

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. W. Mutschler

**Wirkung von direkten und indirekten Thrombininhibitoren auf die  
Thrombozytenfunktion bei Patienten mit peripherer arterieller  
Verschlußkrankheit**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Christine Zweimüller  
aus München

2005



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

**Berichterstatter:** PD Dr. med. Cornelia B. Reiningger

**Mitberichterstatter:** PD Dr. F. Tatò

**Dekan:** Prof. Dr. med. D. Reinhardt

**Tag der mündlichen Prüfung:** 17.03.2005

---

Meiner Tochter,  
meinem Mann und  
meinen Eltern  
gewidmet





---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1. Das hämostatische System</b> .....	<b>4</b>
1.1.1. Thrombozyten .....	4
1.1.2. Blutstillung und Gerinnung .....	5
<b>1.2. Pathophysiologie der Thrombose</b> .....	<b>7</b>
1.2.1. Arterielle Thrombogenese und Atherogenese .....	8
1.2.2. Die Strömung als entscheidender Faktor bei der Thromboseentstehung .....	9
<b>1.3. Klinische Folgen</b> .....	<b>10</b>
1.3.1. Venöse Thrombosen.....	10
1.3.2. Chronische arterielle Verschlusskrankheiten.....	12
<b>1.4. Physiologische Hemmstoffe der Blutgerinnung</b> .....	<b>13</b>
<b>1.5. Medikamentöse Herabsetzung der Gerinnungsfähigkeit</b> .....	<b>15</b>
1.5.1. Direkt wirkende Antikoagulantien .....	15
1.5.2. Indirekt wirkende Antikoagulantien .....	20
1.5.3. Hemmstoffe der Thrombozytenaggregation und -funktion .....	20
<b>1.6. Komplikationen der Heparintherapie – HIT</b> .....	<b>21</b>
<b>2. Staupunkt-Adhäsio-Aggregometrie (SPAA): Ein Modell der Gefäßwand-Blut-Interaktion in Echtzeit</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1. Entstehung von SPAA und deren klinische Relevanz</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2. Die Mechanismen des SPAA-Meßsystems</b> .....	<b>25</b>
2.2.1. Geräteaufbau .....	26
2.2.2. Dunkelfeldmikroskopie .....	26
2.2.3. Darstellung der Stromlinien des Ein- und Ausstroms des SPAA-Systems...	27
2.2.4. Das mathematische Modell.....	29
2.2.5. Fit-Dauer .....	31
2.2.6. Quantifizierung der gemessenen Adhäsions- und Aggregationswerte.....	31

<b>3. Patienten und Methoden</b> .....	<b>34</b>
3.1. Studienteilnehmer .....	34
3.2. Blutabnahme und Probenaufbereitung.....	34
3.3. Versuchsdurchführung .....	35
3.4. Datenanalyse .....	36
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
4.1. Ausgangswerte des Kollektivs .....	37
4.1.1. Adhäsion .....	37
4.1.2. Aggregation.....	38
4.1.3. Beispielkurven und -photos von Kontrollen und pAVK-Patienten .....	38
4.2. Inkubationsversuche .....	40
4.2.1. Darstellung der absoluten Adhäsionswerte nach Inkubation des PRP .....	40
4.2.2. Mikrophotos und Kurvenverläufe bei Inkubationsversuchen.....	42
4.2.3. Darstellung der Kpw-Differenzen zum PRP-Ausgangswert .....	46
4.2.4. Ergebnisse für die Aggregation nach Inkubation des PRP .....	48
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>51</b>
5.1. Betrachtung der Ausgangswerte vor der Zugabe von Substanzen ...	51
5.2. Veränderungen der Thrombozytenfunktion nach Inkubation.....	52
5.2.1. Auswirkungen bei den Kontrollpersonen.....	52
5.2.2. Auswirkungen bei dem Patientenkollektiv .....	53
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>55</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>56</b>



---

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ADP</b>	Adenosin-Diphosphat
<b>ASS</b>	Acetylsalicylsäure
<b>AT III</b>	Antithrombin III
<b>BMI</b>	Body mass index
<b>CI</b>	Konfidenzintervall
<b>CLX</b>	Clexane
<b>F</b>	Faktor
<b>FRX</b>	Fraxiparin
<b>GP</b>	Glykoprotein
<b>HIT</b>	Heparin-assoziierte Thrombozytopenie
<b>HIPA</b>	Heparin-induced platelet activation
<b>HIR</b>	Hirudin
<b>HNB</b>	Unfraktioniertes Heparin
<b>LDL</b>	Low density lipoproteine
<b>LMWH</b>	Niedermolekulares Heparin
<b>LUA</b>	Laser-Ultramikroskop-Anemometrie
<b>MBX</b>	Monoembolex
<b>ORG</b>	Orgaran
<b>PAF</b>	Plättchen aktivierender Faktor
<b>pAVK</b>	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
<b>PF4</b>	Plättchenfaktor 4
<b>PRP</b>	Plättchenreiches Plasma
<b>PTT</b>	Partielle Thrombinzeit
<b>RGD</b>	Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SPAA</b>	Staupunkt-Adhäsio-Aggregomtrie
<b>TAT</b>	Thrombin-Antithrombin-Komplex
<b>TFPI</b>	Tissue factor pathway inhibitor
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Thromboxan A <sub>2</sub>
<b>UFH</b>	Unfraktioniertes Heparin
<b>vWF</b>	Von Willebrand Faktor

---

## 1. Einleitung

In dieser Arbeit wird mittels eines Strömungsmodells *ex vivo* die Reaktion von Thrombozyten auf zur Thromboseprophylaxe applizierte Thrombinhemmer, Heparine oder verwandte Substanzen bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) beobachtet. Bei diesen Patienten ist das Gerinnungssystem aus dem Gleichgewicht geraten. Deshalb ist es notwendig, die Physiologie und Funktion des Gerinnungssystems, die Aussagekraft der angewendeten Laboranalyse und schließlich die Pharmakodynamik und –kinetik der Medikamente zu kennen, um das Verhältnis zwischen dem möglichen Nutzen und den Risiken einer Therapie richtig einzuschätzen und somit die kritische Indikation für diese Substanzen bei einem bestimmten Patientenkollektiv stellen zu können.

Die folgende Arbeit beginnt mit einem Überblick über das Gerinnungssystem, die Pathophysiologie der Thrombose und deren klinischen Folgen und den Möglichkeiten einer medikamentösen Therapie, um in Kapitel 2 auf die spezielle Methode einzugehen, die hier verwendet wurde, um die Thrombozytenreaktivität zu beurteilen. Die für diese Studie ausgewählten Teilnehmer und Methoden werden im 3. Kapitel beschrieben. Der Ergebnisteil mit folgender Diskussion stellt die Resultate dar und gibt einen Ausblick für einen möglichen Therapieansatz bei Patienten mit pAVK.

### 1.1. Das hämostatische System

#### 1.1.1. Thrombozyten

Mit den üblichen mikroskopischen Methoden findet man beim gesunden Erwachsenen 150.000 - 350.000 Thrombozyten pro  $\mu\text{l}$ . Die flachen, unregelmäßig runden, kernlosen Thrombozyten haben einen Längsdurchmesser von 1-4  $\mu\text{m}$  und eine Dicke von 0,5-0,75  $\mu\text{m}$ . Die Verweildauer der Thrombozyten im Blut beträgt 5-11 Tage, danach werden sie in Leber, Lunge und Milz abgebaut. Die im Blut zirkulierenden Thrombozyten befinden sich in einem Ruhezustand. Sie können in verletzten Gefäßen durch Oberflächenkontakt und durch bestimmte Blutgerinnungsfaktoren in einen aktivierten Zustand überführt werden [63]. Aufgrund ihrer enzymatischen und metabolischen Ausstattung vermögen Thrombozyten ihre Gestalt rapide zu verändern,

Pseudopodien zu bilden, dem Subendothel und künstlichen Oberflächen anzuhaften und sich zu Aggregaten zusammen zu lagern [15].

### 1.1.2. Blutstillung und Gerinnung

Im Jahre 1863 zeigte Joseph Lister, daß Blut in einer operativ entnommenen Halsvene eines Ochsen flüssig blieb, während es nach Überführung in ein Glasgefäß umgehend gerann. Die unphysiologische Glasoberfläche aktivierte eine Reaktionsfolge, die als intravaskuläres System (intrinsic system) bekannt ist. Ebenso kann die Gerinnung von Substanzen ausgelöst werden, die Gewebe in Folge von Verletzungen freisetzen, was als extravaskuläres System (extrinsic system) bezeichnet wird. Beide Systeme münden in die Bildung eines Thrombozyten-Fibringerinnsels [68].

Die Blutgerinnung ist Teil der hämostatischen Reaktionen, die sich aus den Komponenten Plasma, Thrombozyten und Gefäßen zusammensetzen. Die Hämostase kann in primäre und sekundäre Reaktionen aufgeteilt werden. Primäre Reaktionen wie Kontraktion der Gefäßwand, Thrombozytenadhäsion und Formierung eines Thrombozytenaggregats sind nicht mehr ausreichend, wenn größere Gefäße betroffen sind. Die nun nötigen sekundären Reaktionen beinhalten die Gerinnungskaskade, die Thrombinbildung und die Fibrinbildung [4].

- **Thrombozytenumformung:** Die adhärennten Thrombozyten werden aktiviert, sezernieren verschiedene Stoffe, exprimieren Bindungsstellen für Gerinnungsfaktoren und verändern ihre Form. Sie werden kugelig und bilden stachelartige Fortsätze. Dieses sogenannte „spreading“ auf dem exponierten Endothel wird möglich durch Aktin- und Myosinfilamente der Thrombozyten vermittelt durch  $Ca^{2+}$  Ionen [4, 63].
- **Thrombozytenadhäsion:** Nach Verletzungen, bei denen es zur Eröffnung kleiner Blutgefäße gekommen ist, hört die Blutung beim Gesunden nach 1 - 3 Minuten durch Vasokonstriktion und mechanischen Verschluss kleiner Gefäße mittels Thrombozyten von selbst auf. An den Bindegewebsfasern der Wundränder bzw. an abgelagerte Liganden wie Fibrinogen und Komponenten der subendothelialen Matrix (z.B. Fibronectin, Kollagen, Vitronectin und dem von-Willebrandt-Faktor (vWF)) binden Thrombozyten mittels spezifischer Adhäsionsmoleküle. GpIIb-IIIa

ist dabei mit 80 000 Kopien pro Thrombozyt am meisten vertreten. Weniger häufig finden sich auf der Oberfläche neben anderen Rezeptoren die Rezeptoren Gplb-IX-Komplex, Gplc\*IIa ( $\alpha_5\beta_1$ ), Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , und Gpla-IIa [7]. Der Hauptmechanismus für die Regulation der Thrombozytenadhäsion in statischen Systemen und bei niedrigen Scherraten ist die schnelle und irreversible Interaktion von Glykoprotein IIb-IIIa mit immobilisiertem Fibrinogen [8, 32, 47, 59, 61]. Eine adhäsive Bindung mit vWF spielt unter diesen Bedingungen eher eine untergeordnete Rolle. Bei hohen Scherraten ist es dagegen umgekehrt. Hier scheinen zwar Fibrinogen-GPIIb-IIIa-Bindungen zu entstehen, diese werden aber durch die hohen Scherraten zerbrochen. Statt dessen gehen Thrombozyten mittels des Gplb-IX-Rezeptors eine Bindung mit immobilisiertem vWF ein [58, 61].

Der vWF z.B. bildet Brücken zwischen den subendothelialen Strukturen und einem spezifischen Glykoprotein der Thrombozytenmembran, dem Glykoprotein Ib-IX-Komplex [63, 4]. Innerhalb dieses Komplexes befindet sich die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp-X (RGD), die als entscheidende Sequenz für die Bindung der Adhäsionsmoleküle mit den Liganden Fibrinogen, Vitronektin, Fibronektin und vWF gefunden worden ist [4, 7].

- **Thrombozytenaggregation:** Ist Fibrinogen an GPIIb-IIIa gebunden, können weitere Thrombozyten dieses modifizierte Fibrinogen binden. Durch Sekretion von Thrombozytenaktivatoren werden weitere bislang ruhende Thrombozyten aktiviert, welche dann aktiviertes GPIIb-IIIa exprimieren. Dieses aktivierte GPIIb-IIIa kann dann lösliches Fibrinogen binden, was die Aggregation einleitet [9, 60]. Sobald eine Schicht von Thrombozyten durch Adhäsion an das Subendothel gebunden hat, tritt die Thrombozyten-Thrombozytenbindung in den Vordergrund. Die Aktivierungswege der Aggregation sind ADP gesteuert, wodurch es zu einer reversiblen Aggregation kommt. Die ADP-Wirkung wird durch Kollagen, Adrenalin und den sogenannten plättchenaktivierenden Faktor (PAF) verstärkt. Die Folge ist die Prostaglandin- und Thromboxanbildung, die die irreversible Aggregation durch Thrombin einleitet [4, 63].

## 1.2. Pathophysiologie der Thrombose

Die Thrombose wird als vollständiger oder teilweiser Verschluss eines Gefäßes durch ein als Thrombus bezeichnetes, intravital entstandenes, fibrinhaltiges Thrombozytenaggregat oder -gerinsel beschrieben. Sie kann als Blutstillung am falschen Ort angesehen werden, folglich besteht im Ablauf eine große Ähnlichkeit mit der normalen Blutstillung [53].

Es gibt Unterschiede in der Entstehung der arteriellen und venösen Thrombose. Dabei seien zuerst die Gruppen der Risikofaktoren für die Auslösung eines Gefäßverschlusses genannt.

Arterien	Venen	Allgemeine Faktoren
Rauchen	Immobilität	Höheres Alter
Diabetes mellitus	Verletzungen des Beckens und der unteren Extremität	Thrombophilie: angeborene oder erworbene Hämostasedefekte
Hypertension	Chirurgisches Trauma (z.B. Operationen mit Narkose länger als 60 min.)	Polycythämia, Thrombozythämie
Hypercholesterinämie	Hyperkoagulabilität	Reduzierte fibrinolytische Aktivität
Hyperkoagulabilität	Langstreckenflüge	Übergewicht (BMI>30)
Genetische Veranlagung		Kontrazeptiva, Hormonersatztherapien, Schwangerschaft
		Antwort auf eine anti-thrombotische Therapie

**Tabelle 1:** Risikofaktoren der Thrombose [40]

Neben diesen verschiedenen Risikofaktoren stehen als weitere Unterschiede im Vordergrund, daß Arterien eine dickere Gefäßwand haben, der Blutdruck höher und der Durchfluß schneller ist. Es entstehen höhere Scherraten und als wohl wichtigster Unterschied, es kann eine Arteriosklerose entstehen.

### 1.2.1. Arterielle Thrombogenese und Atherogenese

Virchow und Rokitansky befaßten sich bereits Mitte des 19. Jahrhunderts mit den Prozessen der Arteriosklerose und Thrombose. Virchow zufolge ist der primäre Prozeß die „Lipidhemmung“, eine Permeation des Endothels und der Intima durch Lipid und andere Moleküle, so daß sich ein lipidreicher Plaque in der Intima bildet.

Die Arteriosklerose ist laut WHO definiert als variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut- und Blutbestandteilen und Bindegewebe verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia. In morphologischen Studien wurde nachgewiesen, daß sich arteriosklerotische Läsionen von Geburt an entwickeln und über die morphologischen Stadien nach Stary [67] fortschreiten. Die Stary-Klassifikation beschreibt die progressiven Stadien der Arteriosklerose:

- Stadium Typ I: rein intrazelluläre Lipidanreicherung in Makrophagen der Intima
- Stadium Typ II: intrazelluläre und geringe extrazelluläre Lipidakkumulation („fatty streak“)
- Stadium Typ III: Bildung extrazellulärer Lipidaggregate (Präatherom)
- Stadium Typ IV: massive, konfluierende, extrazelluläre Lipidkerne (Atherom)
- Stadium Typ V: fibröse „Kappen“ an der luminalen Seite des Lipidkerns (Fibroatherom) mit folgender stenotischer Verengung der Gefäße. An der Gefäßwand abgelagerte Thrombozyten und Fibrin beschleunigen die Stenosierung.

Manche arteriosklerotischen Läsionen entwickeln sich langsam über die Stadien der chronischen, endothelialen Schädigung, der darauffolgenden Makrophagenansammlung, der Lipidinsudation und der Proliferation der glatten Muskulatur, wie von Ross [56] in der „response-to-injury“ Hypothese beschrieben.

Die Plaques fortgeschrittener Stary Typ III-IV Läsionen rupturieren mit darauffolgender Thrombozyten- und Fibrinablagerung, Thrombusbildung und fibrotischer Organisation, was zur Stenosierung des Gefäßes führt. Die Thrombozytenadhäsion und –aggregation scheinen diesen Prozeß zu begünstigen. Entsprechend spielen Thrombozyten eine doppelte Rolle im Prozeß der arteriellen Thrombose:

- Ein kleiner, frischer plättchenreicher Thrombus kann signifikant zum Wachstum eines arteriosklerotischen Plaques und somit zur Thrombogenese durch Adhäsion und Aggregation an der Läsion beitragen [2, 3, 56,66].
- Große und okklusive Thromben können zu akuten ischämischen Ereignissen und peripherem Verschuß führen.

Für die Ursache der Arteriosklerose wurde eine Ernährung reich an gesättigtem Fett und Cholesterin gehalten. Erhöhte Plasmalipide und speziell LDL-Cholesterin sind signifikante Risikofaktoren für die Atherogenese [34, 57, 69]. Vor allem LDL-Ablagerung wird als potentiell Pathogen betrachtet, wenn es übermäßig in Subendothel akkumuliert. Dort hat es eine anziehende Wirkung auf Monozyten, welche die Oxidation von LDL begünstigen. Oxidiertes LDL ist ein potenter Stimulus für die Monozytenbindung. Diese aktivieren Endothelzellen und wandeln die bisher intakte Gefäßwand in eine thrombogene um. So tragen in der Gefäßwand abgelagerte Lipide zur Intimaschädigung und somit zur Atherogenese bei [56, 67].

Rokitansky stellte eine enge Beziehung zwischen dem arteriosklerotischen Prozeß und der Thrombose her. In dessen Theorie verursacht die verletzte Gefäßwand zusammen mit dem Gerinnungssystem die Bildung von muralen Thromben, die dann durch Endothelialisierung in die Intima eingeschlossen werden [40]. Auch Virchows vor über hundert Jahren aufgestellte These der thrombogenen Trias bestehend aus den Komponenten Gefäßwandläsion, Häodynamikstörung und Hyperkoagulabilität gehört noch heute zu den Grundlagen der Thromboseforschung.

### **1.2.2. Die Strömung als entscheidender Faktor bei der Thromboseentstehung**

Wurde in den vorangegangenen Punkten schon auf die Rolle des Blutes mit seinen diversen Eigenschaften und der Gefäßwand in Zusammenhang mit der Thromboseentstehung eingegangen, so sollte auch nicht der Einfluß der Strömungsbedingungen, wie schon von Virchow in seiner These der thrombogenen Trias (Gefäßwand, Blut, Strömung) gefordert, vernachlässigt werden. Sowohl durch eine Strömungsverlangsamung, Strömungsbeschleunigung als auch Wirbelbildung kann eine Thrombose begünstigt werden.

Die Strömungsverlangsamung trägt zur venösen Thrombogenese bei. Gefäßerweiterung, Viskositätserhöhung, Bettlägerigkeit und Gefäßkompression führen zur Verlangsamung des Blutstromes und bewirken ein Verklumpen der Erythrozyten und Erhöhung der Thrombozytenreaktivität. Eine hohe Strömungsgeschwindigkeit spielt bei der arteriellen Thrombose eine entscheidende Rolle. Dabei werden die Thrombozyten an die Endotheloberfläche gepreßt und bilden, falls das Endothel seine aggregationshemmenden Eigenschaften verloren hat, wie z.B. bei einer Arteriosklerose, einen Thrombus.

Darüberhinaus treten turbulente Strömungen bei lokalen Gefäßerweiterungen, Passagehindernissen und Gefäßaufzweigungen auf. Dadurch wird der plasmatische Randstrom in den Gefäßen zerstört, sodaß die Thrombozyten mit dem Endothel in Kontakt kommen [53]. Dieser Anstieg der wandnahen Thrombozytenkonzentration kann auch als Folge des inversen Fahraeus-Effekts [75] angesehen werden. Als Fahraeus-Lindqvist-Effekt wird ein in turbulenten Strömungen auftretendes Wandern der roten Blutzellen zur Strömungsachse hin bezeichnet, was zum Anstieg des zentralen Hämatokrits führt, wohingegen die Thrombozyten einer entgegengerichteten Nettodrift (Thrombozytengleiten) zu den wandnahen Bereichen ausgesetzt sind. Dadurch kann es in dieser Schicht zu einer 1,5- bis 7-fach höheren Konzentration von Thrombozyten kommen [13, 37, 38]. Durch den nun häufigeren Thrombozyten-Gefäßwand-Kontakt wird die Thrombozyten-Gefäßwandinteraktion erleichtert und der Prozeß der Athero- und Thrombogenese gefördert.

