Mikropartikel als neuer Risikofaktor bei Frauen mit rezidivierenden Spontanaborten

Meike Vanessa Kern

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. Bettina Toth
Mitberichterstatter:	PD Dr. med. Dorit Nägler
	PD Dr. med. Rainer Steldinger
	PD Dr. med. Ursula Peschers
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	20.05.2010

Aus der Klinik und Poliklinik
für Frauenheilkunde und Geburtshilfe – Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Klaus Friese

Mikropartikel als neuer Risikofaktor bei Frauen mit rezidivierenden Spontanaborten

Dissertation

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

vorgelegt von
Meike Vanessa Kern
aus Schwäbisch Hall

2010

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 Ursachen für RSA 1

1.2 RSA und Mikropartikel (MP): ein neuer Risikofaktor? 8

1.3 Mikropartikel 10

1.3.1 Grundlagen 10

1.3.2 Entstehung 12

1.3.3 Aufbau 13

1.3.4 Pathophysiologische Bedeutung 15

1.4 Zielsetzung der Arbeit 20

2 MATERIAL 21

2.1 Durchflusszytometrie 21

2.1.1 Geräte 21

2.1.2 Puffer, Chemikalien 23

2.1.3 Monoklonale Antikörper 24

2.1.4 Firmenliste 25

3 METHODE 26

3.1 Studiendesign 26

3.1.1 Patientenkollektiv 26

3.1.2 Kontrollgruppe 27

3.1.3 Ethikkommission 27

3.1.4 Grundlagenversuche zu MP 28

3.1.4.1 Tageszeitliche Schwankungen der MP 28

3.1.4.2 Lagerung und Stabilität der MP-Proben 28

3.1.5 Probengewinnung und Probenverarbeitung 30

3.1.6 Statistik 30

3.2 Durchflusszytometrie 31

3.2.1 Prinzip der Durchflusszytometrie 31

3.2.2 Pufferlösungen 32

3.2.3 Probenansätze 32

3.2.3.1 Mikropartikel-Isolation 32

3.2.3.2 Antikörpervorbereitung 33

3.2.3.3 Vorbereitung von Annexin V 33
3.2.3.4 Mikropartikel-Proben 33
3.2.4 Geräteeinstellung 34
3.2.5 Auswertung der Messungen 35
3.2.6 Ermittlung der Verdünnungsstufe von Antikörpern und Farbstoffen zur Detektion der MP 38
3.2.6.1 Annexin V 38
3.2.6.2 Anti-CD61-AK (Glycoprotein IIIa, β_3) 39
3.2.6.3 Anti-CD62 (P-Selektin) 40
3.2.6.4 Anti-CD144 (VE-Cadherin) 41
3.2.6.5 Anti-CD62 (E-Selektin) 42
3.2.6.6 Anti-CD51 (Vibronectin-Rezeptor) 43

4 ERGEBNISSE 44

4.1 Charakteristika der Studiengruppe 44

4.2 Annexin V positive (+) Mikropartikel 46

4.3 Thrombozytäre Mikropartikel 48

4.4 Endotheliale Mikropartikel 49

DISKUSSION 50

4.5 Patientenkollektiv 50

4.6 Auswahl der Antikörper 53
4.6.1 Nachweis von Mikropartikeln mittels Annexin V 53
4.6.2 Identifikation thrombozytärer Mikropartikel: Antikörper gegen CD41 und CD61 56
4.6.3 Identifikation aktivierter thrombozytärer Mikropartikel: Anti-CD63 und Anti-CD62P (P-Selektin) 58
4.6.4 Nachweis endothelialer Mikropartikel durch Anti-CD144-Antikörper 60
4.6.5 Identifikation aktivierter endothelialer Mikropartikel: Anti-CD62E-Selektin und Anti-CD51 61

4.7 Expression von zirkulierenden Mikropartikeln bei RSA-Patientinnen 64

5 ZUSAMMENFASSENDE SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK 67

6 LITERATURVERZEICHNIS 68

7 DANKSAGUNG 79

LEBENSLAUF 80

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACL-AK	Anti-Cardiolipin-Antikörper
Ag	Antigen
AK	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
APC	Aktiviertes Protein C
APLS	Anti-Phospholipid-Syndrom
AT-III	Antithrombin III
BD	Becton Dickinson
Ca	Calcium
CRP	C-reaktives Protein
DIC	Disseminierte Intravasale Gerinnung
EC	Endothelzellen
F	Faktor
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
FII	Prothrombin G20210A
FITC	Fluoreszein-Isocyanat
FL	Fluoreszenz
FSC	Forward-Scatter
FVL	Faktor V Leiden
g	Gramm
HELLP	Haemolysis, Elevated Liver Enzyme Levels, Low Platelets
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IL	Interleukin
IQ	Immuno Quality
IUFT	Intrauteriner Fruchttod
IUGR	Intrauterine Wachstumsretardierung
kg	Kilogramm
l	Liter
LA	Lupus Antikoagulanz
mg	Milligramm
min	Minute
MP	Mikropartikel

MTHFR	5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NK-Cell	Natural Killer-Cell
PAF	Platelet Activating Factor
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PBS	Phosphat Buffered Saline
PC	Phospatidylcholin
PCOS	Polyzystisches Ovarsyndrom
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PMP	Plättchen-Mikropartikel
PPP	Plättchenarmes Plasma
Prot.	Protein
PS	Phosphatidylserin
ROCK I	Rho-assoziierte Kinase
RSA	Rezidivierende Spontanaborte
SD	Standardabweichung
SS	Schwangerschaft
SSC	Side-Scatter
SSW	Schwangerschaftswoche
TF	Tissue Factor
TGT	Thrombin-Generation-Test
TM	Thrombomodulin
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor αlpha
UR-Region	Upper Right-Region
vWF	von Willebrand Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
+	positiv

1 Einleitung

Etwa 12-15% aller klinisch erkannten Schwangerschaften enden als Spontanabort (86). Meist handelt es sich um sporadische Fehlgeburten ohne erhöhtes Wiederholungsrisiko. Bei etwa 1-2% aller Paare rezidivieren die Spontanaborte (RSA) (18). Nach WHO-Definition handelt es sich bei RSA um drei oder mehr konsekutive Fehlgeburten vor der 20. Schwangerschaftswoche (SSW). Mehrere Autoren favorisieren eine neue Definition und teilen Frauen mit 2 und mehr Aborten nach dem 30. Lebensjahr ebenfalls in die Gruppe der wiederholten Spontanaborte ein (3). Klinisch werden Aborte in primäre (keine ausgetragene Schwangerschaft) und sekundäre Aborte (mindestens eine erfolgreiche Schwangerschaft) unterteilt. Das Risiko für einen erneuten Spontanabort bei RSA-Patientinnen in einer folgenden Schwangerschaft beträgt nahezu 50%, ebenso ist das Risiko für intrauterine Wachstumsretardierungen (IUGR), Präeklampsie, Frühgeburtlichkeit und neonatale Mortaliät in der darauf folgenden Schwangerschaft signifikant erhöht (89).

