalten oder musste eine Ausschabung erfolgen? Ja Nein
 Musste aufgrund der Blutung die Gebärmutter entfernt werden? Ja Nein

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Studien 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die mich während der Ausarbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Frau Prof. Dr. B. Kemkes-Matthes danke ich für das Überlassen der Thematik der Arbeit, die freundliche Betreuung und ihre großzügige Unterstützung bei der Datensammlung und Auswertung sowie für die wissenschaftliche Beratung und für die Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Voss danke ich ebenfalls für die Unterstützung bei der Datensammlung, sowie für die wissenschaftliche Beratung.

Bei Frau Schäfer und Frau Beckmann aus dem Thrombozytenfunktionslabor bedanke ich mich sehr für die engagierte Mitarbeit bei der Datensammlung.

Bei Frau Nees, Frau Kühnel und den übrigen Mitarbeiterinnen des Gerinnungslabors möchte ich mich ebenfalls für die freundliche Unterstützung bedanken.

Darüber hinaus danke ich Herrn J. Reitze für die Beratung und Durchführung des statistischen Teils der Arbeit.