Es ist schwierig, diese komplexen Bedingungen, die in den Blutgefäßen herrschen, nachzuahmen. Mit der Staupunkt-Adhäsio-Aggregometrie ist jedoch eine Methode entwickelt worden (siehe Kapitel 2), die die Komponenten der Virchowschen Trias berücksichtigt und es ermöglicht, unter standardisierten und reproduzierbaren Bedingungen die Thrombogenese zu untersuchen.

### **1.3. Klinische Folgen**

#### **1.3.1. Venöse Thrombosen**

Ohne eine Thrombembolieprophylaxe stellen die tiefe Venenthrombose und die Lungenarterienembolie nach wie vor gefährliche postoperative Komplikationen dar.



Die Angaben über die Häufigkeit schwanken stark, da die klinische Symptomatik oft verschleiert ist. Mit Hilfe eines exakten Nachweises (Radiofibrinogentest, Phlebographie) finden sich ohne Thromboseprophylaxe folgende Häufigkeiten der Thrombose nach Operationen:

	Tiefe Venenthrombose
Gynäkologie	15-20 %
Allgemeinchirurgie	20-30 %
Knie- und Hüftgelenkersatz	45 -50%
Knie- und Hüftfrakturen, bzw. multiples Trauma	bis zu 75%

**Tabelle 2:** Häufigkeiten tiefer Venenthrombose in operativen Fachgebieten [12]

Tiefe Venenthrombosen bergen je nach vorbestehendem Embolierisiko in 0,2 - 10% die Gefahr einer lebensgefährlichen

- Lungenembolie: Die Verschleppung eines teilweise oder vollständig abgelösten Thrombus (Embolus), der je nach Größe eine schlagartige Verlegung der beiden Hauptstämme und größeren Äste der Arteria pulmonalis oder eine Verlegung peripherer Arterienäste (Lungeninfarkt) verursacht und führen in bis zu 80% als Spätfolge zum
- postthrombotischen Syndrom: Infolge venöser Gefäßverschlüsse, teilweiser Rekanalisation und einer Klappeninsuffizienz kommt es zu chronischen Stauungszeichen (Induration, Schmerzen, Ödem, Ekzem, Ulcus cruris) [12, 64].

Folgende Methoden der Thrombembolie-Prophylaxe sind durch klinische Studien belegt und können daher empfohlen werden [12]: physikalische Maßnahmen wie Krankengymnastik, graduierte Kompressionsstrümpfe und Frühmobilisation, sowie eine medikamentöse Prophylaxe mit Heparinen. Zum Einsatz kommen UFH 2-3 mal 5000 IE/Tag s.c. oder sogenannte niedermolekulare Heparine 1 Injektion/Tag s.c.. Unter 1.5. wird genauer auf die Möglichkeiten der medikamentösen Herabsetzung der Blutgerinnung eingegangen.

### 1.3.2. Chronische arterielle Verschlusskrankheiten

Die chronisch arteriellen koronaren, cerebralen und peripheren Verschlusskrankheiten gehören zu den häufigsten Krankheiten der modernen Industriegesellschaft. Mehr als die Hälfte aller Menschen werden in Deutschland daran sterben, mehr als doppelt soviel, wie an bösartigen Krebserkrankungen zusammen. Eine Vorrangstellung kommt der koronaren Herzkrankheit zu. Jeder vierte Todesfall ist bedingt durch eine Myokardischämie, was zu Angina Pectoris und Herzinfarkten führt. Weitere bevorzugte Lokalisationen liegen am Hals an der Carotidgabel mit der Folge von TIAs (transitorischer ischämischer Attacken), PRINDs (prolongierten reversiblen ischämischen neurologischen Defiziten) und abgeschlossenen Schlaganfällen mit Halbseitenlähmungen.

Weitere Prädilektionsstellen befinden sich im Bereich der Becken- und Beinarterien, was bekannt ist unter dem Schlagwort „Raucherbein“ bzw. pAVK. Das klassische Symptom ist die Claudicatio intermittens, die beim Gehen auftritt und nach Zurücklegen einer gewissen Wegstrecke zum Stehenbleiben zwingt. Verursacht werden die Schmerzen beim Gehen durch Arterienverengungen in Gefäßen, die die Gliedmaßen versorgen.

Etwa 4,5 Millionen Bundesbürger leiden an der pAVK; nur jeder Dritte hat jedoch Beschwerden. Unbehandelt drohen den Patienten schwerwiegende Komplikationen, wie Herzinfarkt, Apoplex und akute periphere Ischämie. Schon ab einem Ankle-Brachial-Index (ABI) von 0,9 statt 0,7 besteht ein 7-fach erhöhtes Risiko für Herzinfarkt und apoplektische Insulte. Dies bedeutet eine Generalisierung der Gefäßkrankung aufgrund einer Hyperkoagulabilität, mitverursacht durch eine erhöhte Thrombozytenreaktivität, was von Reiningger CB et al [46] nachgewiesen werden konnte.

Ein Ansatz der Therapie liegt in der Hemmung der Thrombozytenfunktion. Klinische Daten zeigen, daß Clopidogrel (ADP-Rezeptorhemmer) bei der Prävention von pAVK-bedingten atherothrombotischen Ereignissen eine statistisch signifikante Verbesserung der Wirksamkeit gegenüber der ASS-Therapie aufweist. Daten aus der CAPRIE-(Clopidogrel versus Aspirin bei Patienten mit Risiko von ischämischen Ereignissen) Studie beweisen, daß bei Patienten mit kürzlich aufgetretenem Myokardinfarkt, Schlaganfall oder etablierter pAVK Clopidogrel 75 mg/Tag gegenüber ASS 325 mg/Tag eine relative Risikoreduktion von 8,7 % ( $p=0.043$ ) bezüglich zusammen-

gesetztem Endpunkt aus ischämischem Schlaganfall, Myokardinfarkt oder vaskulärem Tod bewirkt. Weder ASS noch Clopidogrel besitzen jedoch eine Fähigkeit zur Thrombinhemmung, sodaß zusätzlich zur Aggregationshemmung eine thrombininhibierende Substanz verabreicht werden sollte.

Ebenso zeigten Reininger CB et al [45], daß nach chirurgischen Interventionen, im besonderen nach gefäßchirurgischen, pAVK-Patienten eine Steigerung ihrer schon präoperativ erhöhten Neigung zur Thrombozytenaggregation und –adhäsion aufweisen. Sie profitieren aber durch ihre Hypersensitivität gegenüber Heparin, nicht von einer begonnenen Heparinisierung, wie weitere Studien zeigten [48]. Gerade deshalb werden in dieser Arbeit neben Heparin auch andere Wirkstoffe zur Thrombolieprophylaxe getestet, um eine für pAVK-Patienten optimale perioperative Versorgung zu ermöglichen.

#### **1.4. Physiologische Hemmstoffe der Blutgerinnung**

Die intakte Gefäßwand besitzt verschiedene antikoagulatorische Mechanismen, die zusammen mit oben genannten zirkulatorischen Komponenten aktiv an der Regulierung des hämostatischen Systems teilnehmen. Die Gefäßwand formiert eine Barriere zwischen dem zirkulierenden Blut und dem darunterliegenden Gewebe und noch wichtiger, es bietet eine kontinuierliche, luminale Endothelzellschicht, die aktiv und dynamisch an verschiedenen antithrombotischen Prozessen beteiligt ist [39].

Die Blutgerinnung und Blutstillung werden *in vivo* durch verschiedene protektive Mechanismen modifiziert, die unnötige und unerwünschte Ablagerungen von Fibrin und Thrombozyten begrenzen und somit eine proximale Ausdehnung von hämostatischen Plugs, Thrombosen und disseminierter intravasaler Gerinnung verhindern [4].

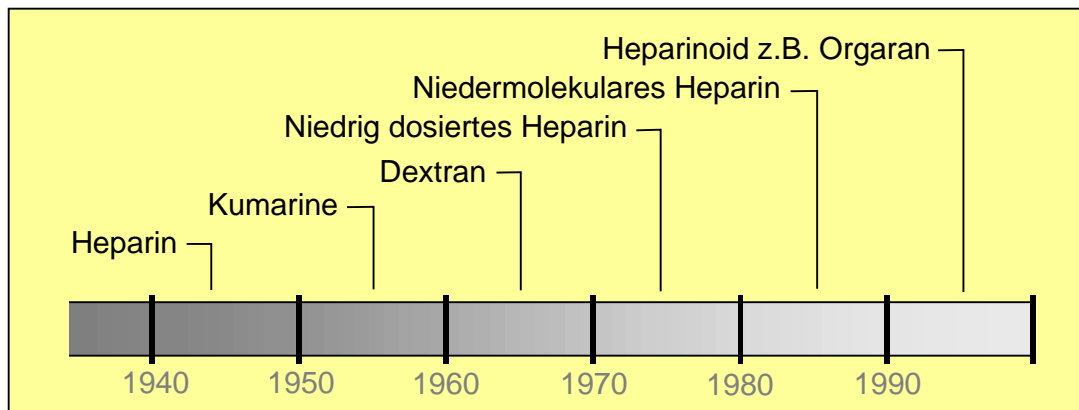
Körpereigene Hemmstoffe	Wirkungsprinzip
Antithrombin III	Inaktiviert Thrombin, Serinproteaseinhibitor neutralisiert Proteasen durch Bildung äquimolarer Komplexe; besitzt hohe Affinität gegenüber Thrombin und Faktor (F) Xa. Reaktion wird durch Heparin beschleunigt
Heparin Cofaktor II	Inaktiviert Thrombin
Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)	Wird in Endothelzellen gebildet, neutralisiert durch Komplexbildung F Xa und bindet dann den F VIIa-Gewebe-komplex und hemmt diesen. Heparin-injektion führt zum Anstieg des TFPI-Spiegels
Thrombomodulin	Membranrezeptor an Endothelzellen für Thrombin. Der Thrombin-Thrombomodulin-Komplex ist nicht mehr in der Lage, Fibrinogen zu spalten sowie Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren zu aktivieren.
Protein C und S	Vitamin-K-abhängige Glykoproteine der Leber; freies Protein S bindet Protein C und beschleunigt dessen Wirkung bei der Inaktivierung von F Va und F VIIIa und der Förderung der Fibrinolyse
Heparin	Heparin wirkt als Cofaktor von Antithrombin III, Heparin-AT III inaktiviert F Xa und Thrombin. Vorkommen in Mastzellen und basophilen Granulozyten; Inwieweit physiologisch vorkommendes Heparin die Gerinnung beeinflusst, ist nicht geklärt. Konzentration liegt im Grenzbereich der Nachweismethoden.

**Tabelle 3:** Körpereigene Hemmstoffe der Blutgerinnung [4, 61, 63]

Unter physiologischen Bedingungen verhindert die Gefäßwand eine Aktivierung der Gerinnung durch ihre thrombinresistente Oberfläche. Geht die Integrität des Gefäß durch Verletzung verloren, dient das exponierte Subendothel als eine hochreaktive Oberfläche für die Induktion der hämostatischen Antwort [39].

## 1.5. Medikamentöse Herabsetzung der Gerinnungsfähigkeit

Die zeitliche Entwicklung der einzelnen Medikamente stellt Abbildung 1 dar.



**Abbildung 1:** Wichtige Stationen in der Entwicklung von antithrombotischen Wirkstoffen [36]

### 1.5.1. Direkt wirkende Antikoagulantien

#### a) unfraktioniertes Heparin (UFH)

Entdeckt wurde Heparin 1916 von William H. Howell Professor der Physiologie, als er versuchte Gewebethromboplastin zu isolieren. Sein Mitarbeiter wurde beauftragt, Extrakte von Hirn, Herz und Leber zu gewinnen. Dabei entdeckte er, daß besonders das Extrakt des Lebergewebes eine starke antikoagulatorische Eigenschaft besitzt, nachdem das auch beinhaltete Cephalin seine thromboplastische Wirkung verbraucht hatte. Es dauerte 20 Jahre von seiner Entdeckung bis zu seinem therapeutischen Einsatz 1937. Diese lange Verzögerung beruhte hauptsächlich auf Problemen mit der Reinigung und Extraktion der antithrombotischen Substanzen.

Als erster Kliniker nützte der schwedische Chirurg Clarence Crafoord, der sich mit dem Auftreten von Lungenembolien nach Operationen befaßte, Heparin. Er behandelte 325 Patienten postoperativ mit Heparin. Die erwarteten 3-4 % Patienten mit schwerer Lungenembolie blieben aus [72].

Heparine sind negativ geladene sulfatierte Glucosaminoglykane. Die Disaccharideinheiten mit unterschiedlicher Kettenlänge bestehen aus jeweils einem Aminozucker und einer Uronsäure. Für die antikoagulatorische Wirkung ist ein Pentasaccharid aus

drei sulfatierten Glucosaminen und zwei Uronsäuremolekülen verantwortlich. Es reagiert mit hochaffinen Lysinbindungsstellen an AT III [15]. Heparinfragmente kleiner als 10-20 Monosaccharideinheiten pro Heparinmolekül sind, obwohl sie die essentielle Pentasaccharidbindungsstelle für AT III enthalten, nicht lang genug, eine Thrombinbindung herbeizuführen. Sie wirken nur hemmend auf den F Xa. Diese Entdeckung läßt hoffen, die antithrombotische Eigenschaft (anti Xa) von der antikoagulatorischen (Thrombininhibition) zu trennen und somit den hämorrhagieinduzierenden Effekt von UFH zu vermeiden [72].

Seit den siebziger Jahren wird die „low-dose“-Heparinprophylaxe mit UFH, d.h. Heparine mit breitem Molekulargewichtsspektrum (5000-30000 Dalton) durchgeführt. In dieser Arbeit wurde zur Inkubation des PRP ebenfalls Heparin-Natrium (Heparin, B. Braun, Melsungen, Deutschland) verwendet.

Der antithrombotische Wirkungsmechanismus besteht aus folgenden Komponenten:

- Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit bei der Hemmung mehrerer Gerinnungsfaktoren durch AT III
- Freisetzung körpereigener heparinähnlicher Substanzen
- Aktivierung der körpereigenen Fibrinolyse
- Verminderung der Adhäsivität der Thrombozyten
- Verstärkung der negativen Ladung des Gefäßendothels und dadurch Hemmung der Anlagerung von Thrombozyten [25].

UFH ist eine Substanz, die in dieser Arbeit beim Test der Thrombozytenreaktivität herangezogen wird.

Abgesehen von den Erfolgen, die durch den Einsatz von Heparin in der Thromboseprophylaxe erzielt wurden, sollte auch auf Eigenschaften eingegangen werden, die bei der Anwendung nicht außer acht zu lassen sind.

Eine variable Heparin-Clearance-Rate und die Tatsache, daß UFH an eine Reihe von anderen Proteinen mit Heparinbindungsstellen bindet, führen zu großen Unterschieden der UFH-Bioverfügbarkeit nach intravenöser Gabe. Daher liegen die Patienten trotz Überwachung oft außerhalb des therapeutischen Bereiches. Bei subkutaner Gabe ist die Bioverfügbarkeit des UFH mit ca. 30 % gering. Weiterhin ist die Wirkung dadurch eingeschränkt, daß im Gerinnsel gebundenes Thrombin und F Xa

nicht inaktiviert werden können. Zunehmende Bedeutung erlangt die Tatsache, daß durch die Bindung von UFH an Proteine Neoantigene entstehen, die Antikörper induzieren und zu einer Immunreaktion, der sogenannten heparininduzierten Thrombozytopenie (HIT) führen können [23] (siehe auch 1.6.).

Auch haben Beobachtungen gezeigt, daß Heparin die Endothelzellproliferation unabhängig von seinen antikoagulatorischen Eigenschaften positiv beeinflusst. Dies scheint im Zusammenhang mit Heparininteraktionen mit dem Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF) zu stehen. Mitglieder dieser Familie von potenten, endothelialen Mitogenen und angiogenen Faktoren binden mit hoher Affinität an immobilisiertes Heparin. Dies deutet die Rolle von Heparin bei der Regulierung des Endothelzellwachstums durch Modulation von wachstumsregulierenden Stoffen an [11].

### **b) niedermolekulare Heparine (LMWH)**

Es ist wichtig, die Gerinnungskaskade an einem möglichst frühen Punkt zu unterbrechen, ohne in die normale Hämostase zu sehr einzugreifen. LMWH haben gegenüber UFH eine besonders hohe AT III-abhängige hemmende Aktivität gegenüber F Xa. LMWH werden durch eine Reihe von Techniken hergestellt. Ihr Molekulargewicht reicht von 3000 bis 9000 Dalton.

Parameter	UFH	LMWH
Molekulargewicht	12 000 - 15 000	3000 - 9000
Bioverfügbarkeit s.c. niedrige Dosis/hohe Dosis	schlecht / gut	gut / gut
Halbwertszeit (h)	1 - 2	2 - 4
Prädiktivität der Dosis	mäßig	gut
Laborkontrolle	PTT	anti-F Xa, Hep-Test
Antikoagulatorische Wirkung	++	++
Blutungsrisiko	+	(+)
HIT II	++	+
Osteoporose	+	(+)
Thrombozytenfunktionshemmung	++	+

**Tabelle 4:** Charakteristische Merkmale von UFH und LMWH [54]

Studien haben deutlich gezeigt, daß feste Dosen eines LMWH mindestens genauso effektiv sind, wie angepaßte Dosen von Standardheparin und somit, nachdem ein Monitoring in den Hintergrund tritt, Patienten auch zu Hause behandelt werden können [30]. Beispiele für LMWH sind Certoparin (Monoembolex, Novartis Pharma, Nürnberg, Deutschland) Enoxaparin (Clexane, Aventis Pharma, Bad Soden, Deutschland) und Nadroparin (Fraxiparin, Sanofi-Synthelabo, Berlin, Deutschland), die auch in dieser Arbeit als Inkubationsstoffe für die Strömungsversuche verwendet werden.

### ***c) von Heparinfragmenten freie Wirkstoffe (Heparinoide)***

Der Begriff Heparinoid ist veraltet, kann jedoch über seine Funktionalität definiert werden, als antithrombotische Substanz mit heparinähnlichen Eigenschaften. Wie die Heparine haben sie einen stärkeren Effekt auf die Inaktivierung von F Xa, als auf die Thrombininhibition. Sie katalysieren die Hemmung von F IIa durch AT III und die Bildung von Heparin Cofaktor II (siehe Tabelle 3) [6].

In diese Kategorie der antithrombotischen Medikamente gehört Danaparoid-Natrium (Orgaran, Thiemann, Deutschland), eine Mischung von Glukosaminoglykanen, die aus Schweinedarmmukosa gewonnen wird. Das durchschnittliche Molekulargewicht beträgt 6000 Dalton. Auch wenn es aus dem gleichen Rohmaterial wie Heparin und LMWH hergestellt wird, ist die Substanz durch Isolation und Reinigung frei von Heparin oder Heparinfragmenten. Es besteht zu 84% aus Heparansulfat, 12% Dermatan-sulfat und 4% Chondroitinsulfat [36]. Die Heparansulfatfraktion ist verantwortlich für die selektive Hemmung von Faktor Xa durch AT III. Die katalytische Wirkung auf die Thrombininaktivierung durch Heparin-Cofaktor II läßt sich dem Dermatan-sulfat zuschreiben [36].

Danaparoid-Natrium ist ebenfalls eine Substanz, die in dieser Arbeit zur Inkubation von plättchenreichem Plasma verwendet wird.

Aufgrund der niedrigen Kreuzreaktivität mit Heparin-induzierten Antikörpern scheint Orgaran eine geeignete Alternative in der antithrombotischen Therapie bei HIT-Patienten zu sein [70]. Der Grund für den Unterschied in der Kreuzreaktivität liegt höchstwahrscheinlich in der Tatsache, daß Danaparoid-Natrium im Gegensatz zu LMWH kein Heparin und keine Heparinfragmente enthält und eine niedrigere Ge-



samt-Ladungsdichte (also weniger Sulfatgruppen) besitzt [36]. Trotzdem sollte während der Behandlung von HIT-Patienten täglich die Thrombozytenzahl kontrolliert werden, da auch eine geringere Kreuzreaktivität zu Komplikationen führen kann [6].

#### **d) Hirudin, ein natürlich vorkommender Thrombininhibitor**

Der Blutegel *Hirudo medicinalis* produziert in seinen Peripharyngealdrüsen den Thrombininhibitor Hirudin. 1884 führte die Beobachtung, daß auch nach Entfernen des Blutegels von der Haut die Bißstelle weiter blutete, zur Entdeckung einer gerinnungshemmenden Substanz im Speichel des Blutegels [27]. Anfang des 20. Jahrhunderts konnte ein Extrakt aus den Köpfen von Blutegeln gewonnen werden und weitere 50 Jahre später wurde Hirudin isoliert, der Wirkmechanismus aufgeklärt und die Substanz chemisch charakterisiert [52].

Erst die Gentechnologie machte eine Produktion ausreichender Mengen dieses Wirkstoffes aus Bakterien oder Hefen möglich. Im Gegensatz zu natürlichem Hirudin sind rekombinante Hirudine in ihrer Struktur homogen. Ein Beispiel aus dieser Wirkstoffgruppe ist Desirudin ein einkettiges Polypeptid aus 65 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 6964 Dalton.