1.1 Ursachen für RSA

Die Studienlage bezüglich der mit RSA in Zusammenhang stehenden Faktoren stellt sich derzeit noch uneinheitlich dar. In den vergangenen Jahren konnten viele neue Risikofaktoren identifiziert werden, für die in Fall-Kontroll-Studien eine Assoziation mit RSA nachgewiesen werden konnte. Ein eindeutig kausaler Zusammenhang mit RSA konnte allerdings nur für wenige dieser Risikofaktoren gezeigt werden. Eine Bewertung verschiedener Faktoren hinsichtlich Assoziation mit bzw. Ursächlichkeit für RSA zeigt Abb. 1.

Potential etiologic factors in the causation of recurrent pregnancy loss.

Factor	Association with RPL	Causation of RPL
Parental genetics	Definite	Definite
Uterine abormalities	Definite	Probable
Uncontrolled thyroid disease	Probable	Probable
Uncontrolled diabetes	Probable	Probable
Polycystic ovary syndrome	Definite	Probable
Antithyroid antibodies	Doubtful	Doubtful
Antiphospholipid antibodies	Definite	Probable
Factor V Leiden mutation	Definite	Probable
Th1 cytokine bias	Probable	Probable
Increased NK cell cytotoxicity	Probable	Probable
Maternal HLA alleles	Probable	Probable
Parental HLA sharing	Doubtful	Doubtful

Note: RPL = recurrent pregnancy loss; Th1 = T helper 1; NK = natural killer; HLA = human leukocyte antigen.

Christiansen. Management of recurrent pregnancy loss. Fertil Steril 2005.

Abb. 1: Ursachen für RSA (28)

Als derzeit in der aktuellen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) (3) anerkannte Ursachen für RSA gelten genetische Veränderungen, anatomische Malformationen, mikrobiologische Faktoren, endokrine und immunologische Faktoren sowohl alloimmunologischer als auch autoimmunologischer Art (Anti-Phospholipid-Syndrom, APLS) sowie Thrombophilien (Mutationen im Faktor V-, Prothrombin- und MTHFR-Gen) (1)(21)(49)(63)(69).

***Chromosomale Ursachen*:**

Bei lediglich 4,7% der Elternpaare mit 2 und mehr Aborten können chromosomale Veränderungen nachgewiesen werden (33). Trotz der vergleichbar geringen Inzidenz chromosomaler Veränderungen bei Paaren mit RSA gelten diese als sicherer Risikofaktor, weshalb bei Paaren mit RSA die genetische Beratung Teil der Routineuntersuchungen sein sollte.

Spontane Fehlgeburten im ersten Trimester sind zu etwa 50% durch sporadische chromosomale Störungen des Embryos bedingt, wobei Aneuploidien (Trisomien, X-Monosomien und Polyploidien) die größte Gruppe der Chromosomenaberrationen darstellen. Die genetischen Störungen häufen sich mit zunehmendem mütterlichem Alter und zeigen eine signifikante Korrelation zu Trisomie 16, 21 und 22 (21)(63). Im Falle von sich wiederholenden Aborten

finden sich gehäuft strukturelle Aberrationen, wobei die balancierte Translokation die häufigste Form darstellt.

Eine vergleichbare hohe Inzidenz von 50-60% für embryonale chromosomale Veränderungen bei RSA konnte in lediglich 2 Studien nachgewiesen werden (100)(78). Die Mehrzahl der bisherigen Studien zeigt ein deutlich geringeres Vorkommen chromosomaler Veränderungen. *Coulam et al.* konnten im Abortgewebe von Frauen mit RSA in nur 6% chromosomale Veränderungen nachweisen (31). Sie beschrieben ebenfalls Unterschiede hinsichtlich der Art der embryonalen chromosomalen Auffälligkeiten bei spontanen und wiederholten Fehlgeburten. So waren bei spontanen Fehlgeburten vorwiegend Trisomien und X-Monosomien nachweisbar, bei RSA vorwiegend Translokationen (31).

Carp et al. konnten in nur 29% chromosomale Veränderungen im embryonalen Gewebe nachweisen (23). *Ogasawara et al*. (78) zeigten, dass die Inzidenz chromosomaler Anomalien mit steigender Zahl vorausgegangener Aborte abnahm. Dies unterstützt Beobachtungen, dass nach einer Fehlgeburt mit unauffälligem Karyotyp der Karyotyp eines folgenden Aborts wieder unauffällig sein wird (120).

***Anatomische Ursachen*:**

Bei bis zu 15-30% der Frauen mit RSA finden sich angeborene uterine Fehlbildungen (122). Das Abortrisiko hängt von der Art der Anomalie ab und liegt beim Uterusseptum bei 26-94%, beim Uterus bicornis bei 28-44% und beim Uterus duplex bei 13-43%. Die häufigste Diagnose ist das Uterusseptum (komplett als Uterus septus oder inkomplett als Uterus subseptus) in bis zu 25% (63).

***Infektionen als Ursache**:*

Die Bedeutung von mikrobiologischen Faktoren als Ursache von RSA wird kontrovers diskutiert. Risikofaktoren in diesem Zusammenhang scheinen der Nachweis von Ureaplasma urealytikum sowie Chlamydia trachomatis zu sein. Die Diagnose einer bakteriellen Vaginose stellt speziell für rezidivierende Spätaborte im II. Trimenon ein wichtiger Risikofaktor dar (69).

Endokrine Ursachen:

Gehäufte endokrinologische Störungen bei Frauen mit RSA sind Hyper- und insbesondere Hypothyreosen sowie das PCOS (Polyzystisches Ovarsyndrom) (1)(49). Offenbar lässt sich durch die Behandlung der Hypothyreose eine Reduktion des Abortrisikos erreichen (1). Allerdings weisen einige Untersuchungen darauf hin, dass im Rahmen einer Schiddrüsenunterfunktion eine Infertilität der Patientinnen eine größere Rolle zu spielen scheint, als das Risiko einer Fehlgeburt (28). Das metabolische Syndrom sowie das PCOS sind mit einer erhöhten Abortrate assoziiert. Unklar ist, welche pathogenetische Rolle der relativen LH-Hypersekretion, der Hyperandrogenämie sowie der Hyperinsulinämie zukommt.

Psychologische Ursachen:

Frauen mit RSA erleben einen enormen emotionalen Stress bei jeder Fehlgeburt (18). Dies wurde indirekt durch Arbeiten von *Stray-Pederson et al.* (103) bestätigt, die durch wöchentliche medizinische und sonographische Untersuchungen (*Tender Loving Care*) in 85% eine erfolgreiche Schwangerschaft erreichen konnte.