Hirudin ist im Gegensatz zu den Heparinen und Heparinoiden ein direkter Thrombinhemmer, der seine Wirkung unabhängig vom Vorhandensein von AT III und Heparin-Cofaktor II entfaltet [52]. Desirudin bindet selektiv an Thrombin und bildet einen stabilen 1:1 stöchiometrischen Komplex. Desirudin inaktiviert sowohl freies als auch an Fibrin gebundenes Thrombin. Hirudin hemmt nicht nur die Thrombinfunktion in der Endstrecke der Gerinnungskaskade, sondern auch die thrombinabhängige Thrombozytenaktivierung. Ebenso kommt es unter Verwendung von Hirudin nicht zu immunologisch vermittelten Thrombozytopenien, wie sie als HIT bei Heparin-gabe auftreten [52]. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde auch Hirudin bzw. rekombinantes Hirudin Desirudin (Revasc, Novartis, Nürnberg, Deutschland) in dieser Arbeit ausgewählt, um seinen Effekt auf Thrombozyten zu testen.

	Heparin	LMWH	Orgaran	Hirudin
<b>Bioverfügbarkeit (s.c.)</b>	20-30%	90%	ca. 100 %	ca. 100%
<b>Anti-Xa : Anti-IIa Aktivität</b>	1	2,5	20	direkte, spezifische Thrombinhemmung
<b>Inzidenz von Kreuzreaktionen mit heparininduzierten AK</b>	100%	80-90 %	< 10%	∅

**Tabelle 5:** Eigenschaften von Heparin, LMWH, Orgaran und Hirudin [36, 52, 65]

### 1.5.2. Indirekt wirkende Antikoagulantien

Die Derivate des 4-Hydroxy-Cumarins oder 1,3-Indandions wirken indirekt, d.h. sie greifen nicht unmittelbar in den Ablauf der Gerinnung ein. Die gerinnungshemmende Wirkung der Cumarine beruht darauf, daß die VitaminK-abhängig gebildeten Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X sowie Protein C und S unter ihrem Einfluß als unvollständige Vorstufen synthetisiert werden. Zu den häufigsten unerwünschten Nebenwirkungen gehören Blutungen. Bedrohlich sind Blutungen aus den ableitenden Harnwegen und akute Blutungen aus dem Magen-Darm-Trakt [15].

### 1.5.3. Hemmstoffe der Thrombozytenaggregation und -funktion

Die wichtigste klinische Indikation für eine Antiplättchentherapie ist die Prävention der arteriellen Thrombose. Arterielle Thromben setzen sich hauptsächlich aus Thrombozyten zusammen und werden unter Bedingungen von sich rapide ändernden Scherraten an Stellen atherosklerotischer Gefäßverletzung und/ oder gestörtem Blutfluß gebildet [62]. Die Antiplatelet Trialists' Collaboration Meta-analysis zeigte den Nutzen einer Antithrombozytentherapie bei Patienten mit atherosklerotischer Krankheit. Acetylsalicylsäure ist die am besten untersuchte Substanz und wird für das Standardmedikament der Antiaggregationstherapie gehalten.

Dieser Wirkstoff greift, neben seinen analgetischen und antipyretischen Eigenschaften, an der Stelle der Thromboxan  $A_2$ -Synthese in das Gerinnungssystem ein. Thromboxan ist ein Vasokonstriktor und regt Thrombozyten zur Aggregation an. ASS hemmt in Thrombozyten die Cyclooxygenase, die unter anderem die Bildung von Thromboxan katalysiert, durch Acetylierung irreversibel. Dies erklärt, warum die Blutungszeit relativ lange anhält. Die bislang empfohlene Langzeitbehandlung von pAVK-Patienten mit Thrombozytenaggregationshemmern reduziert zwar die kardiovaskulär bedingte Mortalität, einen Beleg für das Aufhalten einer Progression der pAVK gibt es jedoch nicht [14]. Reiningner CB et al zeigte in einer Studie [45], daß mittels der SPAA-Methode keine Unterschiede in der ASS-Patientengruppe, verglichen mit denjenigen pAVK-Patienten auftraten, die kein ASS erhielten. Ihre Schlußfolgerung bezieht sich auf die Tatsache, daß im arteriellen System hauptsächlich die Thrombin-initiierte Thrombozytenaktivierung eine Rolle spielt. Thrombin ist jedoch ASS resistent. Deshalb wird häufig zur perioperativen Therapie von pAVK-Patienten zusätzlich zu Aggregationshemmern noch die Gabe von thrombininhibierenden Substanzen, wie z.B. Hirudin, empfohlen [10, 21].

Aber auch neue Substanzen, die an unterschiedlichen Stellen der Thrombozytenaktivierung eingreifen, sind entwickelt worden, wie Clopidrogel, ein neuer ADP-Rezeptor-Antagonist, oder wie Abciximab ein Glykoprotein-IIb-IIIa-Komplex-Antagonist [74].

## **1.6. Komplikationen der Heparintherapie – HIT**

Im Gegensatz zur Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ I (HIT Typ I), die durch einen mäßigen Abfall (< 30%) der Thrombozytenwerte gekennzeichnet ist und sich in der Regel nach einigen Tagen ohne schwerwiegende Komplikationen normalisiert, ist die HIT Typ II eine lebensbedrohliche Komplikation der Heparintherapie. Betroffene Patienten sind durch diese immunologische unerwünschte Wirkung der Heparin-gabe gefährdet, neue thromboembolische Gefäßverschlüsse zu entwickeln [24].

HIT Typ II ist die wichtigste Immunthrombozythopenie wegen ihrer relativ großen Häufigkeit und Assoziation zu arteriellen und venösen Thrombembolien. Die Immun-

reaktion tritt meistens 5 bis 14 Tage nach Beginn der Heparintherapie auf. Sie ist charakterisiert durch einen deutlichen Abfall der Thrombozytenzahl (>50 %) begleitet von einer erneuten thromboembolischen Komplikation. HIT Typ II wird vermittelt durch Antikörper der Ig G Klasse. Als Antigen dient ein Komplex aus Thrombozytenfaktor 4 (PF 4) und Heparin [20, 22]. Da sich, wie schon erwähnt, Thrombozyten von pAVK-Patienten hyperreaktiv verhalten [14], setzen sie möglicherweise erhöhte Mengen von PF4 frei und können infolgedessen mehr Heparin binden als ruhende Thrombozyten [29]. Im Gegensatz zu anderen medikamenteninduzierten Immunthrombozytopenien ist HIT Typ II trotz Antikoagulation und niedrigen Thrombozytenwerten selten begleitet von Blutungen, sondern durch Thrombosen.

Was dies im besonderen bei pAVK-Patienten bedeutet, wurde in einer Studie von C.B. Reininger et al. [48] untersucht. Es wurde bei pAVK-Patienten präoperativ mittels HIPA-Test nach Heparin-Antikörpern gesucht. Bei diesem Test werden Thrombozyten mit Serum und Heparin in verschiedenen Konzentrationen in einer Mikrotiterplatte gerührt. Eine Aktivierung der Testthrombozyten führt zur Aggregation und zur Abnahme der Trübung. Bei diesem Test gab es bei keinem der Patienten präoperativ einen Hinweis auf Antikörper. Die Patienten erhielten nach gefäßchirurgischen Operationen UFH intravenös. Postoperativ wurde bei 60% der pAVK Patienten HIT Typ I nachgewiesen. Bei 32% wurden HIT-Antikörper nachgewiesen, bei 40% konnten sie nicht sicher ausgeschlossen werden. In der Studie wird vermutet, daß es durch oben erwähnte vermehrte Freisetzung von PF 4 und höherer Heparinbindung zu einer erhöhten Antigenpräsentation und dadurch zu einer gesteigerten Immunantwort kommt.

Allen funktionellen Tests ist gemeinsam, daß sie die Feststellung der in-vitro-Kreuzreaktivität zwischen unfraktioniertem Heparin und LMWH bzw. dem Heparinoid Organan zulassen. Eine Kreuzreaktion zwischen unfraktioniertem Heparin und LMWH ist fast immer nachweisbar. Etwa 5-10 % der Patienten mit HIT-Antikörpern weisen eine Kreuzreaktivität mit Organan auf [21, 22].

Intensivpflichtige Patienten und solche mit pAVK sind von dieser Immunthrombozytopenie häufiger betroffen als andere Patienten. Zwischen 30% und 75% der Patienten mit HIT Typ II entwickeln eine Thrombose. Die Beobachtung, daß HIT seltener bei Therapie mit LMWH auftritt, läßt vermuten, daß die HIT vermeidbar ist [73]. Die Diagnose einer HIT II sollte nach klinischen Gesichtspunkten und *in vitro* Tests auf heparinabhängige Antikörper gestellt werden.

Sobald ein Patient jedoch klinische Symptome einer HIT entwickelt, wie der Abfall der Thrombozytenwerte unter 50% des Ausgangswertes, oder neue thromboembolische Komplikationen, sollte die Heparinbehandlung sofort unterbrochen werden, auch ohne klinische Tests. Danaparoid-Natrium (Orgaran) ist das am meisten eingesetzte alternative Koagulans zur parenteralen Behandlung von HIT-Patienten und hat LMWH als weitere Alternativen vollständig verdrängt [24, 62]. Der Pathomechanismus der HIT-Typ-II mit einer massiven Steigerung der Thrombinbildung, die einerseits eine erneute Thrombozytenaktivierung hervorruft und andererseits zu einer Aktivierung der plasmatischen Gerinnung führt, lässt auch an einen Einsatz von direkt Thrombin hemmenden Substanzen wie Hirudin denken. Hirudin geht auch keine Interaktion mit Thrombozyten ein, besitzt aber eine potentielle Antigenität [26].

---

## 2. Staupunkt-Adhäsio-Aggregometrie (SPAA):

### Ein Modell der Gefäßwand-Blut-Interaktion in Echtzeit

#### 2.1. Entstehung von SPAA und deren klinische Relevanz

Bereits 1968 wurde von Petschek, Adamis und Kantrowitz Staupunktströmung *ex vivo* am Tiermodell untersucht. Die Beobachtung, daß der Thrombozyten-Oberflächen-Kontakt, der aus dieser konvektiven (senkrecht zur Oberfläche), lamina- ren Strömung resultiert, optimale Bedingungen für die Analyse der wandnahen Inter- aktion von Thrombozyten und Oberfläche liefert, führte zur Entwicklung der Stau- punkt-Adäsio-Aggregometrie (SPAA). Seit 1990 wurde in der Thrombosefor- schungsgruppe der Chirurgischen Klinik im Klinikum Innenstadt der LMU München in mehrjähriger intensiver Forschung die Standardisierung und Weiterentwicklung der SPAA-Methode, die für eine klinische Anwendung notwendig war, vorangetrieben. Die klinische Relevanz des Meßverfahrens wurde inzwischen anhand mehrerer Stu- dien bei Patienten mit pAVK und frischen Thrombosen verifiziert [44, 45, 46, 48].

Mit der Staupunkt-Adhäsio-Aggregometrie wird die physiologisch relevante Stau- punktströmung simuliert und erlaubt ein wandnahe Betrachtung der Gefäßwand-Blut- Interaktion in Echtzeit. Mittels SPAA und anderen Methoden wurde experimentell nachgewiesen, daß Thrombozyten nur dort an eine Oberfläche binden, wo die Strö- mung konvektiv zur perfundierten Oberfläche ist. In Gebieten mit wandparalleler Strömung ist die Thrombozytenadhäsion dagegen vernachlässigbar gering. [43, 47, 49].

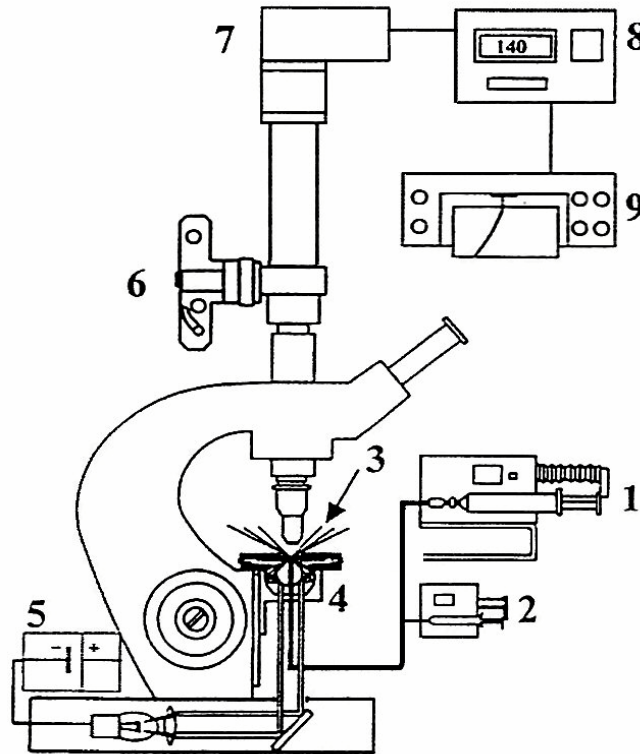
Bei Patienten mit pAVK wird vermutet, daß die Thrombozyten eine erhöhte Reakti- vität besitzen und das Blut eine gesteigerte Koagulabilität aufweist [3, 10]. Mit der SPAA-Methode konnte nachgewiesen werden, daß Thrombozyten von pAVK- Patienten eine erhöhte Adhäsivität und Aggregabilität aufweisen [46]. Es wurde ge- zeigt, daß sich die Hyperreaktivität der Thrombozyten von Patienten mit pAVK post- operativ nach Gefäßrekonstruktionen noch weiter erhöht [43, 46]. Durch diese er- höhte Neigung, an atherosklerotischen Läsionen zu haften, sind diese Patienten ei- nem erhöhten Thromboserisiko im Vergleich zu gefäßgesunden Menschen aus- gesetzt (siehe auch 1.6).

## 2.2. Die Mechanismen des SPAA-Meßsystems

Eine direkte Echtzeitbeobachtung und -messung von Thrombozytenablagerungen unter definierten Strömungsbedingungen ist durch die Dunkelfeldmikroskopie möglich. Eine Strömungskammer aus Edelstahl wird mit einem Plexiglaseinsatz in der Objektebene eines Dunkelfeldmikroskops (Orthoplan, Leitz Deutschland) installiert und mit einem Perfusor (B. Braun, Melsung, Deutschland) verbunden (siehe 2.2.1.). Plättchenreiches Plasma (PRP) wird mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit von 30 ml/h in die Strömungskammer transportiert und überspült dort eine Standardoberfläche (ultrareine Glasplättchen, Kindler, Deutschland).

Die im PRP suspendierten Thrombozyten werden durch die konvektive Strömung senkrecht gegen die Oberfläche gespült. Das von haftenden Thrombozyten gestreute Licht wird mit einem Photometer (Model 476005-9901, Zeiss, Deutschland) kontinuierlich gemessen und als Funktion der Zeit mit einem Zweikanalschreiber (Model 8262, Philips, Deutschland) als Lichtintensitätskurve aufgezeichnet. Der Ablagerungsprozeß wird in 1-minütigen Intervallen fotografisch (Nikon F301, Japan) festgehalten.

### 2.2.1. Geräteaufbau



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des SPAA-Meßsystems (Stand 1990): (1) Perfusor zur Erzeugung eines konstanten Volumenstroms; (2) Mikroperfusor mit Spritze, für den konstanten Zustrom der Testsubstanzen während des Versuchs; (3) stählerne Strömungskammer; (4) Dunkelfeldkondensator; (5) Gleichstromquelle; (6) Spiegelreflexkamera; (7) Photomultiplier; (8) Versorgungseinheit des Photomultipliers; (9) Zweikanalschreiber  
*Von PD Reininger freundlicherweise zur Verfügung gestellt.*

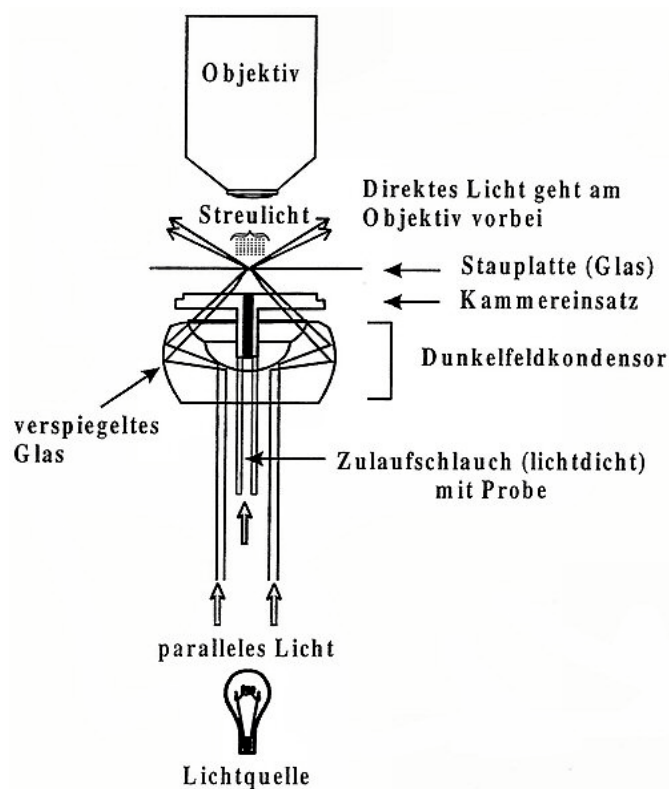
### 2.2.2. Dunkelfeldmikroskopie

Im Gegensatz zur Durchlicht-Hellfeldmikroskopie, bei der die mikroskopischen Präparate durchsichtig sind und damit durch das Licht der Lichtquelle durchleuchtet werden, wird in der Durchlicht-Dunkelfeldmikroskopie nur das an den zu beobachtenden Objekten gebeugte und gestreute Licht für Beobachter sichtbar. Daraus folgt, daß Objekte in der Dunkelfeldmikroskopie als helle Objekte auf schwarzem Untergrund sichtbar sind. Der Beobachter sieht dadurch auch sehr kleine Objekte außerordentlich kontrastreich, die in der Durchlicht-Hellfeldmikroskopie nur schwer zu erkennen wären [51].

In der folgenden Skizze (Abbildung 3) ist die Funktionsweise eines Durchlicht-Dunkelfeldmikroskops mit den wichtigsten Komponenten der Meßkammer zu sehen.



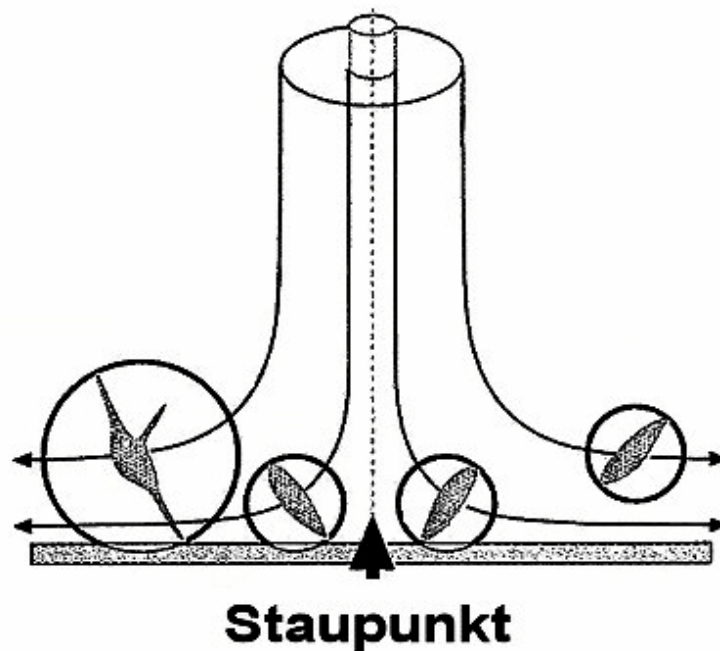
Das durch eine Lichtquelle mit entsprechenden optischen Systemen erzeugte parallele Licht wird von unten auf den Dunkelfeldkondensator geleitet. Wie in der Skizze ersichtlich, wird das Licht im Dunkelfeldkondensator so reflektiert, daß es durch die Kammer hindurch (Kammereinsatz und Stauplatte sind durchsichtig) am Objektiv vorbeigeleitet wird. Durch den Mittelpunkt des Dunkelfeldkondensators wird parallel zum einfallenden Licht das zu messende Medium in die Kammer eingeleitet. Teilchen in diesem Medium können nun durch Streuung und Beugung Licht (Streulicht) in das Objektiv ablenken [51].



**Abbildung 3:** Prinzipieller Aufbau des Dunkelfeldmikroskops mit der SPAA Meßkammer [51]

### 2.2.3. Darstellung der Stromlinien des Ein- und Ausstroms des SPAA-Systems

Die Darstellung des Mechanismus der Thrombozyten-Wand-Kollision in **Abbildung 4** zeigt, daß nur die Thrombozyten, die entlang von Bahnen innerhalb eines bestimmten Umkreises vom Staupunkt strömen, tatsächlich mit der Oberfläche kollidieren. Wurden die Thrombozyten zuvor aktiviert, und haben sie Pseudopodien gebildet, wird der Radius des Bereiches, in dem die Thrombozyten mit der Oberfläche in Kontakt treten, entsprechend größer [47].



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Stromlinien vom Ein- und Ausstrom in die SPAA-Strömungskammer und des Mechanismus der Thrombozyten-Wand-Kollision [50]

In **Abbildung 5** sind die tatsächlichen Bahnen (helle Streifen) zu sehen, denen die Thrombozyten (helle Punkte) bei ihrem Durchstrom durch die Flußkammer während eines SPAA-Experiments folgen. Die Staupunktströmungsbedingungen in der Strömungskammer wurden durch numerische Lösung der Navier-Stokes-Gleichung und der Stetigkeitsgleichung für laminare, gleichmäßige Strömung bestimmt, wobei eine nicht komprimierbare, Newtonsche Flüssigkeit vorausgesetzt wurde. Aufgrund der Symmetrie des Systems ist eine Beschreibung des gesamten Strömungsfeldes durch die Simulation der Strömungsbedingungen in nur einer Ebene möglich. Diese ist senkrecht zur überspülten Stauplatte orientiert und enthält die Symmetrieachse.



**Abbildung 5:** Thrombozytenstrom entgegen der Oberfläche dargestellt mittels Laser-Ultramikroskop-Anemometrie (LUA) [50]

#### 2.2.4. Das mathematische Modell

Um eine klinische Anwendbarkeit zu ermöglichen, wurde aufbauend auf Arbeiten von Tippe et al, [71] für die Quantifizierung der Testergebnisse ein mathematisches Modell entwickelt.

Die Lichtintensitätskurve der Adhäsion wird durch direkte Partikel-Wand-Interaktion bestimmt und gemäß Formel 1 beschrieben.  $K_{pw}$  ist eine Konstante, die die Stärke der Adhäsion zwischen Thrombozyt und Oberfläche beschreibt. Zusammen mit  $K_{pw}$  bestimmen die Anzahl der Thrombozyten ( $P$ ), die pro Zeiteinheit auf zur Staupunkt-oberfläche transportiert werden, die maximale Aufnahmekapazität ( $K$ ) der Oberfläche für sich ablagernde Thrombozyten und die Anzahl, der sich von der Oberfläche nach Anlagerung wieder lösenden Thrombozyten ( $\tau_1$ ) die Gesamtzahl ( $P_d$ ), der sich am Ende eines Experiments noch auf der Staupunkt-oberfläche verbleibenden Thrombozyten. Die wichtigste Größe in folgender Gleichung ist der Adhäsionskoeffizient  $K_{pw}$ , der die Gesamtenergie der Interaktion bzw. die Stabilität des Partikel-Wand-Kontaktes beschreibt und damit, bei einer standardisierten Wand-oberfläche, das Adhäsionsvermögen der abgelagerten Thrombozyten.

Es wird folgende Formel vorausgesetzt:

$$(1) \quad P'_d(t) = K_{pw} \cdot P \cdot (1 - P_d(t)/K) - \tau_1 \cdot P_d(t)$$

$K_{pw}$  dagegen stellt die Stabilität der Thrombozyteninteraktionen dar. Bei der mittels SPAA gemessenen Aggregation ist nur die Interaktion von Thrombozyten mit bereits abgelagerten Thrombozyten gemeint, nicht aber eine Interaktion der Thrombozyten mit der Wand. Die entsprechende Differentialgleichung lautet:

$$(2) \quad P'_{da}(t) = K_{pp} \cdot P_d(t) - \tau_2 \cdot P_{da}(t)$$

wobei  $P_{da}(t)$  die Gesamtzahl der miteinander aggregierenden Thrombozyten und  $\tau_2$  eine Konstante für die Rate der sich nach Aggregation wieder lösenden Thrombozyten ist.

Finden bei einem Perfusionsexperiment Adhäsion und Aggregation gleichzeitig statt, so wird dieser Prozeß mit folgender Formel beschrieben:

$$(3) \quad f(t) = P_d(t) + P_{da}(t)$$

wobei  $P_d(t)$  und  $P_{da}(t)$  in Formel 1 und 2 beschrieben werden. Die Lösung kann zwar exakt hergeleitet werden, die Bestimmung der Parameter  $K_{pw}$ ,  $K_{pp}$ ,  $\tau_1$  und  $\tau_2$  durch Angleichung der experimentellen Daten an die dadurch entstehende Gleichung führt jedoch zu schweren numerischen Problemen. Deshalb wurde mittels Taylor-Reihe eine sequentielle Differenzierung durchgeführt, um daraus eine praktisch anwendbare Formel herzuleiten.

$$(4) \quad f(t) = [(K_{pw} \cdot P) / \tau_1] \cdot [1 - \exp(-\tau_1 \cdot t)] + [(K_{pw} \cdot K_{pp} \cdot P) / 2] \cdot t^2$$

Der Startpunkt der mathematischen Kurvenanalyse wurde bei 0,8 - 1,0 Minuten ab Beginn der Perfusion gewählt, da erst ab diesem Zeitpunkt stabile Flußverhältnisse an dem Staupunkt eintreten [5, 50].

### **2.2.5. Fit-Dauer**

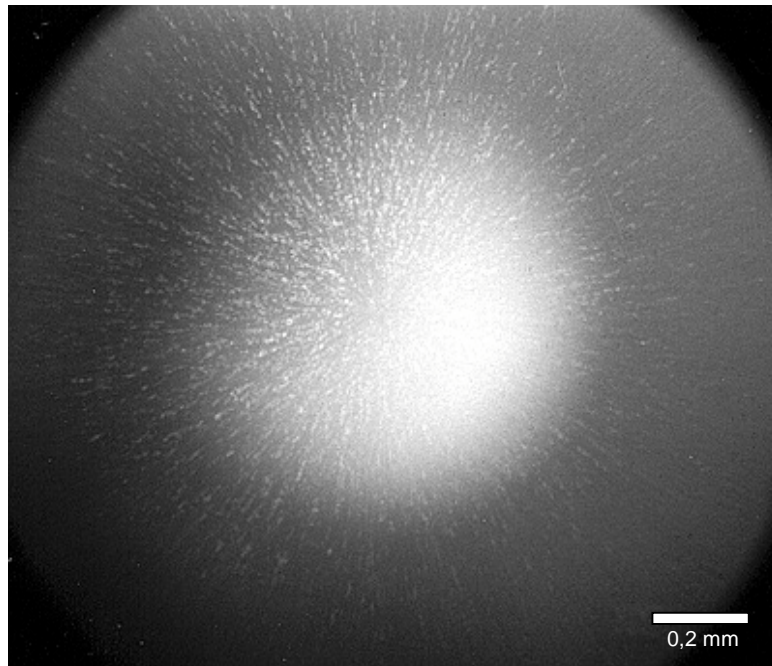
Um die minimale Zeit zu bestimmen, die noch lang genug war, um eine adäquate numerische Stabilität der Adhäsions- und Aggregationsfunktion zu liefern, wurden die Lichtintensitätskurven für insgesamt 20 min schrittweise in 1-minütigen Intervallen angeglichen. Eine Stabilisierung des Zahlenwertes für die Adhäsion wurde bei etwa 4 min beobachtet, wobei die Stabilität danach erhalten blieb. Der Zahlenwert der Aggregationsfunktion erreicht nach 4 - 5 min stabile Werte, wurde nach 7 – 8 min aber wieder instabil. Auf Grund dieser Ergebnisse werden Lichtintensitätskurven der SPAA-Experimente jetzt durchwegs für insgesamt 6 min nach Perfusorstart gefittet [50].

### **2.2.6. Quantifizierung der gemessenen Adhäsions- und Aggregationswerte**

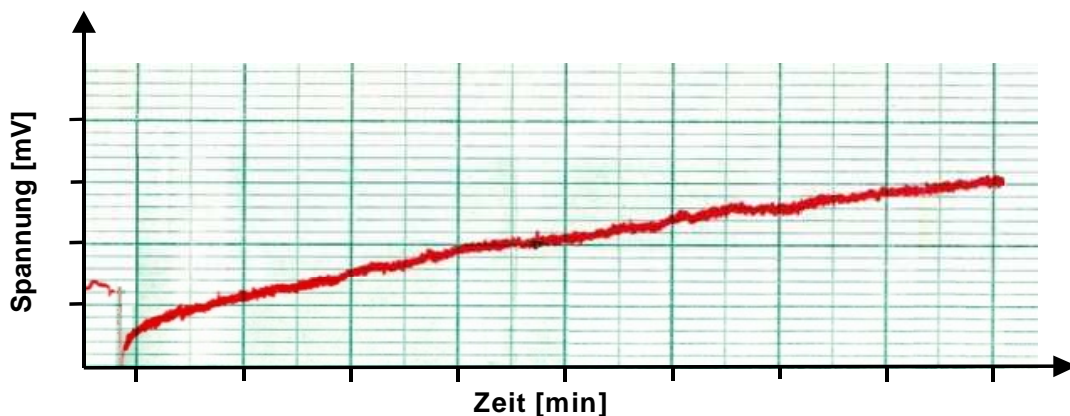
Während des Experiments werden die gemessenen Lichtintensitäten aufgezeichnet. Diese SPAA-Lichtintensitätskurven resultieren aus Echtzeitmessungen des Streulichts abgelagerter Thrombozyten. Durch die mathematische Analyse der Lichtintensitätskurve ist anschließend die Quantifizierung der in Echtzeit gemessenen Thrombozytenadhäsion und Aggregation möglich. Dafür wird nicht nur deren Anzahl, sondern auch die morphologische Struktur der Ablagerungen verwendet, weil die jeweiligen Reaktionskinetiken der Adhäsions- und Aggregationsfunktion sich signifikant voneinander unterscheiden. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktionskinetik der Thrombozytenadhäsion und Aggregation werden Differentialgleichungen angewendet (siehe 2.2.4.), die für die Adhäsion eine exponentielle und für die Aggregation eine parabolische Annäherung berücksichtigen.

Sowohl der Grad der Adhäsion als auch der Aggregation ist linear abhängig von der Thrombozytenkonzentration in der jeweiligen PRP-Probe, deshalb wurden die Zahlenwerte der Untersuchung in Übereinstimmung mit der jeweiligen Auszählung der Thrombozyten normiert [35, 55].

In mehreren Arbeiten wurde von Reiningger CB et al. [43, 49, 71] gezeigt, daß aufgrund der Analyse des mathematischen Modells und der Form der jeweiligen Lichtintensitätskurven eine Klassifizierung der Kurven möglich ist.



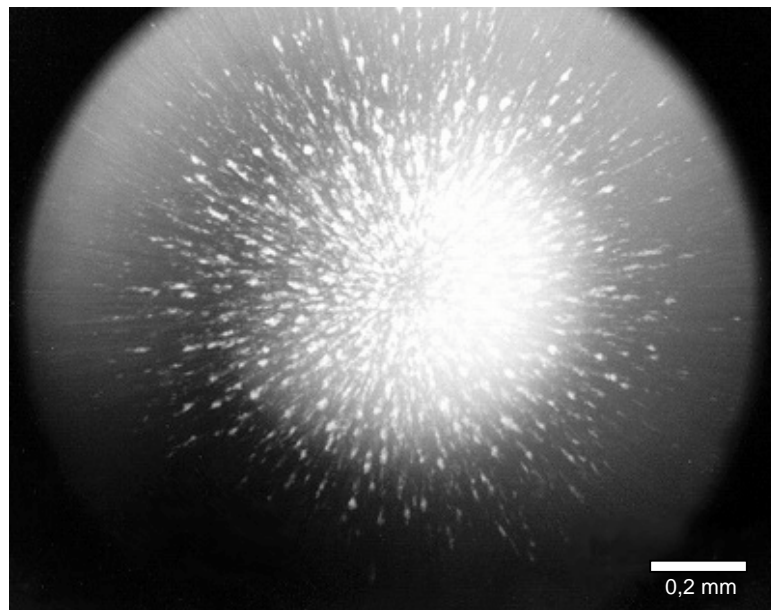
**Abbildung 6:** Dunkelmikrographie der haftenden Thrombozyten, wie sie beim Überspülen mit PRP bei überwiegender Adhäsion im Mikroskop als auswärtsgerichtete Strahlen gesehen werden



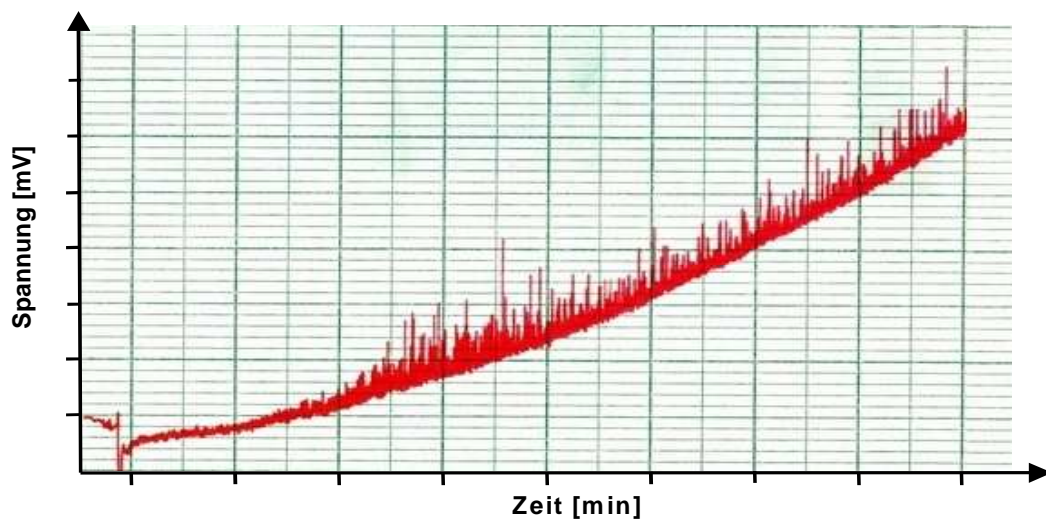
**Abbildung 7:** Konvexe Lichtintensitätskurve bei reiner Thrombozytenadhäsion

Die Typen resultieren aus deutlich unterscheidbaren Grundmustern der Thrombozytenablagerung. Dabei weist ein zur x-Achse konvexer Kurvenverlauf wie in **Abbildung 7** mit niedriger Amplitude auf eine nicht pathologische Adhäsion, ohne spontane Aggregation hin. Betrachtet man sich das entsprechende Photo der Dunkelmikrographie, erscheinen die Thrombozyten als kleine weiße Punkte und man erkennt die zarte streifenförmige Ablagerung der Thrombozyten, die die Strömung widerspiegeln.





**Abbildung 8:** Dunkelmikrographie der haftenden Thrombozyten, wie sie beim Überspülen mit PRP bei überwiegender Aggregation im Mikroskop als auswärtsgerichtete Strahlen gesehen werden



**Abbildung 9:** Konkave Lichtintensitätskurve bei überwiegender Thrombozytenaggregation

Zur x-Achse konkave Kurvenverläufe wie in **Abbildung 9** hingegen deuten auf eine gesteigerte Aggregation hin. Das Photo in **Abbildung 8** zeigt eine deutliche Vermehrung der streifenförmigen Ablagerung, im Sinne eines Zusammenfließens zu einer dichten, konfluenten Schicht. Man beachte die extreme Konkavität und die große Amplitude der Kurve.

---

### **3. Patienten und Methoden**

#### **3.1. Studienteilnehmer**

Die Studie wurde gemäß den Richtlinien der Universität und Zustimmung der Ethikkommission durchgeführt. An der vorliegenden Studie nahmen 38 Patienten mit pAVK im Stadium IIa bis IV teil (31 männlich/ 7 weiblich, Alter  $\bar{x}$  61 Jahre). 6 Patienten hatten vor dem stationären Aufenthalt schon einmal Heparin bekommen. Alle Patienten haben in den letzten 12 Stunden vor Blutabnahme eine Nahrungskarenz eingehalten und keine Medikamente eingenommen.

Als Kontrollen dienten 28 freiwillige, aufgeklärte, in gutem Allgemeinzustand befindliche Personen, bei denen eine Gefäßerkrankung durch einen Fragebogen und eingehende, körperliche Untersuchung ausgeschlossen wurde (21 männlich/ 7 weiblich, Alter  $\bar{x}$  36). Die als Kontrollen dienenden Personen hielten vor der Blutabnahme eine mindestens 10-tägige Aspirinkarenz ein und nahmen keine sonstigen Medikamente zu sich.

#### **3.2. Blutabnahme und Probenaufbereitung**

Die Blutabnahme erfolgte sowohl bei Patienten als auch Kontrollen nach mindestens 10-stündiger Nahrungskarenz. Das venöse Blut wurde unter minimaler Stauung und geringem Ansaugen aus der Ellenbeuge mit einer großkalibrigen Kanüle gewonnen. Die ersten 10 ml gingen nicht in die Messung ein und wurden für Laboruntersuchungen verwendet. Das für die SPAA Untersuchungen vorgesehene Blut wurde in 10 ml-Spritzen (Monovetten, Sarstedt, Deutschland), die 1 ml 3,8 % Natriumcitrat-Lösung enthielten, aufgezogen. Das nötige PRP wurde anschließend durch 10 minütiges Differentialzentrifugieren bei 260g gewonnen. Plättchenarmes Plasma wurde vom restlichen Blut durch weiteres 10 minütiges Zentrifugieren bei 1000g erhalten und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Bestimmung von Plasmamarkern aufbewahrt. Vor jedem Experiment wurden im PRP mittels eines Phasenkontrastmikroskops (Labophot, Nikon, Japan) und einer Neubauerkammer die Thrombozytenzahlen ermittelt.



### 3.3. Versuchsdurchführung

Aufgrund von Zeitverlaufsstudien wurde gezeigt, daß im Zeitraum von 90 - 240 min nach der Blutabnahme es nur zu einer geringen Variabilität der *ex vivo* Thrombozytenadhäsion kommt [19]. Demnach wurden alle SPAA-Experimente in diesem Zeitraum durchgeführt. Das plättchenreiche Plasma und die Plasmaproben wurden bis zum jeweiligen Versuch in verschlossenen Röhrchen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Um den Einfluß verschiedener gerinnungshemmender Substanzen auf die Thrombozytenadhäsion und Aggregation zu verfolgen, wurde das PRP der Patienten und Kontrollen fraktioniert und jeweils 10 Minuten vor Beginn des SPAA-Experiments gemäß der Dosierung (1 IU/ ml PRP) inkubiert. Zusätzlich ging den Inkubationsexperimenten jeweils eine Beströmung mit PRP ohne Zusatz von Wirkstoffen voraus, was zu einem Ausgangswert führte, anhand dessen Unterschiede nach der Inkubation berechnet werden konnten. Dem Perfusat wurden folgende Substanzen zugesetzt: Heparin (**HNB**), Monoembolex (**MBX**), Clexane (**CLX**), Fraxiparin (**FRX**), Hirudin (**HIR**), Orgaran (**ORG**). Die einzelnen Substanzen wurden unterschiedlich oft dem plättchenreichen Plasma der Probanden zugesetzt. Die Tabelle 6 zeigt die Anzahl der durchgeführten Versuche mit der jeweiligen Substanz.

Substanz	Adhäsion		Aggregation	
	Patienten	Kontrollen	Patienten	Kontrollen
<b>HNB</b>	35	27	35	27
<b>HIR</b>	17	12	17	12
<b>ORG</b>	25	19	25	9
<b>MBX</b>	17	14	17	14
<b>CLX</b>	26	22	26	14
<b>FRX</b>	17	13	17	13

**Tabelle 6:** Anzahl der Versuche mit jeweiligem Medikament

Hinweise zur Wirkweise und pharmakokinetische Daten der verwendeten Substanzen finden sich unter 1.5. medikamentöse Herabsetzung der Gerinnungsfähigkeit.

#### 3.4. Datenanalyse

Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Statistikprogrammen SAS 8e und StatX-act 5.0. Zunächst wurden mittels t-Test unter 4.1.1. die Mittelwerte von Kpw für PRP der beiden Kollektive „Kontrolle“ und „Patient“ auf statistische Signifikanz hin getestet. Angegeben werden sie mit den dazugehörigen Werten für die Standardabweichung (SD) und den 95%-Konfidenzintervallen (CI), die jeweils mit dem unteren und oberen Wert genannt werden. Ein p-Wert von  $<0,05$  wurde als signifikant gewertet. Ebenso ist unter 4.2.1. mit den mittleren Kpw-Werten nach Inkubation mit den verschiedenen zugesetzten Substanzen verfahren worden. Getestet wurde der Unterschied zwischen den Kollektiven.

Anschließend wurden unter Punkt 4.2.3. die mittleren Differenzen zwischen den Kpw-Werten nach Zusatz der Substanzen und den Kpw-Ausgangswerten tabelliert. Positive Zahlen besagen, daß die Kpw-Werte nach Inkubation größer waren als die PRP-Ausgangswerte, und entsprechend bedeuten negative Zahlen, daß die Ausgangswerte größer waren. Zunächst wurden mit dem t-Test die Unterschiede zwischen den Kollektiven getestet; p-Werte  $<0,05$  gelten als statistisch signifikant. Ebenso wurden Standardabweichung und 95%-Konfidenzintervalle bestimmt.