Immunologische Ursachen:

Alloimmunologische Faktoren:

Im Rahmen der Schwangerschaft kommt es zu einer aktiven Auseinandersetzung des mütterlichen Immunsystems mit dem sich entwickelnden Feten bzw. den extraembryonalen Membranen. Bei ungestörtem Schwangerschaftsverlauf findet sich ein Gleichgewicht zwischen TH1- und TH2-Immunantwort zu Gunsten der TH2-Immunantwort, was sich in einer vermehrten Sekretion der TH2-Zytokine (z.B. IL-4, -5, -6, -10 und TFG-β) zeigt. Eine Sekretion abortiver TH1-Zytokine (IL-2, TNF-α und -β sowie Interferon-γ) wird unterdrückt. Bei gestörten Schwangerschaftsverläufen scheint das immunologische Geschehen hin zu einer TH1-Immunantwort verschoben zu sein, was sich unter anderem in einer erhöhten Killerzell-Aktivität (NK-Aktivität) zeigt. Frauen mit RSA und hoher peripherer NK-Aktivität haben ein 3,5-fach höheres Abortrisiko im Vergleich zu Frauen mit einer normalen NK-Aktivität (6).

Autoimmunologische Faktoren:

Das Vorkommen positiver Anti-Cardiolipin-Antikörper (ACL-AK) bei Frauen mit RSA liegt zwischen 5% und 51% (116) und bei 0-20% mit Lupus Antikoagulanz (LA). Durchschnittlich haben 7-25% der RSA-Patientinnen ein APLS (14). Unbehandelte Frauen mit wiederholt positivem LA oder erhöhten ACL-AK haben in bis zu 90% einen erneuten Abort oder andere Schwangerschaftskomplikationen, wie eine schwere Präeklampsie bzw. ein HELLP-Syndrom (Haemolysis, Elevated Liver Enzyme Levels, Low Platelet Counts-Syndrom) oder eine schwere Plazentainsuffizienz (37).

Tab. 1 zeigt die Diagnosekriterien bei APLS.

Anamnese	**Laborbefunde**	**nebenbefundlich**
≥3 unklare RSA <10 SSW oder ≥1 ungeklärter IUFT bei normaler embryonaler Sono-/Histo-Morphologie (≥10 SSW) oder ≥1 vorzeitige Entbindung wegen Präeklampsie und/oder IUGR	(mindestens 2x/6 Wochen) positive ACL IgG/IgM Positives Anti-β2 Glykoprotein 1 IgG/IgM positives LA	PTT verlängert Thrombozyten vermindert

Tab. 1: International Consensus Statement on classification criteria for definite antiphospholipid syndrom. Arthritis Rheumatol (1999) 42:1309-11

Angeborene thrombophile Ursachen:

Insgesamt können hereditäre Thrombophilien bei ca. 49-65% aller Patientinnen mit Schwangerschaftskomplikationen wie RSA, Präeklampsie, IUGR oder intrauterinem Fruchttod (IUFT) nachgewiesen werden. Bei Patientinnen mit unauffälligem Schwangerschaftsverlauf liegt dieser Anteil im Vergleich mit nur 18-22% deutlich darunter (60). Ein erfolgreicher Schwangerschaftsverlauf hängt entscheidend ab von fein aufeinander abgestimmten Abläufen im Bereich des fibrinolytischen Systems mit Sicherung der Fibrinpolymerisation und Stabilisierung im Bereich des plazentaren Gefäßbettes auf der einen Seite und der Prävention einer übermäßigen Fibrinbildung mit einer damit verbundenen ungestörten plazentaren Entwicklung und -Funktion auf der anderer Seite. Beeinträchtigungen der uteroplazentaren Einheit im Rahmen von hämostaseologischen Störungen bei Frauen mit familiären Thrombophilien gehen mit einem erhöhten Fehlgeburtsrisiko einher, insbesondere für Totgeburten (Fehlgeburt nach der 28. SSW) im Vergleich zu Frauen ohne Gerinnungsstörungen (84).

Sanson et al. konnten in einer Fall-Kontroll-Studie bei 60 Frauen mit hereditären Thrombophilien (AT-III-Mangel, Protein S- und Protein C-Mangel) ein erhöhtes Risiko für RSA nachweisen (93). In einer Auswertung von insgesamt 54 Fall-Kontroll- bzw. Kohorten-Studien, die von *Dudding et. al.* hinsichtlich des Nachweises eines Zusammenhangs einer mütterlichen FVL-Mutation und eines ungünstigen Schwangerschaftsverlaufs durchgeführt wurde, konnte die FVL-Mutation bei Frauen mit RSA im II. und III. Trimenon sowie bei Frauen mit Präeklampsie und IUGR im Vergleich zu Frauen der jeweiligen Kontrollgruppe häufiger nachgewiesen werden (35). In einer Metaanalyse von *Rey et al.* ist sowohl der Frühabort als auch der Spätabort mit der FVL-Mutation statistisch signifikant verbunden. Ähnliches gilt für die Prothrombin-Mutation und den Protein-S-Mangel (90).

Molekulardiagnostische Analysen der Gene von Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor I (PAI-I) zeigten, dass Polymorphismen im Bereich dieser Gene signifikant häufiger bei Frauen mit RSA zu beobachten waren als bei Frauen der Kontrollgruppe (19). Bei homozygoten Anlageträgerinnen kommt es über erhöhte Konzentrationen von ACE zu einer vermehrten Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II, was zu erhöhten

PAI-I-Konzentrationen und somit zu einer Hypofibrinolyse mit Erhöhung der Hyperkoagulabilität unter anderem im uteroplazentaren Gefäßbett führt (19).

In einer retrospektiven Analyse an der Frauenklinik des Klinikums Großhadern wurden 175 RSA-Patientinnen ausführlich auf mögliche Risikofaktoren untersucht. 133 der Patientinnen (76%) hatten Frühaborte (< 12. SSW), 42 (24%) Früh- und Spätaborte. Bei 63 der Frauen (36%) konnten thrombophile Risikofaktoren und bei 50 (28,6%) autoimmunologische Auffälligkeiten nachgewiesen werden (Abb. 2). Andere Autoren wiederum sahen keinen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer mütterlichen Thrombophilie und Fehlgeburten vor der 10. SSW (92). Manche Studien berichteten sogar über ein vermindertes Risiko für Spontanaborte bei Vorliegen einer hereditären Thrombophilie (22)(113).

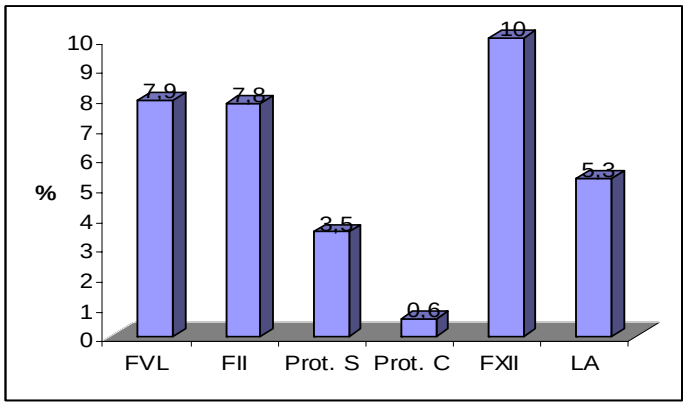


Abb. 2: Prozentuale Verteilung von Risikofaktoren bei Frauen mit RSA aus einem Kollektiv der Frauenklinik des Klinikums Großhadern

Bis zum jetzigen Zeitpunkt kann lediglich bei etwa 50% der RSA-Patientinnen eine Ursache für die sich wiederholenden Fehlgeburten festgestellt werden. Bei den verbleibenden 50% der betroffenen Frauen bleibt die eigentliche Ursache ungeklärt (85)(102).