Mittels des Student's t-Test (t-Test für abhängige Stichproben) wurde dann jeder einzelne Mittelwert getestet, ob der Unterschied des Kpw-Wertes nach Inkubation im Vergleich zu dem Ausgangswert (PRP) statistisch signifikant ist. Hier wurde ebenfalls ein p-Wert  $< 0,05$  als signifikant erachtet.

Die Konstante für die Aggregation wurde anhand von Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein binominal kodiert [49]. Der McNemar's Test testet für jedes der beiden Kollektive separat, ob sich die Anteile der Patienten oder Kontrollen, die nach Inkubation ihres Plasmas eine Aggregation zeigen, im Vergleich zur stattgefundenen Aggregation bei PRP signifikant unterscheiden.

Mit Hilfe des Fisher's exakten Test wurden dann die Kollektive miteinander verglichen, ob sie sich signifikant hinsichtlich der Aggregation bei Zusatz einer bestimmten Substanz unterscheiden.

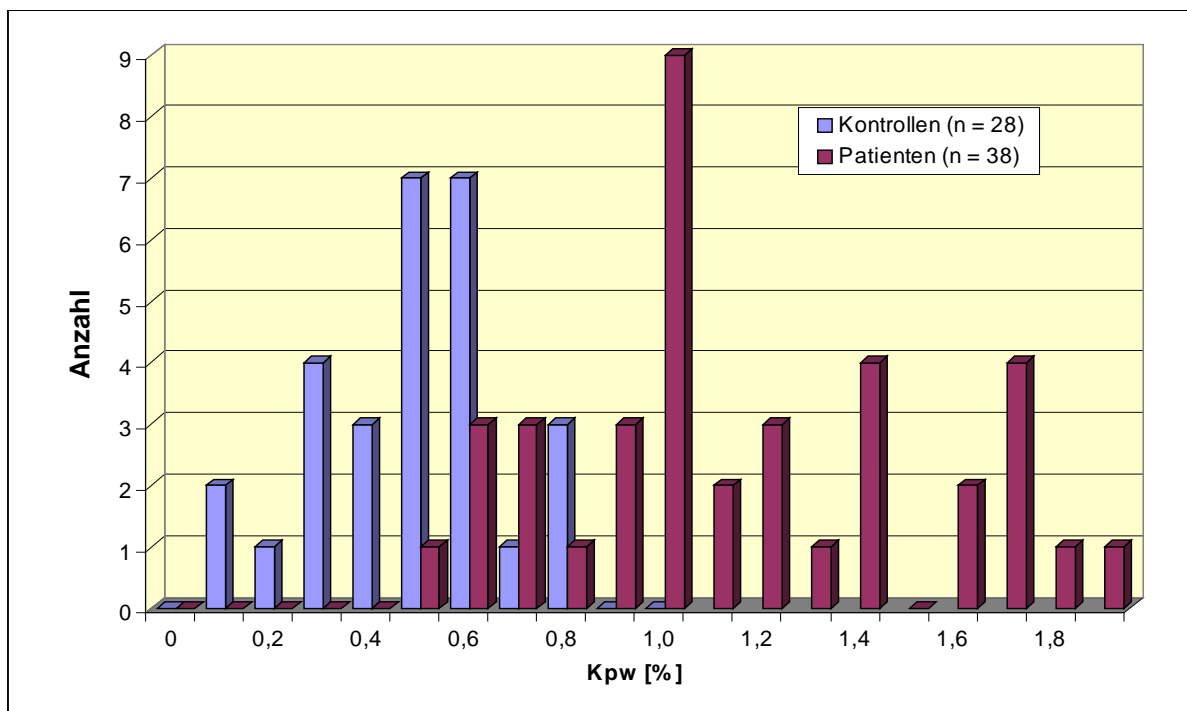
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Ausgangswerte des Kollektivs

#### 4.1.1. Adhäsion

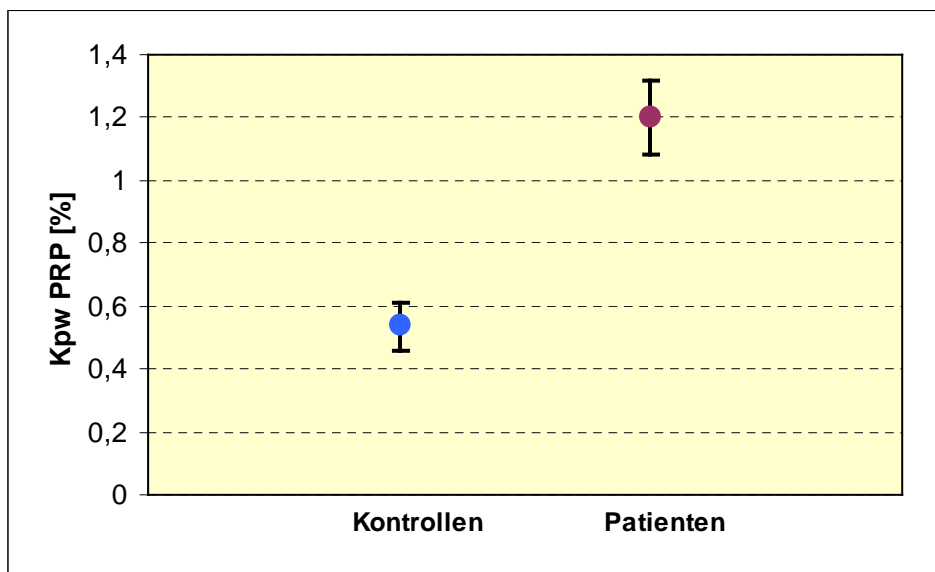
Die Thrombozytenadhäsion der Kontrollen, gemessen an den Kpw-Werten, betrug im Mittel 0,54% (SD 0,19; CI: 0,47; 0,62), die der Patienten war mehr als doppelt so hoch im Mittel 1,20% (SD 0,37; CI: 1,08; 1,32). Die Kollektive unterschieden sich signifikant ( $p < 0,0001$ ).

Die folgende Abbildung 10 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Kpw-Werte. Man beachte die geringe Überschneidung der Werte.



**Abbildung 10:** Häufigkeitsverteilung der Kpw-Werte der beiden Kollektive

Der Unterschied der beiden Kollektive hinsichtlich der Adhäsion wird auch bei der folgenden Darstellung ihrer Mittelwerte (Abbildung 11) und 95%-Konfidenzintervalle deutlich.



**Abbildung 11:** Vergleich der Mittelwerte der Kollektive mit 95%-Konfidenzintervall

#### 4.1.2. Aggregation

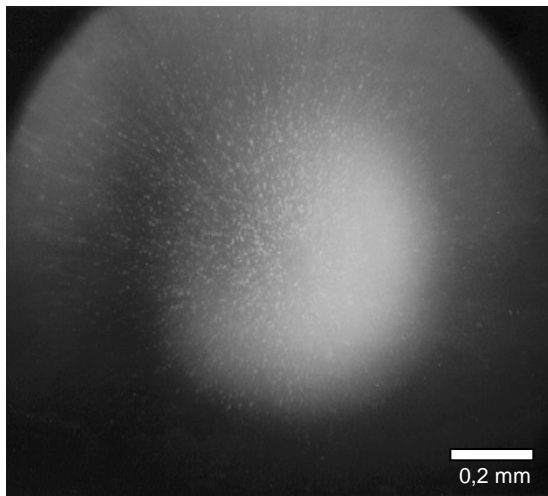
Spontane Aggregation wurde bei keiner der 28 Kontrollen und bei 14 (37%) der 38 Patienten beobachtet. Der exakte Test von Fisher bestätigt auch hier eine statistische Signifikanz (zweiseitiges  $p=0,0001$ ).

#### 4.1.3. Beispielkurven und -photos von Kontrollen und pAVK-Patienten

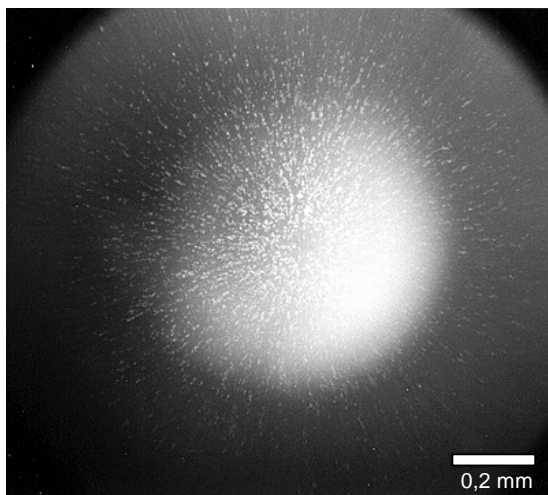
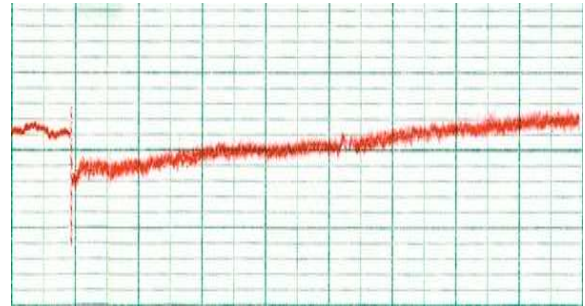
Die folgenden drei Bilder a, b und c in Abbildung 12 mit den korrespondierenden Kurven zeigen, wie sich plättchenreiches Plasma bei einem Versuch mittels SPAA bei einer gesunden Kontrollperson und 2 unterschiedlichen Gefäßpatienten verhält. Schon anhand von Photo a läßt sich erkennen, daß bei der Kontrollperson wesentlich weniger Thrombozyten an der Glasoberfläche haften bleiben, also nur eine geringe Adhäsion vorliegt. Korrespondierend dazu verläuft die Kurve nahezu linear mit niedriger Amplitude.

Die pathologisch veränderte Thrombozytenreaktivität der pAVK Patienten zeigt sich in den folgenden Bildern. Entlang der Strömungslinien bleiben vermehrt Thrombozyten an der Glasoberfläche haften (Photo b), was zu einer konfluierenden Schicht führt, als Ausdruck einer gesteigerten Adhäsion. Die Lichtintensitätskurven deuten ebenfalls durch eine konvexe Kurve mit vergrößerter Steigung die vermehrte Adhäsion an.

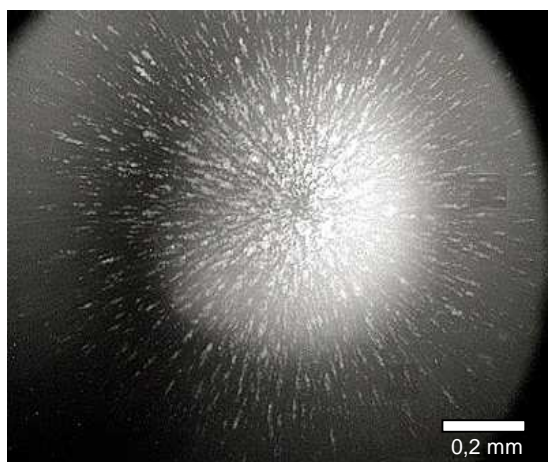
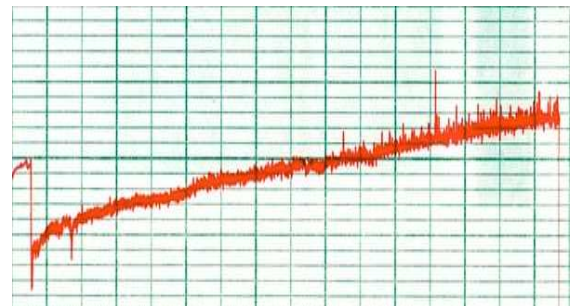
In Photo c ist nun eine fleckige, unregelmäßige Thrombozytenablagerung zu sehen. Zusätzlich zur Adhäsion aggregieren die Thrombozyten nun untereinander. Die Kurve verläuft bei Überwiegen der Aggregation konkav mit hoher Amplitude.



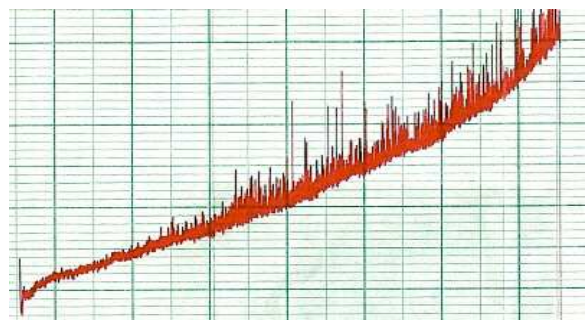
**a: Kontrollperson :PRP**



**b: Patient: PRP, gesteigerte Adhäsion**



**c: Patient: PRP, überwiegend gesteigerte Aggregation**



**Abbildung 12:** Dunkelfeldmikrophotos und korrespondierende Lichtintensitätskurven bei Kontrollperson und 2 verschiedenen Patienten

## 4.2. Inkubationsversuche

### 4.2.1. Darstellung der absoluten Adhäsionswerte nach Inkubation des PRP

Auch nach Inkubation unterschieden sich die beiden Kollektive innerhalb jeder Substanzgruppe statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ , außer Hirudin  $p < 0,03$  dennoch signifikant) voneinander.

Bei 27 Kontrollen (Mittelwert ( $\bar{x}$ ) 0,60; SD 0,30; CI: 0,48; 0,72) wurde **HNB** zugesetzt, davon stieg der Kpw-Wert bei 14 Probanden an, bei einem blieb er unverändert und bei 12 fiel er ab. Von den 35 Patienten ( $\bar{x}$  1,62; SD 0,69; CI: 1,38, 1,86) erfolgte eine Zunahme bei 29 Personen, ein Abfall bei 6.

Nach Zugabe von **Hirudin** stieg bei 4 der 12 Kontrollen ( $\bar{x}$  0,67; SD 0,50, CI: 0,35; 0,98) der Kpw-Wert an, bei einem blieb er gleich und bei 7 fiel er. Die 17 Patienten ( $\bar{x}$  1,21; SD 0,70; CI: 0,85, 1,56) verhielten sich bei den Versuchen mit 7 Anstiegen und 10 Kpw-Erniedrigungen.

**Orgaran** führte bei 11 der 19 Kontrollen ( $\bar{x}$  0,57; SD 0,29; CI: 0,43; 0,70) zu einem leichten Abfall der Adhäsionswerte, einem gleichbleibenden und 7 Anstiegen. Bei den 25 Patienten ( $\bar{x}$  1,11; SD 0,52; CI: 0,90; 1,32) erfolgte bei 9 eine Zunahme, 3 blieben gleich und 12 fielen ab.

Bei 14 Kontrollen ( $\bar{x}$  0,45; SD 0,29; CI: 0,29; 0,62) wurde mit **MBX** inkubiert. Es ergaben sich 6 Senkungen, 2 gleichbleibende Ergebnisse und 6 Anstiege. Die 17 Patienten ( $\bar{x}$  1,52; SD 0,70; CI: 1,16; 1,88) reagierten mit 6 Abfällen und 11 Anstiegen.

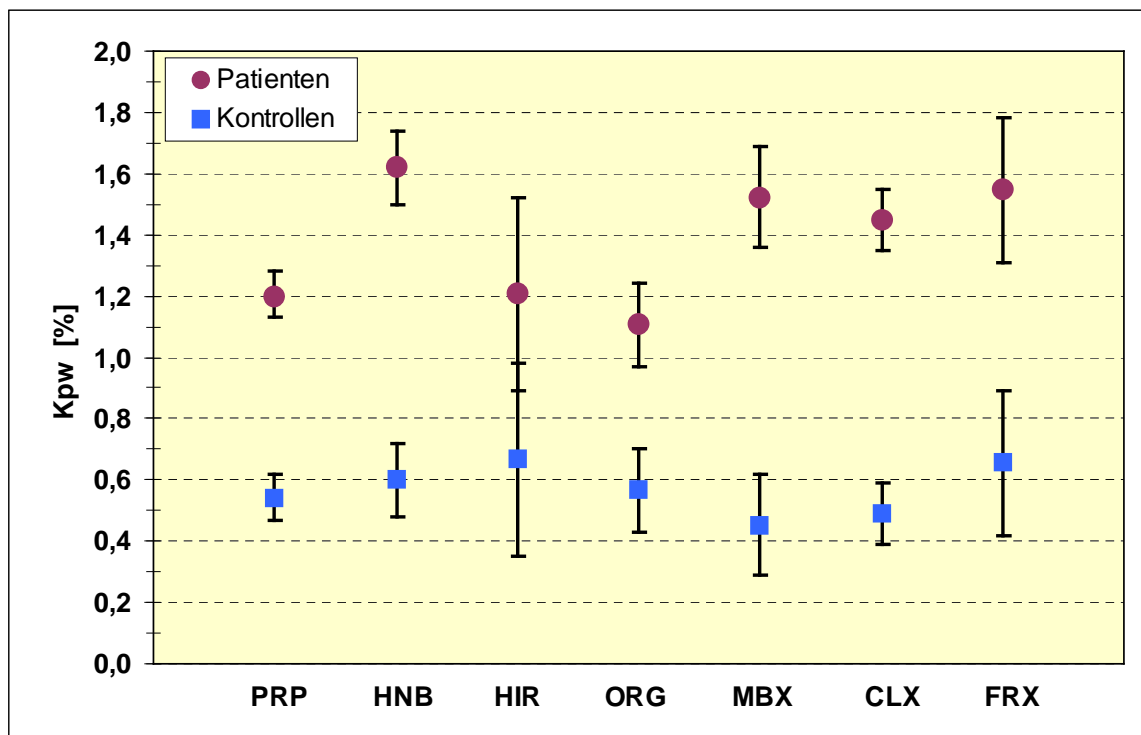
Die Zugabe von **CLX** erfolgte bei 22 Kontrollen ( $\bar{x}$  0,49; SD 0,23; CI: 0,39; 0,59). 10 Kpw-Werte fielen daraufhin ab, einer blieb gleich und 11 stiegen an. Bei den 26 Patienten ( $\bar{x}$  1,45; SD 0,64; CI: 1,20; 1,71) senkte sich 6 mal der Kpw-Wert, einmal blieb er gleich und 19 mal stieg er an.

Für **FRX** ergaben sich folgende Ergebnisse: von 13 Kontrollen ( $\bar{x}$  0,66; SD 0,39; CI: 0,42; 0,89) fiel der Adhäsionswert bei 6 Personen, blieb einmal gleich und stieg bei 6. 17 Patientenplasmen ( $\bar{x}$  1,55; SD 0,56; CI: 1,26; 1,84) wurden inkubiert, davon zeigten 3 erniedrigte Kpw-Werte, einer blieb gleich und 13 stiegen an.

	Kontrolle		Patient	
	Mittelwert	Standard- abweichung	Mittelwert	Standard- abweichung
<b>PRP</b> Kpw [%]	<b>0,54</b>	0,19	<b>1,20</b>	0,37
<b>HNB</b> Kpw [%]	<b>0,60</b>	0,30	<b>1,62</b>	0,69
<b>HIR</b> Kpw [%]	<b>0,67</b>	0,50	<b>1,21</b>	0,70
<b>ORG</b> Kpw [%]	<b>0,57</b>	0,29	<b>1,11</b>	0,52
<b>MBX</b> Kpw [%]	<b>0,45</b>	0,29	<b>1,52</b>	0,70
<b>CLX</b> Kpw [%]	<b>0,49</b>	0,23	<b>1,45</b>	0,64
<b>FRX</b> Kpw [%]	<b>0,66</b>	0,39	<b>1,55</b>	0,56

**Tabelle 7:** Mittelwerte und Standardabweichungen von PRP und nach Inkubation mit Wirkstoffen

In **Abbildung 13** sind nochmals die Mittelwerte nach Inkubation aus Tabelle 7 graphisch mit den dazugehörigen 95%-Konfidenzintervallen dargestellt.



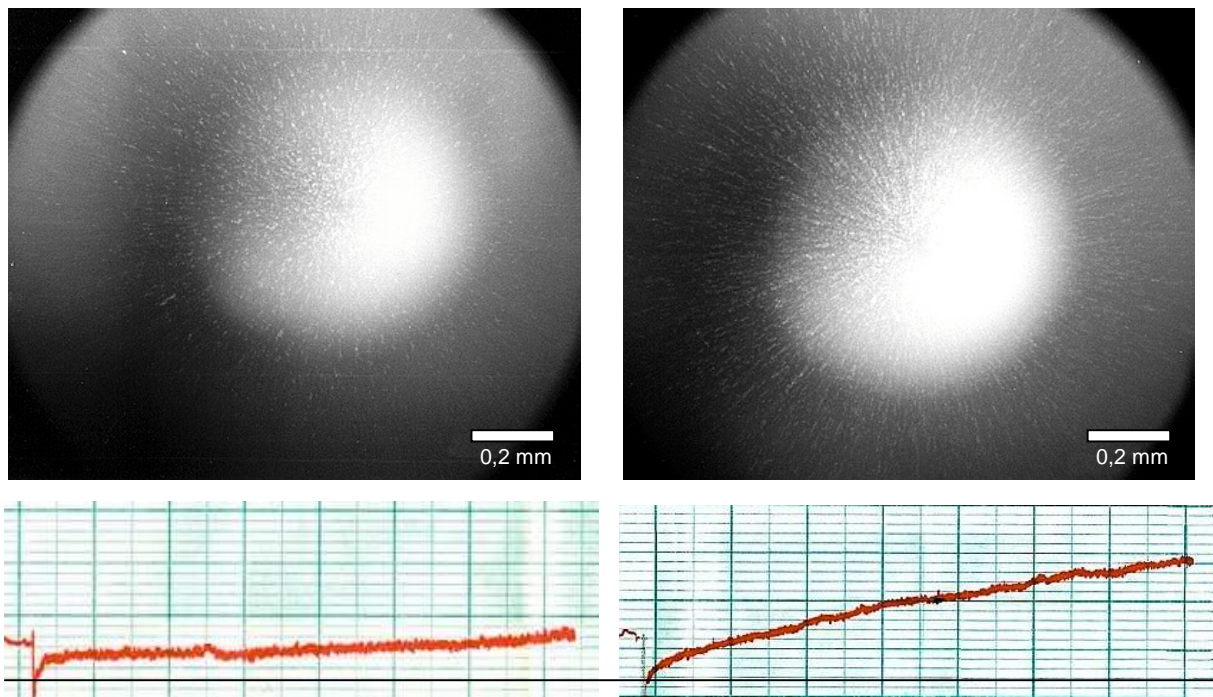
**Abbildung 13:** Absolute Mittelwerte mit 95 % CI der Inkubationsversuche bei Patienten und Kontrollen



#### 4.2.2. Mikrophotos und Kurvenverläufe bei Inkubationsversuchen

In der folgenden Bilderserie soll anhand zweier kompletter Versuchsabläufe von gesundem Probanden und pAVK Patientenen die Veränderungen, die anhand der Kpw-Werte nach Inkubation der plättchenreichen Plasmen gemessen werden konnten, auch anhand von Photos, die zu jedem Versuch gemacht wurden und der Lichtintensitätskurven nachvollzogen werden. Die Photos wurden jeweils 6 min nach Beginn des Strömungsexperiments gemacht. Jeder Versuch dauerte mindestens 7 min.

Die Bilder 1a und b zeigen, wie schon unter 4.1.3. beschrieben, die Ausgangssituation anhand eines Strömungsexperiments mit PRP ohne Zusatz von Substanzen.

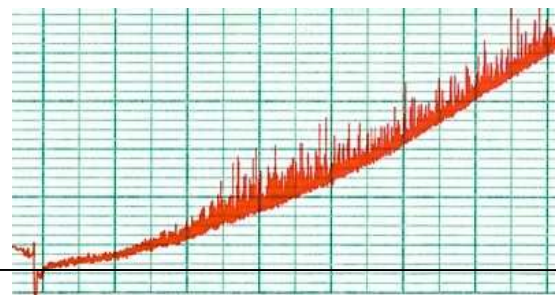
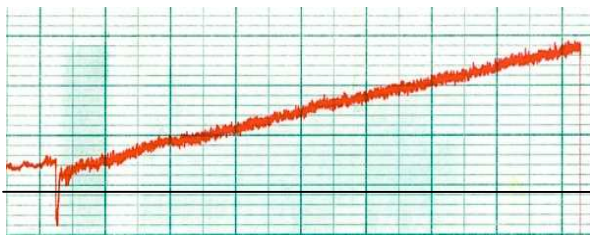
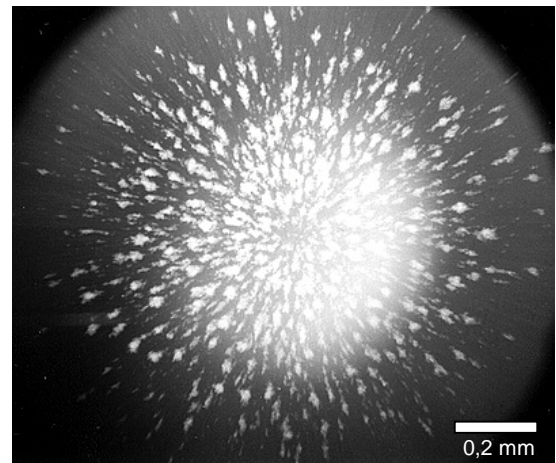
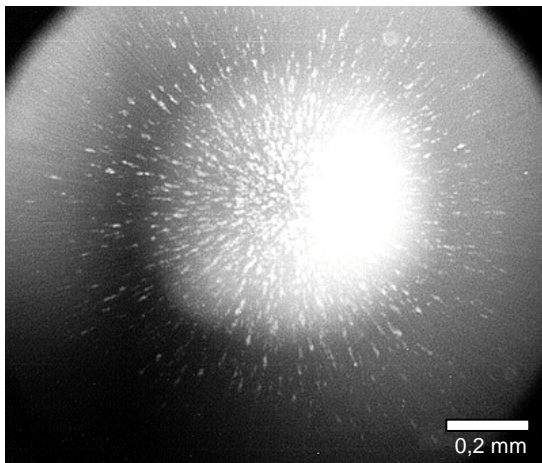


**Bild 1a:** PRP gesunde Kontrollperson

**Bild 1b:** PRP Patient

Die folgenden Bilder 2a und b bestätigen die Untersuchungsergebnisse hinsichtlich eines besonders auffälligen Anstieges der Adhäsions- und Aggregationswerte bei Kontrollen und Patienten nach Zugabe von unfraktioniertem Heparin. Zu beachten ist die in Bild 2a sichtbare Aggregation bei gesundem Kontrollplasma.

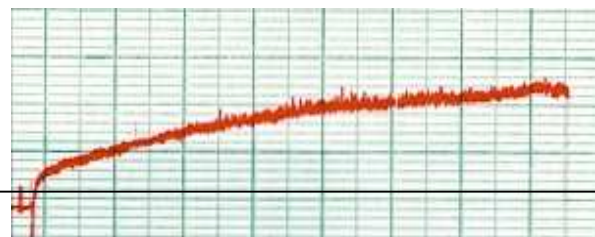
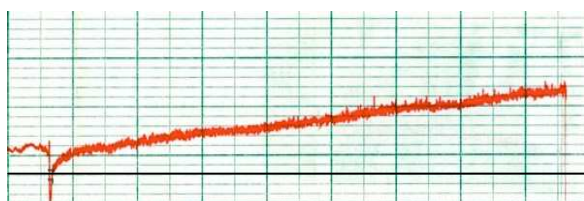
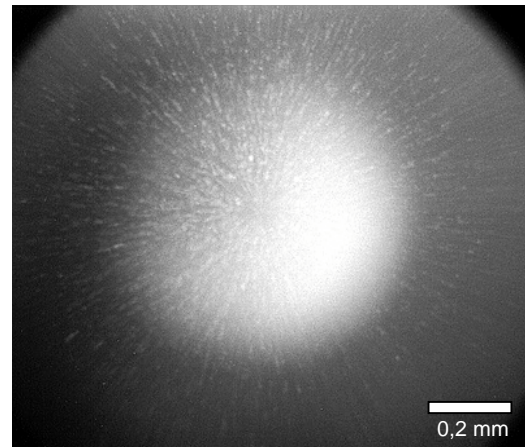
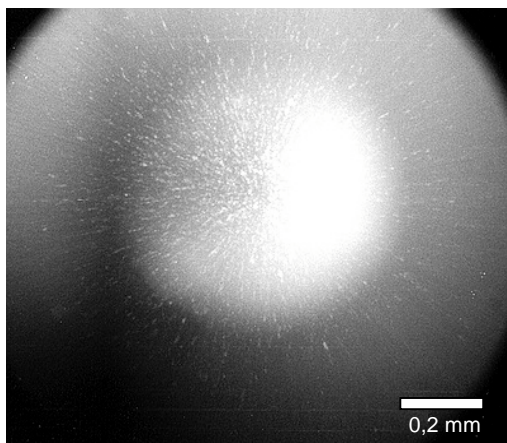




**Bild 2a:** HNB gesunde Kontrollperson

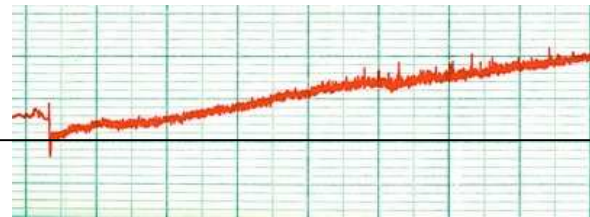
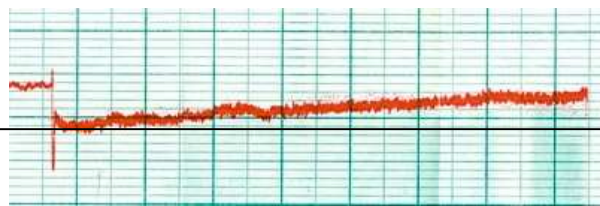
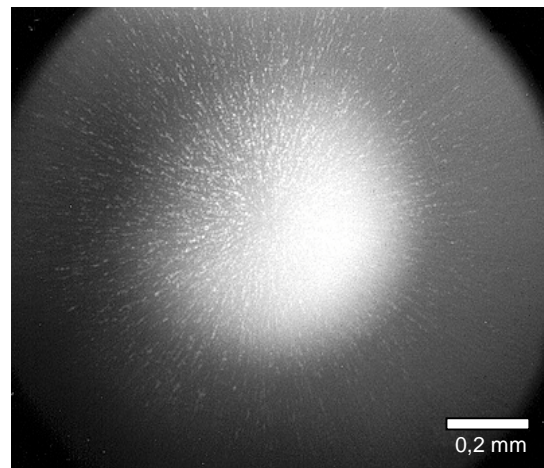
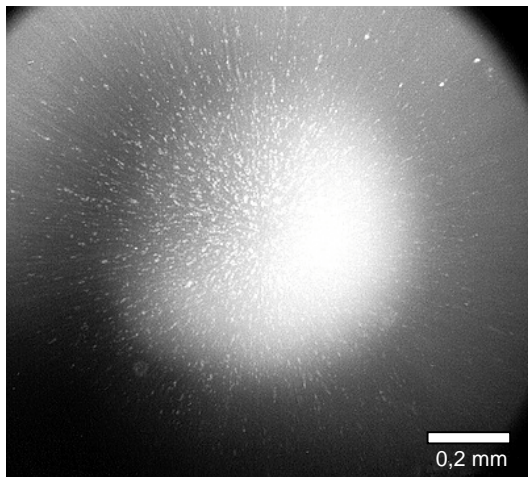
**Bild 2b:** HNB Patient

Die Bilder 3a, 3b, 4a und 4b zeigen Photos nach Inkubation der Plasmen mit Organan und Hirudin, jeweils Substanzen, die frei von Heparinfragmenten sind. Ein Rückgang von Adhäsion und Aggregation ist deutlich sichtbar.



**Bild 3a:** HIR gesunde Kontrollperson

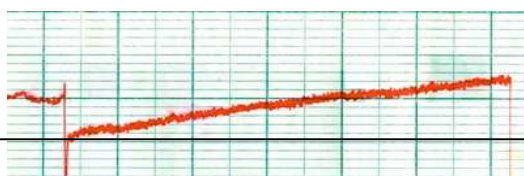
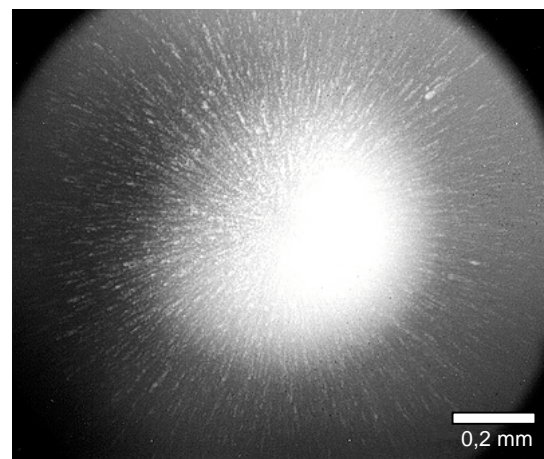
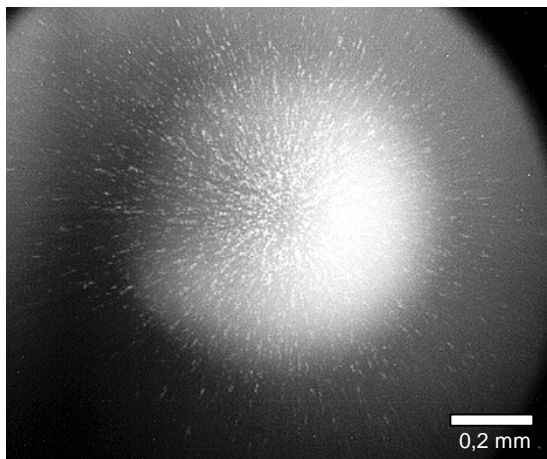
**Bild 3b:** HIR Patient



**Bild 4a:** ORG gesunde Kontrollperson

**Bild 4b:** ORG Patient

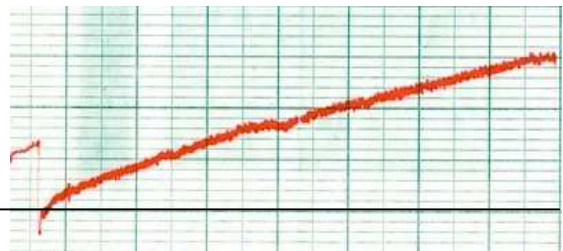
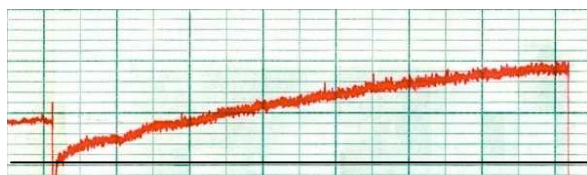
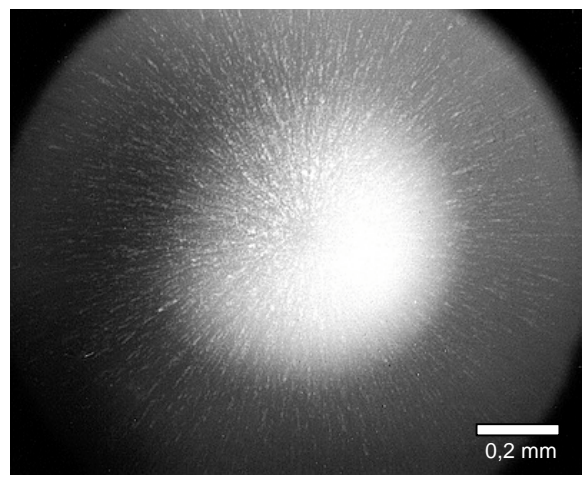
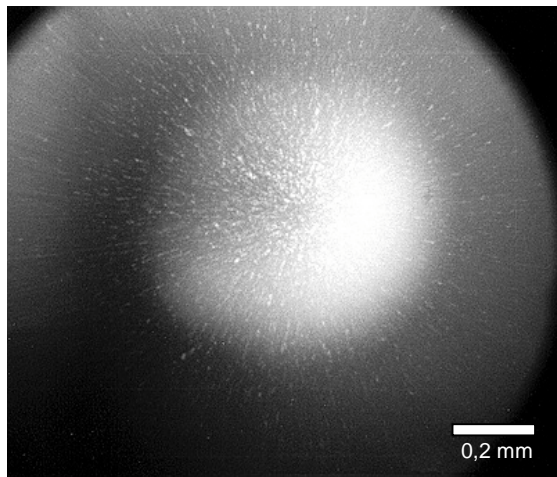
Die folgenden drei Bildsequenzen (5, 6, 7) zeigen, wie sich PRP nach Inkubation mit einem niedermolekularen Heparin verhält. Die Kurven veranschaulichen die unterschiedliche Reaktion bei Kontrollpersonen und Patienten besonders deutlich.



**Bild 5a:** MBX gesunde Kontrollperson

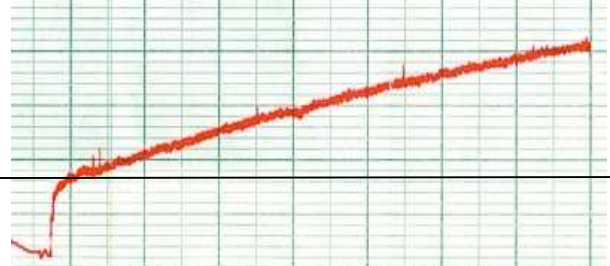
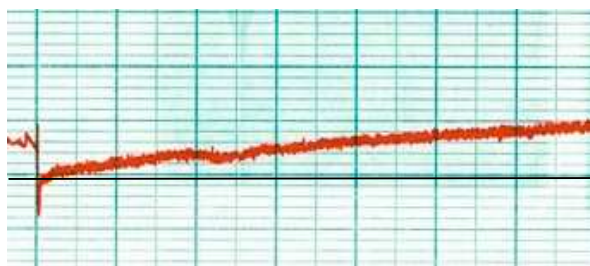
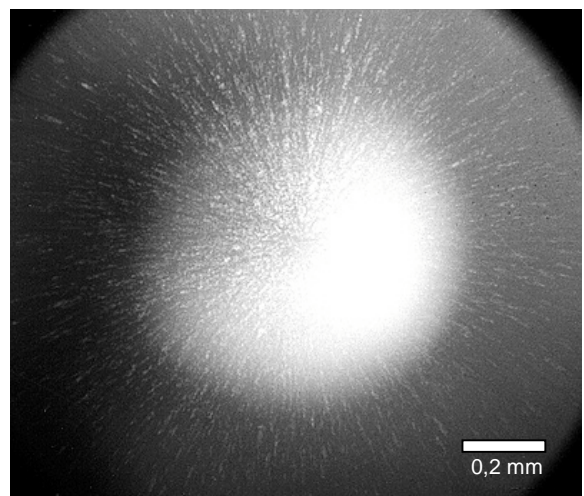
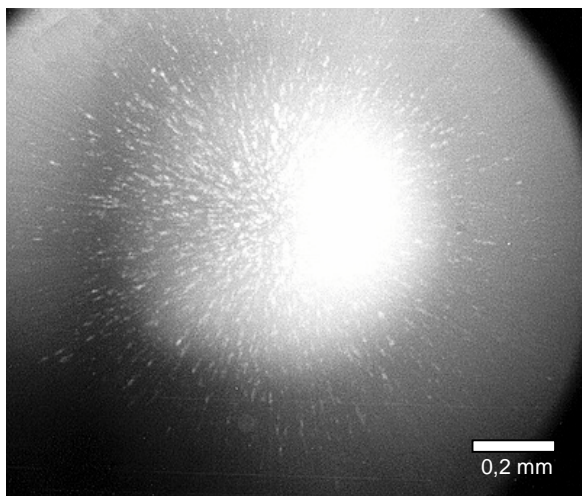
**Bild 5b:** MBX Patient





**Bild 6a:** CLX gesunde Kontrollperson

**Bild 6b:** CLX Patient



**Bild 7a:** FRX gesunde Kontrollperson

**Bild 7b:** FRX Patient

### 4.2.3. Darstellung der Kpw-Differenzen zum PRP-Ausgangswert

Um die Auswirkung der zugesetzten Medikamente besser beurteilen zu können, wurden die Differenzen mit den jeweiligen prozentualen Abweichungen zum Kpw-Ausgangswert des plättchenreichen Plasmas gebildet. Dabei wurden nicht einfach die Mittelwerte subtrahiert, sondern zuerst die Differenzen bei jedem einzelnen Versuch gebildet und dann das Ergebnis gemittelt.

Wie aus Abbildung 13 ersichtlich, zeigte sich für HNB, MBX, CLX, und FRX bei den Kontrollen ein geringerer Anstieg der Kpw-Werte, bzw. sogar Abfälle, Im Gegensatz zu eindeutig erhöhten Adhäsionswerten bei den Patienten.

Genauer betrachtet zeigte sich bei den Differenzen nach Inkubation zu PRP bei keiner Kontrolle ein signifikanter Unterschied:

Bei **HNB** errechnet sich ein Delta von 0,06 (13%) (SD 0,18, CI: -0,01; 0,13;  $p > 0,05$ ) und bei **HIR** ein Delta von 0,03 (5%), (SD 0,38; CI: -0,21; 0,27;  $p > 0,05$ ). Nach dem Zusatz von **ORG** (SD 0,2; CI: -0,1; 0,1;  $p > 0,05$ ) und **FRX** (SD 0,26; CI: -0,16; 0,16;  $p > 0,05$ ) zeigte sich kein Unterschied nach Mittelung der Werte. Die Zugabe von **MBX** führte zu einem Abfall von -0,07 (12%), (SD 0,2; CI: -0,19; 0,04;  $p > 0,05$ ). Bei **CLX** ergab sich ebenfalls eine Senkung des Kpw-Wertes um -0,03 (5%), (SD 0,21; CI: -0,12; 0,07;  $p > 0,05$ ).

Beim Kollektiv der Patienten ergaben sich signifikante Änderungen für:

**HNB** 0,42 (35%) (SD 0,52; CI: 0,24; 0,60;  $p < 0,0001$ ), **MBX** 0,28 (22%), (SD 0,5; CI: 0,02; 0,54;  $p = 0,04$ ) und **FRX** 0,28 (22%), (SD 0,36; CI: 0,09; 0,46;  $p < 0,006$ ).