1.2 RSA und Mikropartikel (MP): ein neuer Risikofaktor?

Im Rahmen der normalen Schwangerschaft kommt es zu Veränderungen des hämostaseologischen Gleichgewichts hin zu einer erhöhten Gerinnbarkeit, erkennbar an einem signifikanten Anstieg von Gerinnungsfaktoren (FV, FVII, FVIII, FIX, FX, FXII und von Willebrand Faktor) und Fibrinogen, einer reduzierten fibrinolytischen Aktivität sowie dem gleichzeitigen Abfall und vermindertem Ansprechen antikoagulatorisch wirksamer Substanzen (Protein S, aktiviertes Protein C) (45)(101). Durch diese Vorgänge steigt das Risiko thrombembolischer Komplikationen in der Schwangerschaft und im Wochenbett um das 4-10-fache.

Eine vermehrte Expression von Tissue Factor (TF) sowie die Reduktion des TF-Inhibitors (TFPI) im Bereich des Trophoblasten spiegeln eine lokale Anpassung der Hämostase während der Schwangerschaft wieder. Bei einigen RSA-Patientinnen konnten Fibrinablagerungen im intervillösen Raum der Plazenta nachgewiesen werden (46)(87). Der Nachweis dieser Fibrinablagerungen kann möglicherweise als Hinweis einer vermehrten prokoagulatorischen Neigung gedeutet werden und mitverantwortlich für die habituellen Aborte sein. MP könnten in diesem Zusammenhang Einfluss auf die veränderte Hämostase nehmen.

Die Prävalenz und die Rolle von MP im Rahmen von schwangerschaftsbedingten Gefäßerkrankungen werden kontrovers diskutiert. Neuere Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen zirkulierenden prokoagulatorischen MP und RSA besteht. So wurde durch *Laude et. al*. (61) erhöhte MP-Konzentrationen bei 59% der untersuchten RSA-Patientinnen mit Frühaborten und bei 48% der untersuchten Patientinnen mit Spätaborten im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen. *Carp et. al*. (25) zeigten bei 12,5% der untersuchten RSA-Patientinnen - unabhängig vom Zeitpunkt des Abortgeschehens - erhöhte Konzentrationen von endothelialen MP (EMP), als mögliches Korrelat einer endothelialen Schädigung oder Aktivierung im Rahmen der Pathogenese von RSA im Vergleich zu 2,2% in der Kontrollgruppe.

Fehlgeburten bei zugrundeliegender thrombophiler Störung werden unter anderem auf thrombotische Geschehen im uteroplazentaren Gefäßbett zurückgeführt (61). Das vermehrte Vorhandensein von MP bei einem Teil der RSA-Patientinnen ist unter Umständen auf einen chronisch-inflammatorischen Stimulus zurückzuführen. Die Assoziation mit dem Abortgeschehen könnte

aufgrund der Vulnerabilität des Trophoblasten für diese prokoagulatorischen Partikel sein. Die proinflammatorischen und apoptotischen Effekte der MP könnten Einfluss auf die Entstehung einer Plazentainsuffizienz bzw. der Bildung von Mikrothromben im Plazentabett nehmen. Die genauen Mechanismen, welche zu einer vermehrten Bildung von MP führen und die Auslösefaktoren für das Absterben des Embryos/Feten sind derzeit noch unklar.

1.3 Mikropartikel

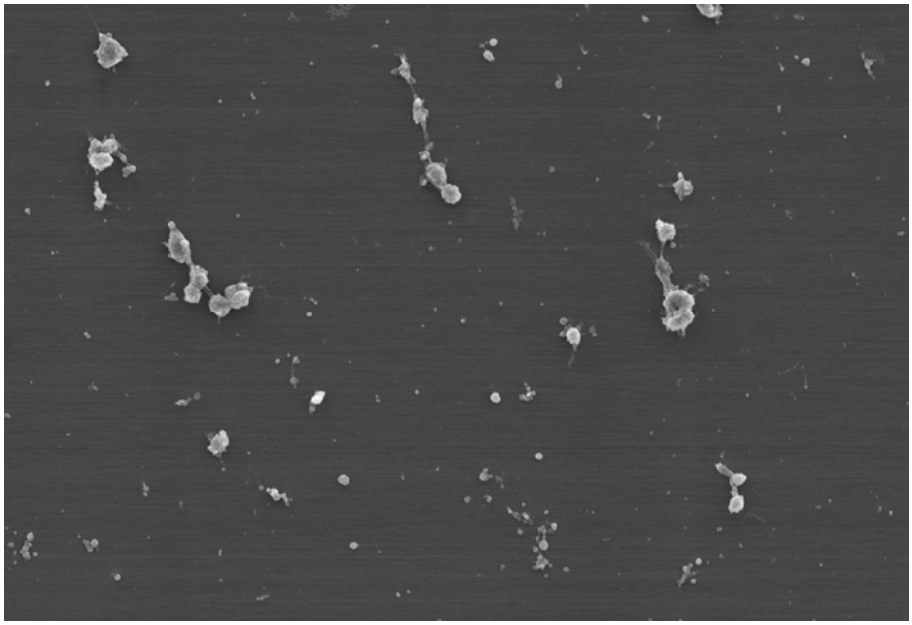


Abb. 3: Zirkulierende MP bei Mammakarzinom-Patientinnen. Elektronenmikroskopische Darstellung (111)

1.3.1 Grundlagen

MP sind kleinste Membranfragmente, mit einer Größe zwischen 0,1 und 1µm (Abb. 3). Sie können sowohl *in vivo* im Blut und anderen Körperflüssigkeiten als auch *in vitro* in Zellkulturen nachgewiesen werden (109). Zirkulierende Blutzellen und Endothelzellen (EC) sind in der Lage, MP freizusetzen. MP tragen auf ihrer Oberfläche zellspezifische Marker ihrer Ursprungszellen. Im Gegensatz zu anderen zirkulierenden Lipoproteinen (HDL/LDL, Chylomikronen) zeigen MP in elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine große Varianz im Hinblick auf ihre Dichte (proteinreiche und proteinarme Formen) und Größe (52).

Das wissenschaftliche Interesse an der Erforschung von MP und deren Einfluss im Rahmen von verschiedensten Erkrankungen unterschiedlicher medizinischer Fachdisziplinen ist in den vergangenen Jahren stark angestiegen. Abb. 4 zeigt die steigende Anzahl der erschienenen Publikationen zum Thema MP bezogen auf die vergangenen Jahre.

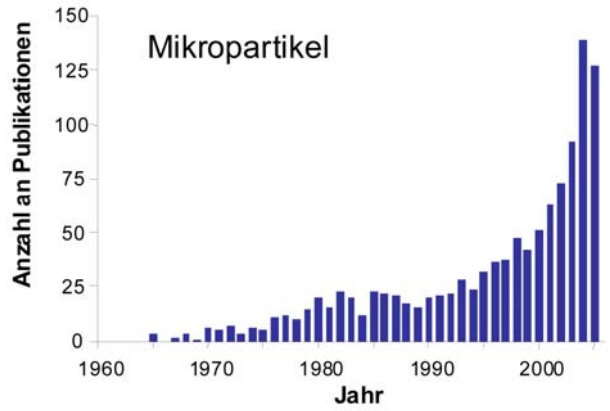


Abb. 4: Anzahl an Publikationen zum Thema MP bezogen auf die Jahre (109)

MP können als genereller Indikator für Gefäßverletzungen, oxidativen Stress, Hyperkoagulabilität oder Entzündungsprozesse gewertet werden (115). Die wesentlichen klinischen Untersuchungen der MP-Analyse beschäftigen sich mit der Korrelation von Expression und Subtypisierung von MP bei verschiedenen Erkrankungen (11)(44)(56)(61)(62)(76)(83). Es gibt Hinweise, dass sowohl thrombozytäre MP (PMP) als auch EMP Marker für die Krankheitsaktivität bei Autoimmunerkrankungen wie Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, rheumatoider Arthritis und Multipler Sklerose sind (4)(58)(71). Ebenso fanden sich erhöhte Werte von PMP bei Patienten mit diabetischer Retinopathie, peripherer arterieller Verschlusskrankheit und Myokardinfarkt. Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen zur MP-Analyse bei Patientinnen der Gynäkologie und Geburtshilfe. In der normalen Schwangerschaft scheint die Konzentration von PMP und EMP anzusteigen, wohingegen in pathologischen Schwangerschaftsverläufen mit Entwicklung einer Präeklampsie eine Verminderung der PMP beschrieben wurden (16). Bei RSA-Patientinnen zeigten sich erhöhte Gesamt-MP-Konzentrationen sowie erhöhte Konzentrationen von EMP (25)(61).

1.3.2 Entstehung

Die genauen Entstehungs- und Freisetzungsmechanismen der MP sind in vielen Punkten noch nicht abschließend geklärt. Ein entscheidender Faktor zur Freisetzung der MP ist die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration aus zellinternen Speichern oder aus dem Plasma. MP werden vor allem von Thrombozyten, aber auch von anderen Blutzellen wie Erythrozyten, Leukozyten sowie EC und glatten Gefäßmuskelzellen unter anderem während Zellaktivierung und Zellapoptose freigesetzt.

a) Zellaktivierung

Verschiedene Agonisten sind in der Lage, die Bildung von MP durch Aktivierung der Ursprungszellen zu initiieren. So führen unter anderem Thrombin, Calcium-Ionophor, Kollagen oder der Komplex C5b-9 des Komplementsystems zur Aktivierung von Thrombozyten. Bakterielle Lipopolysaccharide und Zytokine (TNF α, Interleukin-1) regen unter anderem EC an, MP zu bilden (8)(10)(30)(72)(94)(106)(121). Entscheidend für die MP-Freisetzung im Rahmen der Zellaktivierung ist der Anstieg des intrazellulären Calciums (72)(73)(121). Hierdurch kommt es über die Aktivierung von Proteasen (Kinasen, Calpain) und Inhibierung von Phosphatasen zu Veränderungen im Bereich des Zytoskeletts, bestehend aus Aktin, Vinculin und Talin (10)(39)(123), welches für die Stabilität der Zellmembran verantwortlich ist. Der Zusammenbruch des Membranskeletts führt zur Vesikulation der MP und damit zu deren Freisetzung (40).

b) Zellapoptose

Zentraler Bestandteil der MP-Bildung im Verlauf der Apoptose ist die Kontraktion der Ursprungszelle. Sie wird unterstützt durch die vermehrte Aktivität einer Kinase (ROCK I) (29), die die Bildung kontraktiler Membranbestandteile (Aktin–Myosin-Filamente) und deren Verbindung mit der Plasmamembran (65) initiiert und somit zur Zellkontraktion und Bildung der MP führt.

Abb. 5 zeigt in schematischer Darstellung einen möglichen Entstehungsmechanismus von MP.

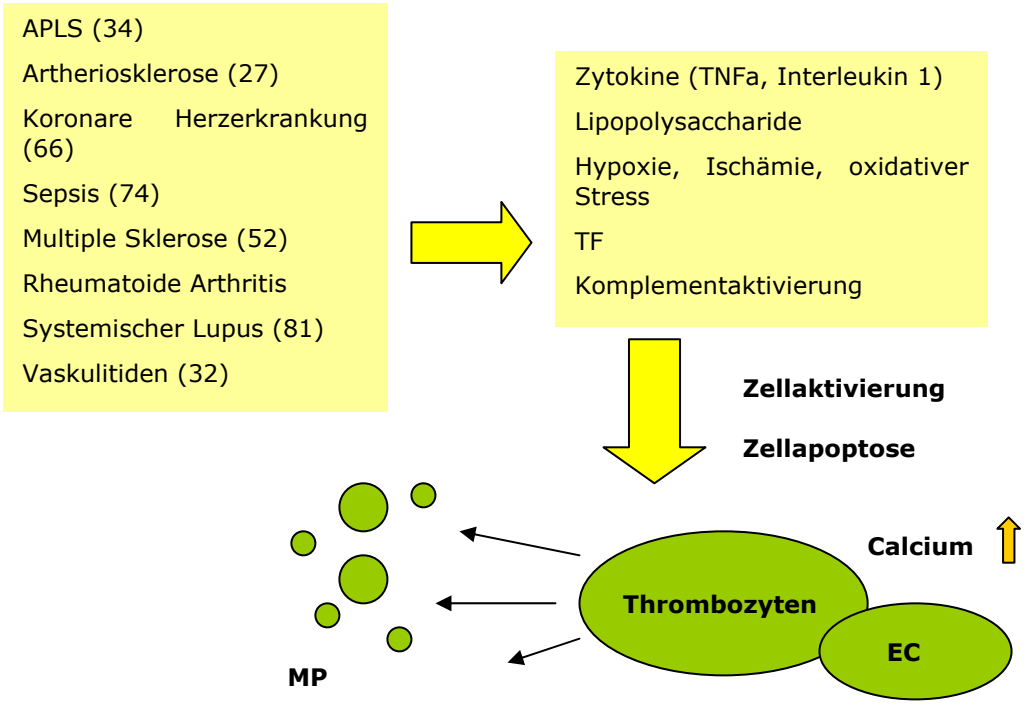


Abb. 5: möglicher Entstehungsmechanismus von MP (schematische Darstellung)

1.3.3 Aufbau

MP werden von einer Doppelmembran umgeben. Diese setzt sich hauptsächlich aus Proteinen und Lipiden zusammen. In ruhenden Zellen sind die Phospholipide asymmetrisch im Bereich der Zellmembran verteilt, wobei sich der äußere Membrananteil vor allem aus Sphingomyelin und Phosphatidylcholin (PC) zusammensetzt, wohingegen der innere Anteil hauptsächlich aus Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) aufgebaut ist. Die Zusammensetzung der Phospholipide in der Zellmembran ist hoch spezifisch und ihre asymmetrische Verteilung garantiert die Neutralität der Zellmembran.