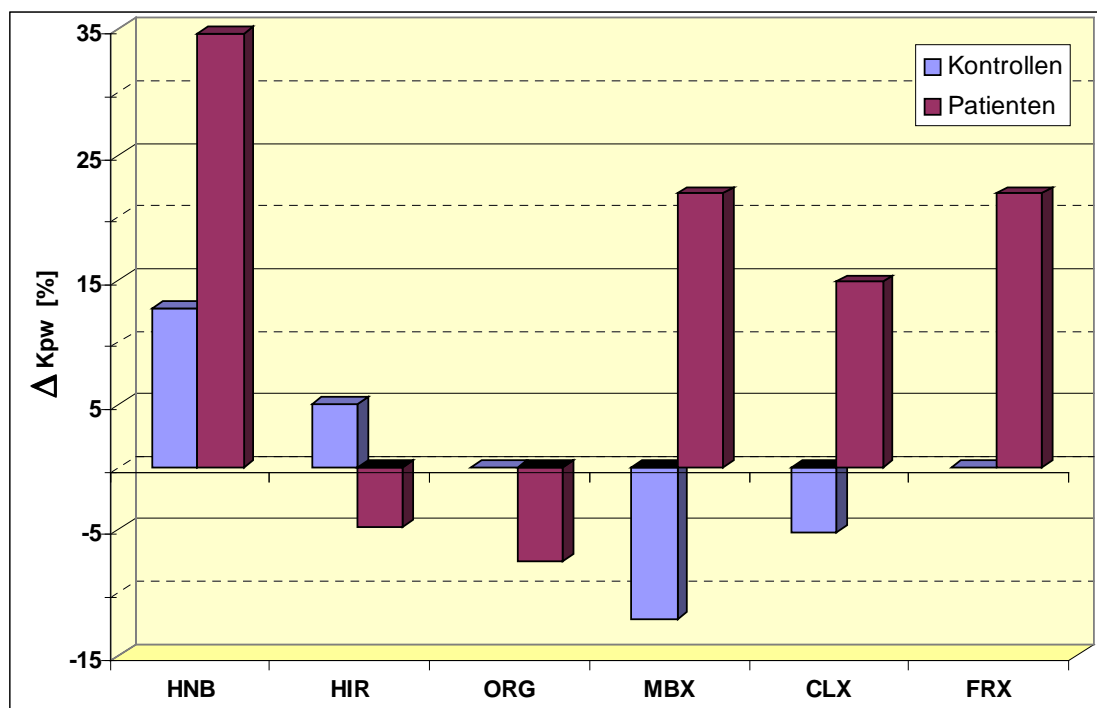
Nicht signifikant war der Unterschied von **HIR** -0,06 (-5%), (SD 0,67; CI: -0,40; 0,29;  $p > 0,05$ ), **ORG** -0,09 (-7%) (SD 0,47; CI: -0,29; 0,1;  $p > 0,05$ ) und **CLX** 0,19 (22%), (SD 0,48, CI: -0,01; 0,38;  $p > 0,05$ ).

Beim Vergleich der beiden Kollektive untereinander unterschieden sich die Differenzen der einzelnen Medikamente zu PRP bei Patienten und Kontrollen signifikant bei **HNB**, **MBX** und **FRX** (jeweils  $p < 0,05$ ).

	Kontrollen			Patienten		
	Differenz zu PRP	95% CI	Differenz in %	Differenz zu PRP	95% CI	Differenz in %
<b>HNB</b>	<b>0,06</b>	-0,01; 0,13	+13	<b>0,42</b>	0,24; 0,60	+35
<b>HIR</b>	<b>0,03</b>	-0,21; 0,27	+5	<b>-0,06</b>	-0,49; 0,29	-5
<b>ORG</b>	<b>0</b>	-0,1; 0,1	0	<b>-0,09</b>	-0,29; 0,1	-7
<b>MBX</b>	<b>-0,07</b>	-0,19; 0,04	- 12	<b>0,28</b>	0,02, 0,54	+22
<b>CLX</b>	<b>-0,03</b>	-0,12; 0,07	- 5	<b>0,19</b>	-0,01; 0,38	+15
<b>FRX</b>	<b>0</b>	-0,16; 0,16	0	<b>0,28</b>	0,09, 0,46	+22

**Tabelle 8:** Veränderung des Kpw-Wertes nach Inkubation bezogen auf den PRP-Ausgangswert

In nachfolgender Abbildung 14 ist die prozentuale Abweichung des Kpw-Wertes nach Inkubation mit den einzelnen Substanzen graphisch dargestellt. Kontrollen und Patienten sind gemeinsam aufgeführt, um die unterschiedliche Reaktion zu verdeutlichen.



**Abbildung 14:** Differenzen zum Kpw-Ausgangswert in Prozent

#### 4.2.4. Ergebnisse für die Aggregation nach Inkubation des PRP

Zunächst wurde das Ergebnis daraufhin getestet, ob sich nach Zugabe einer Substanz die Anzahl der nun aufgetretenen Aggregationen signifikant zum Ausgangswert, also der Anzahl der spontanen Aggregationen bei PRP unterscheiden.

Für die Kontrollen ergab sich, daß nach Zugabe von **HNB** nun 7 (26%) der Plasmen eine Aggregation zeigten ( $p=0,008$ ). Bei den Versuchen mit **HIR** und **ORG** trat weiterhin keine Aggregation auf. Für **MBX** zeigte sich eine Anzahl von 3 (21%) Thrombozytenaggregationen ( $p>0,05$ ). 2 Kontrollen (14%) der mit **CLX** getesteten Plasmen aggregierten ( $p>0,05$ ). Bei **FRX** waren es 4 Plasmen (31%) ( $p=0,05$ ).

⇒ Somit hat sich bei den Kontrollen nur für HNB eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl an Aggregationen im Vergleich zu PRP ergeben.

Das plättchenreiche Plasma der Patienten aggregierte unter **HNB** 29 (83%) mal ( $p=0,0001$ ). Mit Zugabe von **HIR** zeigte sich eine Aggregation bei 4 (24%) Patienten ( $p>0,05$ ). **ORG** führte zu 8 (32%) Aggregationen ( $p>0,05$ ), **MBX** zu 16 (94%) ( $p=0,002$ ), **CLX** zu 21 (81%) ( $p=0,0005$ ), und **FRX** zu 4 (76%) ( $p=0,008$ ).

⇒ Somit ergaben sich bei den Patienten für HNB, MBX, CLX und FRX statistisch signifikante Unterschiede zu der spontanen Aggregation bei PRP.

Aggregation						
	Kontrolle			Patient		
	n	Aggregation	%	n	Aggregation	%
<b>PRP</b>	28	0	0	38	14	37
<b>HNB</b>	27	7	26	35	29	83
<b>HIR</b>	12	0	0	17	4	24
<b>ORG</b>	9	0	0	25	8	32
<b>MBX</b>	14	3	21	17	16	94
<b>CLX</b>	14	2	14	26	21	81
<b>FRX</b>	13	4	31	17	13	76

**Tabelle 9:** Anzahl der Aggregation bei PRP und nach Inkubation bei Kontrollen und Patienten

Das festgestellte Ergebnis ist nachfolgend noch einmal in Abbildung 15 graphisch dargestellt, um den Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten hervorzuheben.

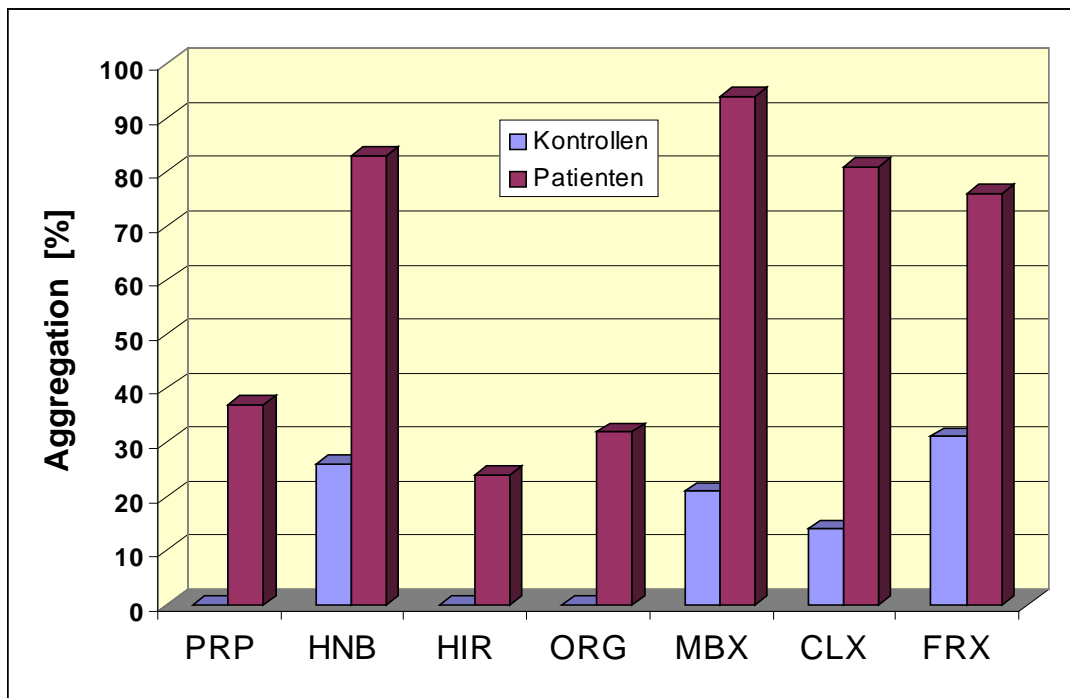


Abbildung 15: Aggregation von Kontrollen und Patienten in Prozent

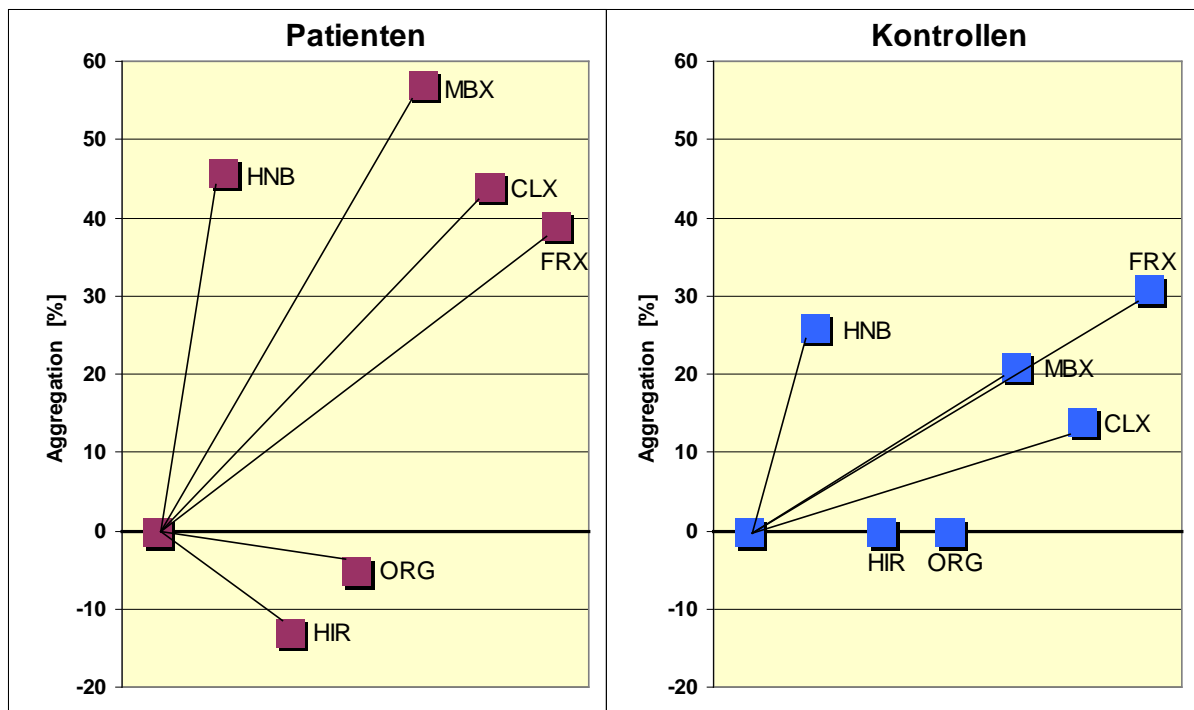


Abbildung 16: Aggregation von Patienten und Kontrollen in Prozent relativ zur PRP-Basis

Beim Vergleich der beiden Kollektive miteinander zeigte sich für jede einzelne zugesetzte Substanz , daß sich die Kollektive unter **HIR** und **ORG** nicht signifikant hinsichtlich der Aggregation unterschieden. HIR und ORG aber einen dämpfenden Effekt auf die Aggregation in der Kontrollgruppe hat. Alle anderen zugesetzten Substanzen führten zu einem statistisch signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) im Vergleich Patient- und Kontrollgruppe.



---

## 5. Diskussion

### 5.1. Betrachtung der Ausgangswerte vor der Zugabe von Substanzen

Bei Patienten mit pAVK ist der atherosklerotische Prozeß disseminiert und der akute arterielle Verschuß die Hauptursache der Morbidität. Mit SPAA konnte eine Thrombozytenhyperreaktivität mit einer Sensitivität von 95 % und einer Spezifität von 93% in einer früheren Arbeit nachgewiesen werden [46]. Für die kardiovaskuläre Okklusion wird teilweise eine In-vivo-Thrombozytenaktivierung verantwortlich gemacht [1, 14]. Diese Annahme wird ebenfalls durch frühere Arbeiten [43,45], als auch durch die vorliegende Untersuchung untermauert. Betrachtet man die Adhäsionsausgangswerte der beiden Kollektive, fällt schon der um mehr als das doppelte statistisch signifikant erhöhte Kpw-Wert für die pAVK-Patienten auf und somit der geringe Bereich, in dem sich Werte überlappen und keine eindeutige Aussage zulassen. (siehe 4.1.1.). Ebenso zeigen im Gegensatz zu den gesunden Kontrollen, bei denen keine spontane Aggregation auftritt, die Patienten bereits im Vorfeld der Inkubationsversuche in 37% der Fälle eine spontane Thrombozytenaggregation (siehe 4.1.2). Betrachtet man die mit PRP beströmten Oberflächen von Patienten und Kontrollpersonen, ist schon an der vermehrten Zeichnung der Stromlinien und der Zunahme der Thrombozytenaggregate ein deutlicher Unterschied der Thrombozytenreaktivität zu erkennen.

Als Ursache für diese beobachteten Phänomene stehen zwei Möglichkeiten im Vordergrund:

- Die pAVK ist mit diffuser Arteriosklerose assoziiert. Dabei liegt eine große Fläche an geschädigter Gefäßwand mit dysfunktionellem Endothel vor, infolgedessen die Thrombozyten zu Adhäsion und Aggregation an der Gefäßwand neigen und auch ihrerseits zur Sekretion von thrombozytenaktivierenden Substanzen wie Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) und ADP in das Plasma angeregt werden [27]. Der TXA<sub>2</sub>-Synthase- und TXA<sub>2</sub>-Rezeptor-Inhibitor Picotamid verringerte vaskuläre Ereignisse bei diabetischen Patienten mit pAVK, womit die wichtige Funktion dieser von Thrombozyten erzeugten Substanz deutlich wird [33].

- Auf den Membranen von adhärennten Thrombozyten findet Thrombingeneration statt, welches zum Teil in das Plasma freigesetzt wird [65]. Dieses kann Thrombozyten in einen höheren Aktivierungszustand versetzen, welches mit der SPAA-Methode anhand einer erhöhten Adhäsion quantifiziert wird. Das durch Thrombin aktivierte Fibrinogen ist ein wichtiger Ligand von Thrombozyten [16, 41]. Daher ist anzunehmen, daß die erhöhte Thrombozytenreaktivität durch dieses Protein vermittelt wird [78]. Bei Patienten mit pAVK ist der Plasmaspiegel von Fibrinogen wahrscheinlich als Folge einer chronisch-entzündlichen Reaktion an den atherosklerotischen Plaques tatsächlich erhöht [18, 46]. Ebenso besteht eine Korrelation zwischen Schweregrad der Erkrankung und Fibrinogenspiegel [31]. Fibrinogen bindet über den GpIIb-IIIa-Rezeptor an Thrombozyten. Reininger et al [47] zeigten, daß bei gesunden Probanden die durch SPAA gemessene Thrombozytenadhäsion bestimmt wird durch die Interaktion von GpIIb-IIIa mit den auf dem Deckgläschen abgelagerten Proteinen. Ein hochspezifischer GpIIb-IIIa-Inhibitor, RO43-8857, hemmte die Adhäsion komplett, so daß Fibrinogen als entscheidender Ligand verifiziert wurde, der auch in signifikanten Mengen auf der Glasoberfläche im SPAA-Modell immobilisiert wird [5]. Bei Versuchen mit Blut eines Patienten mit Afibrinogenämie und einer in diesem Fall vor Substitution des Patienten mit Fibrinogen fehlenden und einer hinterher im Normbereich liegenden Adhäsion wird diese Annahme bestätigt [42]. Ebenso wird ein höherer Fibrinogenumsatz durch Bestimmung der D-Dimere, dem Degradationsprodukt von Fibrin nachgewiesen [17, 31].

## **5.2. Veränderungen der Thrombozytenfunktion nach Inkubation**

### **5.2.1. Auswirkungen bei den Kontrollpersonen**

Bei den untersuchten gesunden Personen war die Interaktion der untersuchten Substanzen mit Thrombozyten und der Folge einer gesteigerten Adhäsion oder Aggregation zwar statistisch nie signifikant, was sich mit dem gut dokumentierten Nutzen einer Thromboseprophylaxe für die Verminderung postoperativer thrombotischer Komplikationen in großen Populationen deckt. Dennoch konnten interessante Tendenzen beobachtet werden, die bei der Wahl des passenden Medikaments vielleicht doch nicht ganz unbeachtet gelassen werden sollten.

Bei Betrachtung der prozentualen Abweichung der **Adhäsion** zum Ausgangswert in Tabelle 7 ist ein leichter Anstieg bei UFH und Hirudin festzustellen, bei Orgaran und LMWH wie FRX zeigt sich keine meßbare Veränderung. MBX und CLX verursachen eine leichte Tendenz hinsichtlich einer Abnahme der Adhäsion. Dies läßt vermuten, daß obwohl UFH die In-vivo-Inaktivierung von Thrombin beschleunigt, es ebenfalls die Thrombozyten gesunder Menschen hinsichtlich ihrer Aktivität beeinflusst[ 18].

Untermauert wird dieser Befund durch den Vergleich häufig auftretender spontaner **Aggregationen** (4.2.4.). Ohne Zusatz von Substanzen kam es wie aus Tabelle 9 ersichtlich, zu keinen spontanen Aggregationen. Mit HNB ergibt sich sogar ein statistisch signifikanter Unterschied nach der Inkubation eines Kontrollplasmas. Es kam bei 7 von 27 Plasmen zu einer meßbaren Aggregation, was ein Anstieg um 26% bedeutet. Bei der Verwendung von LMWH ist auch ein Anstieg der Aggregationen festzustellen, allerdings nicht signifikant. Daß jedoch sowohl bei dem Ausgangsplasma als auch bei Hirudin und Orgaran keine spontanen Aggregationen auftreten sobald Heparine dazukommen aber die Aggregation zunimmt, unterstreicht die Wechselwirkung von Heparinen auf Thrombozyten auch gesunder Menschen.

### 5.2.2. Auswirkungen bei dem Patientenkollektiv

Betrachtet man nun die Gruppe der pAVK-Patienten unter 4.2.3., zeigt sich ein viel deutlicheres Bild. Die **Adhäsionswerte** steigen nach dem Zusatz von Heparin um statistisch signifikante 35% an. Ebenso reagieren pAVK Patientenen noch mit einem statistisch signifikanten Anstieg auf LMWH wie Monoembolex und Fraxiparin. Auch bei Clexane ist diese Neigung zu erkennen, wenn auch nicht signifikant. Ursache dafür könnte der unterschiedliche Sulfatierungsgrad und die Kettenlänge des Oligosaccharids sein. Zumal auch die Heparin-Thrombozyten-Wechselwirkung von dieser Kettenlänge abhängen und nicht von der Primärstruktur [3].

Bei den verwendeten Substanzen Hirudin und Orgaran läßt sich hingegen eine eindeutig positive Tendenz hin zu einer Verringerung der Adhäsionsneigung verzeichnen.

Auch bei Betrachtung der **Aggregation** (siehe 4.2.4.) in der Gruppe der Patienten werden die zuvor gemachten Entdeckungen bestätigt. Es kommt zu einer signifikanten Steigerung der Aggregation sowohl bei UFH als auch bei LMWH. Die Medi-

kamente Orgaran und Hirudin zeigten hingegen einen dämpfenden Effekt. Die Aggregation wurde von 37% bei PRP auf 32% bzw. 24% bei Orgaran und Hirudin gesenkt.