Während des Vorgangs der Zellaktivierung und MP-Entstehung kommt es zum Verlust der asymmetrischen Verteilung und zur Exposition negativ geladener Phospholipide (PS, PE, PC) auf der Membranaußenseite (125). Durch diese Phospholipide, speziell durch PS, sind MP in der Lage, Gerinnungsfaktoren zu binden. Die MP-Zellmembran wird dann zu einer katalytischen Oberfläche für Gerinnungsfaktoren, was zu einer Beschleunigung der Gerinnungsabläufe führt (82).

In welcher Art und Weise die einzelnen Membrankomponenten auf der MP-Oberfläche zusammengesetzt sind, ist abhängig vom zellulären Ursprung der MP,

deren Entstehungsprozess (115) sowie der zu MP-Erhöhung führenden Grunderkrankung.

In vergleichenden Untersuchungen hinsichtlich des zellulären Ursprungs und der Phospholipidzusammensetzung der MP von gesunden Probanden und Arthritispatienten konnten *Fourcade et al.* deutliche Unterschiede nachweisen (38). So wurden die aus dem Blut von gesunden Personen isolierten MP hauptsächlich von Thrombozyten gebildet, während die MP von Arthritispatienten, extrahiert aus der Synovialflüssigkeit, vor allem von Leukozyten stammten (11)(12). Die MP-Membranen der gesunden Probanden enthielten überwiegend PC; diejenigen von Arthritispatienten bestanden zu jeweils 20-25% aus PC, PE, Sphingomyelin, Lysophospholipiden und einem geringen Anteil aus PS (38).

MP präsentieren auf ihrer Membranoberfläche zusätzlich spezifische Proteine der Ursprungszellen, die von deren Aktivierungszustand unbeeinflusst bleiben (z.B. CD4 bei MP von T-Helfer-Zellen) (7).

Gleichzeitig finden sich Proteine im Bereich der MP-Membranaußenseite, die verstärkt unter dem Einfluss der Zellaktivierung oder Zellapoptose exprimiert werden (30). So präsentieren MP aus stimulierten EC-Kulturen vermehrt E-Selektin, wohingegen auf den von stimulierten Thrombozyten gebildeten MP vermehrt P-Selektin-Rezeptoren nachweisbar waren (2)(115). Die Art der exprimierten Proteine hängt unter anderem von der Art des zur Stimulation der Ursprungszellen verwendeten Substrats ab. Bei der Aktivierung durch Thrombin oder Kollagen kommt es zur Expression des Glykoproteins IIb-IIIa (Fibrinogenrezeptor). Verwendet man zur Stimulation der Ursprungszellen C5b-9, ist der Fibrinogenrezeptor nicht nachweisbar (98). Das Komplement-Protein C5b-9 unterstützt im Rahmen der Zellaktivierung die Verbindung von α-Granula aus Thrombozyten mit der Plasmamembran und die Bildung von MP. Somit exprimieren die auf diesem Wege entstandenen MP sowohl Membranproteine der thrombozytären Plasmamembran (z.B. GP Ib) als auch Proteine aus dem Bereich der α-Granula (GMP-140, Faktor Va-Rezeptor) (97).

Über intravesikuläre Komponenten der MP und deren Zusammensetzung sind derzeit noch keine Daten verfügbar.

1.3.4 Pathophysiologische Bedeutung

Obwohl in Bezug auf die pathophysiologischen Eigenschaften der MP noch viele Fragen offen sind, weiß man um deren Bedeutung im Rahmen von

a) vaskulären Dysfunktionen und

b) prokoagulatorischen Veränderungen.

a) vaskuläre Dysfunktionen

MP sind in der Lage, über die Beeinflussung der Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, PECAM-1, E-Selektin) Interaktionen zwischen EC und zirkulierenden Blutzellen (z.B. Monozyten) zu bedingen (9). Hieraus resultiert unter anderem eine vermehrte Migration von Leukozyten in den Intimabereich der Gefäßwand. Sowohl Leukozyten als auch MP selbst führen zu einer Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und somit die Bildung von Gefäßplaques im Rahmen der Arteriosklerose entstehung unterstützen (70).

Ein weiterer möglicher Mechanismus, über den MP in die Integrität der Gefäßwand eingreifen können, bietet der Nachweis von oxidierten Phospholipiden auf der Membranoberfläche von EMP, die von mit Peroxiden (t-Butylhydroperoxid) behandelten EC gebildet wurden (80). Oxidativer Stress stellt ein zentrales pathophysiologisches Modell im Rahmen verschiedener kardio-vaskulärer Erkrankungen (Myokardinfarkt, Artheriosklerose, Präeklampsie) dar. Über die oxidativ veränderten Phospholipide sind MP in der Lage, an den Platelet-Activating-Factor-Rezeptor (PAF-Rezeptor) im Bereich von EC und Leukozyten zu binden (99). Dieser Rezeptor wir unter anderem im Bereich des Endothels im Rahmen der Stimulation von EC mit TNF α oder Interleukin-1α während inflammatorischer Prozesse exprimiert und ermöglicht seinerseits die Bindung und Aktivierung von Leukozyten, die so zur Schädigung endothelialer Strukturen beitragen und die Gerinnungskaskade beeinflussen (64).

Van Wijk et al. untersuchten den Einfluss sowohl von isolierten MP als auch von Plasma von Präeklampsiepatientinnen auf die Funktion des Gefäßendothels und verglichen dies mit dem Einfluss von MP der gesunden Kontrollgruppe im Hinblick auf die Abnahme der Relaxationfähigkeit (Bradykinin vermittelt) myometraner Arterien gesunder schwangerer Frauen. Sowohl isolierte MP aus dem Plasma

gesunder Frauen als auch das Plasma von Patientinnen mit Präeklampsie hatten keinen Einfluss auf das Gefäßendothel (keine Abnahme der Relaxationfähigkeit). Die mit MP aus dem Plasma der Präeklampsiepatientinnen inkubierten Arterien zeigten mit zunehmender Inkubationsdauer eine Abnahme ihrer Relaxationsfähigkeit. Somit konnte einerseits ein schädigender Einfluss durch isolierte MP von Präeklampsiepatientinnen gezeigt werden, auf der anderen Seite scheint es im Plasma dieser Patientinnen zusätzlich protektive Faktoren zu geben, die der Wirkung der MP entgegensteuerten (114).

Abb. 6 zeigt eine Zusammenfassung des möglichen Einflusses von MP im Rahmen von Gefäßpathologien in schematischer Form.