Die vorliegenden In-vitro-Befunde bei pAVK-Patienten bestätigen die Annahme einer bei diesen Patienten vorliegenden thrombozytären Hypersensibilität gegenüber Heparin. Ob dies intrinsische, durch die Erkrankung verursachte Veränderungen der Thrombozyten widerspiegelt, z.B. durch Veränderungen der Zellmembran, oder ob es zu einer Veränderung der Plasmazusammensetzung mit seinen Proteinen und Mediatoren gekommen ist, kann anhand der vorliegenden Untersuchung nicht geklärt werden.

Allerdings könnte die erhöhte Thrombozytenreaktivität bei pAVK-Patienten auf eine verstärkte Bindung funktionell gesunder Thrombozyten an immobilisiertes, strukturell verändertes Fibrinogen beruhen [51], denn immobilisiertes Fibrinogen ist, wie schon weiter oben erwähnt, ein Hauptmediator der mittels SPAA meßbaren Adhäsion [47]. SPAA mißt mit hoher Sensitivität und Spezifität die Thrombozytenadhäsion, die als sehr empfindlicher Parameter gilt, mehr noch als die Konzentration von Plasmafibrinogen, Fibrinmonomer, Thrombin-Antithrombin-Komplex und D-Dimere, wie in zuvor durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden konnte [46,47].

Auch ist zu bedenken, daß Heparin nicht nur die Thrombozytenreaktivität hinsichtlich einer erhöhten Aggregation und Adhäsion von bei pAVK-Patienten beeinflusst, sondern sie auch der erhöhten Gefahr einer HIT aussetzt.

Betrachtet man die Mechanismen und klinischen Folgen der HIT (wie unter 1.6. beschrieben), sollte nicht vergessen werden, daß HIT bei pAVK-Patienten eine wesentlich häufigere Komplikation ist, als in der Literatur beschrieben und, daß diese Personen einem erhöhten Risiko ausgesetzt sind, eine Thrombose zu entwickeln [45].

Auch diese Erkenntnisse unterstreichen die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse hinsichtlich eines erhöhten Ansprechens der Thrombozyten von pAVK Patientenen auf Heparin und werfen die Frage auf, ob nicht ein Thrombinantagonist, der nicht mit Thrombozyten interagiert, bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit einen besseren Thromboseschutz darstellt.

---

## 6. Zusammenfassung

Thrombozyten von Patienten mit disseminierter Arteriosklerose wie bei pAVK zeigen eine erhöhte Reaktivität. In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, daß diese Aktivitätserhöhung postoperativ nach Gefäßeingriffen weiter ansteigt, weshalb es vermehrt zu Komplikationen auf dem kardiovaskulären Gebiet bzw. peripher zu Restenosen kommen kann. In dieser Dissertation soll mittels der SPAA-Methode geprüft werden, wie sich Thrombozyten von Patienten mit pAVK im Vergleich zu gesunden Kontrollen bei Inkubation mit verschiedenen Substanzen zur Thromboseprophylaxe verhalten.

Aufgrund der Eigenschaften von Thrombozyten kann hinsichtlich einer Adhäsion der Thrombozyten an der Gefäßwand, in unserem Fall der Glasoberfläche und einem Haften der Thrombozyten untereinander, was als Aggregation bezeichnet wird, unterschieden werden. Das SPAA-Modell kann diese beiden Ereignisse mit hoher Sensitivität und Spezifität messen.

Es zeigt sich, daß die Adhäsionsausgangswerte der pAVK-Patienten doppelt so hoch sind, wie die der Kontrollgruppe. Ebenso tritt bei diesen im Gegensatz zu den gesunden Kontrollen, bei denen keine spontane Aggregation nachweisbar ist, bereits vor den Inkubationsversuchen in 37% der Fälle eine spontane Thrombozytenaggregation auf. Das bestätigten die Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen, daß Thrombozyten von pAVK Patienten hyperreaktiv sind. Dieses Phänomen ist nicht nur bei den Ausgangswerten mit plättchenreichem Plasma, sondern in besonderem Maße bei Zugabe von Substanzen, die in den Gerinnungsablauf eingreifen.

Dabei fällt auf, wie besonders nach Zugabe von Heparinen bei Patienten eine Steigerung der Adhäsion auftritt. Auf UFH reagieren sogar Kontrollplasmen mit erhöhten Adhäsionswerten. Ein dämpfender Effekt zeigt sich bei Substanzen, die frei von Heparinfragmenten sind. Ebenso führen alle Heparine (UFH, LMWH) zu einer gesteigerten Aggregation sowohl bei Patienten als auch Kontrollen, als Ausdruck einer akuten Aktivierung. Wiederum haben von Heparinfragmenten freie Substanzen auch hier einen dämpfenden Effekt auf die Thrombozytenaggregation. Es stellt sich somit die Frage, ob für pAVK-Patienten nicht Wirkstoffe, die nicht mit Thrombozyten reagieren, von größerem Nutzen sind.

---

## 7. Literaturverzeichnis

1. Badimon L, Badimon JJ, Fuster V (1992). Pathogenesis of thrombosis. In: Fuster V, and Vestraete M, (eds) *Thrombosis in cardiovascular disorders*. Philadelphia, London: WB Saunders Company; 17-40
2. Bertelé V, Mussoni L, del Rosso G, Pintucci G, Carriero MR, Merati MG, Libretti A, de Gaetano G (1988). Defective fibrinolytic response in atherosclerotic patients-effect of iloprost and its possible mechanism of action. *Thromb Haemost*; 60: 141-4
3. Bini A, Fenoglia Jr JJ, Mesa-Tejada R, Kudryk B, Kaplan KL (1989). Identification and distribution of fibrinogen, fibrin and fibrinogen degradation products in atherosclerosis: use of monoclonal antibody. *Arteriosclerosis*; 9: 109-21
4. Bloom AL (1990). Physiology of Blood Coagulation. *Haemostasis*; 20: 14-29
5. Böger CA (2000). Ursachen für die erhöhte Thrombozytenreaktivität bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit. Dissertationsschrift an der LMU München
6. Breddin HK (1997). Heparinoids. *Hämostaseologie*; 17: 49-53
7. Charo IF, Kieffer N, Phillips DR (1994). Platelet membrane glycoproteins. In: *Haemostasis and Thrombosis*; 3<sup>rd</sup> Edition; pp 489-507. J.B. Lippincott. Eds: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW.
8. Coller BS (1980). Interaction of normal, thrombasthenic and Bernard-Soulier platelets with immobilized fibrinogen: defective platelet-fibrinogen interaction in thrombasthenia. *Blood*; 55: 169-78
9. Coller BS (1990). Platelets and thrombolytic therapy. *N Engl J Med*; 322: 33-42
10. Cortellaro M, Cofrancesco E, Boschetti C, Mussoni L, Donati MB, Catalano M, Gabrielli L, Lomabardi B, Specchia G, Tavazzi L, Tremoli E, Turri M (1994). Association of increased fibrin turnover and defective fibrinolytic capacity with leg atherosclerosis. *Thromb Haemost*; 72: 292-6
11. D'Amore P (1990). Heparin-endothelial cell interactions. *Haemostasis*; 20: 159-65
12. Deutsche Gesellschaft für Chirurgie (2003). Stationäre und ambulante Thromboembolie-Prophylaxe in der Chirurgie und der perioperativen Medizin; *AWMF-Leitlinien-Register* Nr. 003/001 Entwicklungsstufe: 2+IDA
13. Eckstein EC, Belgacem F (1991). Model of platelet transport in flowing blood with drift and diffusion terms. *Biophys J*; 60: 53-69

14. European Working Group on Critical Leg Ischemia (1992). Second european consensus document on chronic critical leg ischemia. *Circulation*;84, Suppl. IV: 1-22
15. Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (1996). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; 7. Auflage, Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum, Akad. Verlag pp 473-501
16. Fowkes FGR, Connor JM, Smith FB, Wood J, Donnan PT, Lowe GDO (1992). Fibrinogen genotype and risk of peripheral atherosclerosis. *Lancet*; 339: 693-96
17. Fowkes FGR, Lowe GDO, Housley E, Rattray A, Rumley A, Elton RA, MacGregor IR, Dawes J (1993). Cross-linked fibrin degradation products, progression of peripheral arterial disease and risk of coronary heart disease. *Lancet*; 342: 84-6
18. Fowkes FGR (1995). Fibrinogen and peripheral arterial disease. *Eur Heart J*; 16:36-41
19. Graf J. Staupunkt-Adhäsio-Aggregometrie: Präanalytische Standardisierung. Dissertationsschrift an der LMU München. (in Vorbereitung)
20. Greinacher A, Michels I, Liebenhoff U, Presek P; Mueller-Eckhardt C (1993). Heparin-associated thrombocytopenia: immune complexes are attached to the platelet membrane by negative charge of highly sulfated oligosaccharides. *Br J Haematol*;84:711-716
21. Greinacher A, Amiral J, Dummel V, Vissac A, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C (1994). Laboratory diagnosis of heparin-associated thrombocytopenia and comparison of platelet aggregation test, heparin-induced platelet activation test, and platelet factor 4/heparin enzyme-linked immunosorbent assay. *Transfusion*; 34: 381-385
22. Greinacher A, Pötzsch B, Amiral J, Dummel V, Eichner A, Mueller-Eckhardt C (1994). Heparin-associated thrombocytopenia; isolation of the antibody and characterization of a multimolecular PF4-Heparin complex as major antigen. *Thromb haemost*; 71:79-87
23. Greinacher A (1997). Neue antithrombotische Medikamente. *Internist*; 38:680-87
24. Greinacher A (1998). Pathophysiologie und Therapie der Heparin-induzierten Thrombozytopenie: Warum sind Antikoagulantien mit Antithrombin-Aktivität sinnvoll bei HIT? *Journal für Anästhesie und Intensivbehandlung*; 4: 15-21
25. Haas S, Haas P (1992). Thromboembolieprophylaxe in der Unfallchirurgie und Orthopädie. *Chirurg*; 63: 271-75
26. Haas S (1998). Gegenwärtiger Stand der Diagnose und Therapie der Heparin-induzierten Thrombozytopenie. *Journal für Anästhesie und Intensivbehandlung*; 4: 3-4

27. Haycraft JB (1884) Über die Einwirkung eines Sekretes des officinellen Blutegels auf die Gerinnbarkeit des Bluts. *Naunyn Schmiedeberg arch exp Pathol Pharmacol*; 18: 209-17
28. Holmsen H (1994). Platelet secretion and energy metabolism. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, (eds) Hemostasis and thrombosis 3<sup>rd</sup> edition J.B. Lippincott pp 524-544;
29. Horne MK (1989). The effect of secreted heparin- binding to rested and activated platelets. *Blood*; 74: 238-243
30. Kakkar VV (1985). Efficacy and safety of low-molecular-weight heparin in preventing postoperative venous thrombo-embolism : a co-operative study. *Br. J. Surg*; 72: 786-91
31. Lassila R, Peltonen S, Lepäntalo M, Saarinen O, Kauhanen P, Manninen V (1993). Severity of peripheral atherosclerosis is associated with fibrinogen and degradation of cross-linked fibrin. *Arterioscler Thromb*; 13: 1738-42
32. Marguerie GA, Plow EF, Eddington TS (1979). Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. *J Biol Chem*; 254: 5357-63.
33. Milani M, Longoni A, Maderna M (1996). Effects of picotamide, an antiplatelet agent, on cardiovascular events in 438 claudicant patients with diabetes: a retrospective analysis of the ADEP study. *Br J Clin Pharmacol*; 42: 782-5
34. Miller GJ (1994). Lipoproteins and the haemostatic system in atherothrombotic disorders. *Bailliere`s Clin Haematol*; 7: 713-32
35. Müller-Mohnssen H, Scholtes L (1982). Auslösung der Thrombogenese durch strömungs-mechanischen Materialtransport gegen die Gefäßwand. *Hämosteologie*; 4: 3-42
36. Orgaran (1998). Produktmonographie Thiemann Arzneimittel GmbH. *Danaparoid-Natrium wissenschaftliche Information*. pp 5-58
37. Perkkiö J, Wurzinger LJ, Schmid-Schoenbein H (1987). Plasma and platelet skimming at T-junctions. *Thromb Res*; 45: 517-26
38. Perkkiö J, Wurzinger LJ, Schmid-Schoenbein H (1988). Fahraeus-Vejlens effect: Margination of platelets and leukocytes in blood flow through branches. *Thromb Res*; 50: 357-64
39. Preissner KT (1990). Physiological role of vessel wall related antithrombotic mechanisms: Contribution of endogenous and exogenous Heparin-like components to the anticoagulant potential of the endothelium. *Haemostasis*; 20: 30-49
40. Prentice CRM (1990). Pathogenesis of Thrombosis. *Haemostasis*; 20: 50-59



41. Rabhi-Sabile R, Pidard D (1995). Exposure of human platelets to plasmin results in the expression of irreversible active fibrinogen receptors. *Thromb Haemost*; 73: 693-701
42. Reininger AJ, Reininger CB, Spannagl m, Mellinshoff A, Porr A, Heinzmann U, Wurzinger LJ (1995). Effect of fibrinogen substitution in afibrinogenemia on hemorheology and platelet function. *Throm Haemost*; 74:853-8
43. Reininger CB, Reininger AJ, Hörmann A, Steckmeier B, Schweiberer L (1992) Quantitative analysis of platelet function using stagnation point flow aggregometry- first clinical results. *Int Ang*; 11: 247-55
44. Reininger CB, Reininger AJ, Spannagl M, Steckmeier B, Schweiberer L, Schramm W (1994). Platelet Hyperreactivity – Measured via the Stagnation Point Flow Adhesio-Aggregometer – as an indicator of peripheral vascular disease (PAD). 38. Annual Meeting of the GTH (Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung), Munich, 16-19.Feb. *Ann Hematol*; 68:37
45. Reininger CB, Reininger AJ, Steckmeier B, Greinacher A, Lasser R, Schweiberer L (1994). Platelet response to vascular surgery: A preliminary study on the effects of aspirin and heparin. *Thromb Res*; 76: 79-87
46. Reininger CB, Graf J, Reininger AJ, Spannagl M, Steckmeier B, Schweiberer L (1996). Increased platelet and coagulatory activity indicate ongoing thrombogenesis in peripheral arterial disease. *Thromb Res*; 82: 523-32
47. Reininger CB, Reininger AJ, Graf J, Eibl-Eibesfeld B, Steckmeier B (1996). Real-time analysis of platelet adhesion under stagnation point flow conditions: The effect of red blood cells and glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade. *J Vasc Res*; 2: 1-11.
48. Reininger CB, Greinacher A, Lasser R, Steckmeier B, Schweiberer L (1998). Wirkung von Heparin auf Thrombozyten bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit *Journal für Anästhesie und Intensivbehandlung*; 4: 8-14
49. Reininger CB, Lasser R, Rumitz M, Böger C, Schweiberer L. (1999) Computational analysis of platelet adhesion and aggregation under stagnation point flow conditions. *Comp Biol Med*; 29: 1-18
50. Reininger CB (1999) Staupunkt Adhäsio-Aggregometrie: Methodik und klinische Anwendung; Habilitationsschrift an der LMU München
51. Reininger CB (1999) : Staupunkt Adhäsio-Aggregometrie: Methodik und klinische Anwendung; Anhang III: Die Dunkelfeldmikroskopie; Habilitationsschrift an der LMU München
52. REVASC Produktmonographie (1998) Rhone-poulenc Rorer Deutschland GmbH und Novartis Pharma GmbH
53. Riede UN, Schäfer HE (1995). *Allgemeine und spezielle Pathologie*; 4.Auflage, Thieme Verlag Stuttgart pp 418-29

54. Riess H (1997) Sekundäre Prophylaxe mit Heparinen und oralen Antikoagulantien bei der Venenthrombose. *Thromboembolieprophylaxe in der Inneren und operativen Medizin*. (Hrsg. Hach-Wunderle V, Haas S) Springer-Verlag Berlin, Heidelberg pp 87-92
55. Rieß R (1989) Experimentelle Untersuchungen zur D-Dimer Konzentration, Thrombozyten-Adhäsion und –Aggregation bei erhöhtem Thrombembolie-Risiko sowie bei manifester Venenthrombose. Dissertationsschrift an der TU München
56. Ross R (1986). The pathogenesis of atherosclerosis – an update. *N Eng J Med*; 314: 488-500
57. Ross R (1999). Mechanisms of disease: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med*; 340 (2): 115-26
58. Ruggeri ZM (1994). New insights into the mechanism of platelet adhesion and aggregation. *Semin Hematol*; 31:229-39
59. Savage B, Ruggeri ZM (1991). Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb-IIIa on non-activated platelets. *J Biol Chem*; 266: 11227-33
60. Savage B, Shattil SJ, Ruggeri ZM (1992). Modulation of platelet function through adhesion receptors: A dual role for Glycoprotein IIb-IIIa mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J Biol Chem*; 267: 11300-06
61. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM (1996). Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand Factor. *Cell*; 84: 289-97
62. Schafer AI (1996). Antiplatelet therapy. *Am J Med*; 101: 199-209
63. Schmidt, Thews (1995). *Physiologie des Menschen*; 26. Auflage Springer-Verlag Berlin, Heidelberg; p 426-33
64. Siewert R. et al.(1998). *Chirurgie*; 6.Auflage Springer-Verlag Berlin, Heidelberg; pp417-46
65. Sixma JJ, deGroot PG (1996). Regulation of platelet adhesion of the vessel wall. *Ann NY Acad Sci*; 714:190-99
66. Smith EB, Keen GA, Grant A, Stirk C (1990). Fate of fibrinogen in human arterial intima. *Arteriosclerosis*; 10: 263-75
67. Stary HC (1989). Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis*; 9: 119-132
68. Stryer L (1991). *Biochemie*; Heidelberg; Berlin; New York: Spektrum, Akad. Verlag pp259-69
69. Study Group, European Atherosclerosis Society (1988). The recognition and management of hyperlipidemia in adults: A policy statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*; 9:571

70. Tardy-Poncet B (1999). Efficacy and safety of danaparoid sodium (ORG 10172) in critically ill patients with heparin-associated thrombocytopenia. *Chest*; 115: 1616-20
71. Tippe A, Reininger AJ, Reininger CB, Reiß R (1992). A method for quantitative determination of flow induced human platelet adhesion and aggregation. *Thromb Res*; 67: 407-18
72. Verstraete M (1990). Heparin and Thrombosis: A Seventy Year Long Story. *Haemostasis*; 20: 4-11
73. Warkentin TE (1999). Heparin-induced thrombocytopenia: a ten-year retrospective. *Annu Rev Med*; 50: 129-47
74. Wilson JM, Ferguson JJ 3<sup>rd</sup> (1999). Platelet-endothelial interactions in atherothrombotic disease: therapeutic implications. *Clin Cardiol*; 22: 687-98
75. Wurzingler LJ, Blasberg P, Van de Loecht M, Suwelack W, Schid-Schoenbein H (1984). Model experiments on platelet adhesion in stagnation point flow. *Biorheology*; 21:649-59

---

## Danksagung

Mein Dank gilt PD Dr. med. Cornelia B. Reininger für ihre kompetente und hilfsbereite Unterstützung bei dieser Arbeit. Sie hat mir die Techniken des wissenschaftlichen Arbeitens beigebracht und mein Interesse an der Thrombozytenforschung geweckt.

Von Herzen möchte ich mich bei meinem Mann Thomas bedanken, der mich auch ohne Dokortitel geheiratet hat und alles für mich getan hat, daß diese Arbeit zu einem glücklichen Ende kommt; sowie bei meiner lieben Tochter Johanna, die zuerst in meinem Bauch und später auf meinem Schoß sitzend, beim Schreiben für die nötige Abwechslung gesorgt hat.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen Eltern danken, die mir ein glückliches und sorgloses Leben geschenkt haben, ohne welches diese Ausbildung nicht möglich gewesen wäre.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freunden und Kommilitonen, die sich äußerst hilfsbereit gezeigt haben und sich als Probanden zur Verfügung gestellt haben; vor allem bei Dirk und Volker, ohne die beiden der Keller noch dunkler gewesen wäre. Ich freue mich schon, wenn wir - obwohl ein wenig später als geplant - auf den Abschluß unserer Arbeiten anstoßen können!

---

## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name	Christine Zweimüller
Geburtsname	Suchan
Geburtstag	09.11.1974
Geburtsort	München
Eltern	Ewald Suchan, Ingenieur Sigrid Suchan, Fremdsprachenkorrespondentin
Familienstand	verheiratet, 1 Kind
Nationalität	deutsch

### Schulbildung

1981 - 1985	Grundschule Karlsfeld
1985 - 1994	Josef Effner Gymnasium Dachau. Abschluß: Abitur

### Studium

Ab Nov. 1994	Studium der Humanmedizin an der LMU München
Sept. 1996	Ärztliche Vorprüfung
Sept. 1997	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Sept. 1999	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Mai 2001	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### ÄiP

Juli 2001 - Juni 2002	Ärztin im Praktikum in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Charité Berlin
Juli 2002 –Aug. 2004	Zunächst als ÄiP, dann als Assistenzärztin im Ambulanten Operationszentrum München-Nord, Gemeinschaftspraxis für Anästhesiologie

### Approbation

Seit Aug 2004	Erteilung der Approbation am 15.01.03 Mutterschutz und Elternzeit
---------------	--