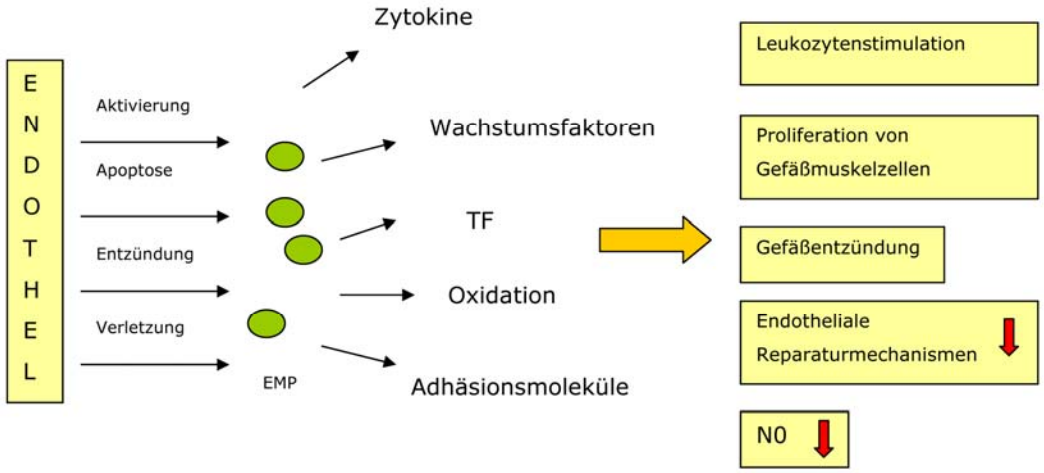


Abb. 6: Mögliche Rolle von MP bei der Entstehung von Gefäßpathologien (schematische Darstellung)

b) Prokoagulatorische Vorgänge

MP unterstützen die Gerinnung *in vitro* und *in vivo*. *In vitro* Versuche konnten zeigen, dass MP die Blutgerinnung unter anderem über die auf ihrer Oberfläche lokalisierten negativ geladenen Phospholipide beeinflussen. Sie sind in der Lage, hierüber aktivierte Gerinnungsfaktoren (FVIII (43), FVa (97) und FIXa (50)) zu binden und die Bildung des Tenase- und Prothombinasekomplexes zu fördern (11)(30).

MP können auf ihrer Oberfläche TF exprimieren und über diesen Weg ebenso die Gerinnungskaskade aktivieren. *Nieuwland et al.* gelang es, im Plasma von Patienten mit disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC) bei Meningokokken-Sepsis MP nachzuweisen, die TF auf ihrer Oberfläche exprimieren (74). TF, auch bekannt als CD142, Gewebsthromboplastin oder FIII ist der potenteste Aktivator des Gerinnungssystems. Es handelt sich um ein transmembranes Protein, dessen extrazellulärer Anteil als Rezeptor zur Bindung von Faktor VII dient, woraus dessen Aktivierung resultiert (FVIIa). TF ist der maßgebliche Faktor zur Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade (

Abb. 7).

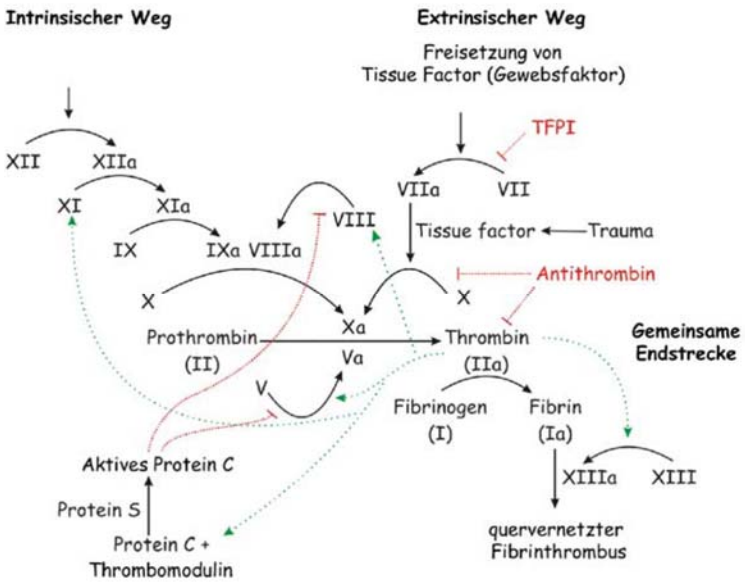


Abb. 7: Gerinnungskaskade

MP können die Expression und Bildung von TF fördern. Über P-Selektin auf ihrer Membranoberfläche sind MP und aktivierte Thrombozyten in der Lage, die Expression von TF auf anderen Blutzellen (z.B. Monozyten) zu triggern und somit zusätzlich indirekt in die Gerinnung einzugreifen (26).

MP können auch antikoagulatorische Eigenschaften entfalten, in dem sie die Inaktivierung von FVa und VIIIa über aktiviertes Protein C fördern. Im Blut gesunder Personen unterstützen MP die Bildung geringer Mengen Thrombin über einen TF- und FVII-unabhängigen Weg. Dies zeigten Untersuchungen von *Berckmans et. al.*, in denen AK gegen TF oder FVII keine Hemmung der Gerinnung bedingen. Möglicherweise führt Thrombin über die Bindung an den transmembranen Rezeptor Thrombomodulin (TM) und über die Aktivierung von Protein C (APC) zur Inaktivierung von Faktor Va und Faktor VIIIa und über eine negative Rückkopplung zu einer verminderten Thrombinbildung und Drosselung der Gerinnung (11).

Die Tatsache, dass MP Gerinnungsvorgänge *in vivo* beeinflussen, ist kaum bestritten. Dies unterstützen vielfältige Untersuchungen an Patienten mit Erkrankungen, welche mit einer erhöhten Koagulabilität einhergehen (APLS, akutes Koronarsyndrom, Diabetes mellitus etc.) (30)(76)(107). Thrombozyten von Patienten mit Erkrankungen, die mit einer erhöhten Blutungsneigung assoziiert sind (Scott Syndrom, Glanzmann´s disease), zeigen eine verminderte Fähigkeit, MP zu bilden (41)(98).

Abb. 8 zeigt in schematischer Darstellung durch MP möglicherweise beeinträchtigte Prozesse.

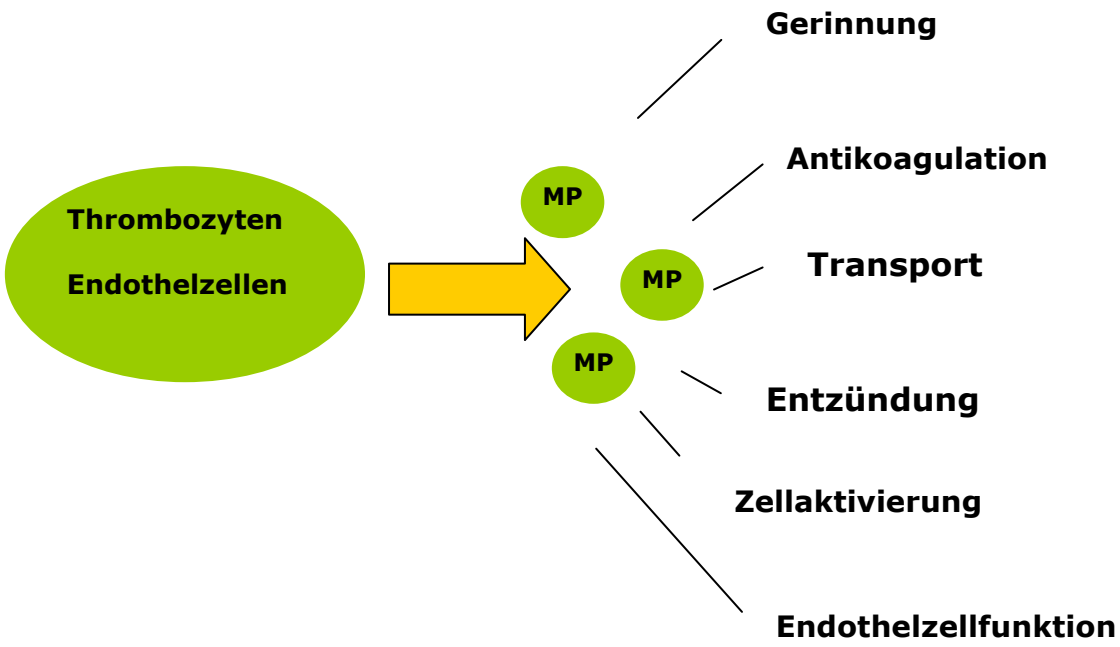


Abb. 8: Abläufe/Prozesse mit potenzieller Beeinträchtigung durch MP

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei Patientinnen mit RSA die Konzentration von thrombozytären und endothelialen MP durchflusszytometrisch mittels Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS) zu bestimmen und einen eventuellen Zusammenhang zwischen prokoagulatorisch wirkenden MP und dem Auftreten von RSA zu untersuchen.

Die angewandte Methode zur Isolierung der MP wurde im Rahmen der Doktorarbeit in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kolb, Medizinischen Klinik III, Klinikum Großhadern, und dem Institut für Klinische Chemie , AMC, Amsterdam, Niederlande, von unserer Arbeitsgruppe im Frauenforschungslabor des Klinikums Großhadern etabliert.

2 Material

2.1 Durchflusszytometrie

2.1.1 Geräte

BD Microlance 3,20G 1½,0,9x40 mm	(Corning Costar GmbH, Bodenheim, Deutschland)
Becherglas 50 ml	(Schott, Mainz, Deutschland)
Durchflusszytometer FACScan	(Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
Eppendorf Pipette 0,5 µl-10 µl	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Pipette 100 µl	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Pipette 100 µl-1000 µl	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Tips Standard 0,5-20 µl	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Tips Standard 2-200 µl	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Tips Standard 50-1000 µl	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Erlenmeyer-Kolben 500 ml	(Schott, Mainz, Deutschland)
Heraeus-Omnifuge 2.ORS	(Heraeus, Hanau, Deutschland)
Hettich-Zentrifuge Mikro 22 R	(Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland)
Mikroschraubröhrchen 1,5 ml	(Sarstedt, Kehlheim, Deutschland)
Monovette 2,3 ml EDTA	(Sarstedt, Kehlheim, Deutschland)
Monovette 5ml Coagulation	(Sarstedt, Kehlheim, Deutschland)
Multi-Adapter	(Sarstedt, Kehlheim, Deutschland)
pH-Meter	(WTW, Weilheim, Deutschland)
Polypropylene Conical Tube 50 ml	(BD Falcon, New Jersey, USA)

Polystyrene Round-Bottom.Tube 12x75 mm 5 ml	(BD Falcon, New Jersey, USA)
Reagiergefäß 1,5 ml	(Sarstedt, Kehlheim, Deutschland
Spritzen 20 ml	(Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
Sterilfilter 0,2 µm	(Satorius, Göttingen, Deutschland)
Sterilpipette 10 ml, wattiert	(Corning Costar GmbH, Bodenheim, Deutschland)
Sterilpipette 5 ml, wattiert	(Corning Costar GmbH, Bodenheim, Deutschland)
Vortex Genie 2	(Bender & Hobein, Zürich, Schweiz)

2.1.2 Puffer, Chemikalien

Arbeitslösung: Citratpuffer	0,32 % Tri-Natriumcitrat pH:7,4	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Arbeitslösung: Calciumpuffer	2,5 mmol/l pH:7,4	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
BD FACSFLOW		(BD Bioscience, Erembodegem, Belgien)
FACSafe		(BD Bioscience, Erembodegem, Belgien)
FACSRINSE		(BD Bioscience, Erembodegem, Belgien)
Grundlösung: Citratpuffer	3,2 % Tri-Natriumcitrat	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Grundlösung: Calciumpuffer	0,1 mol/l $CaCl_2$ (Calcium Chloride Dihydrat)	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
HCl 1 mol/l (1N)		(Merck, Darmstadt, Deutschland)
NaOH 1 mol/l (1N)		(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Natriumhypochlorit-lösung 12%		(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
PBS (Phosphat Buffered Saline)	1,4 mmol/l di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat (Na_2HPO_4 x $2H_20$ gelöst in Aqua dest.) 154 mmol/l NaCl (0,9 %)	(Merck, Darmstadt, Deutschland)

2.1.3 Monoklonale Antikörper

Annexin V FITC	1,0 ml; 100 test IQP-120F	(Immuno Quality (IQ) Products, Groningen, Niederlande)
Annexin V PE	1,0 ml; 100 tests; IQ-120R	(IQ Products, Groningen, Niederlande)
FITC-anti-human CD144	1,0 ml; 100 tests, Clone:SP1355F; IgG-Rabbit	(Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland)
FITC-anti-human CD51	2,0 ml; 100 tests; 50 µg/ml Clone: AMF7; IgG1-Mouse	(Immunotech, Marseille, Frankreich)
FITC-anti-human CD61	2,0 ml; 100 tests, Clone:SZ21; IgG1-Mouse	(BD Biosciences Pharmingen, Erembodegem, Belgien)
FITC-anti-human CD62P	2,0 ml; 100 tests, Clone:CLB-Thromb/6; IgG1-Mouse	(Immunotech, Marseille, Frankreich)
FITC-anti-human CD63	2,0 ml; 100 tests, Clone:CLB-grant12; IgG1-Mouse	(Immunotech, Marseille, Frankreich)
Isotype control IgG1-FITC	2,0 ml; 100 tests; IgG1-Mouse	(Immunotech, Marseille, Frankreich)
Isotype control IgG1-R-PE	1 ml; 100 tests IQP-191R; IgG1-Mouse	(IQ Products, Groningen, Niederlande)
PE-anti-human CD41	2,0 ml; 100 tests, Clone:P2; IgG1-Mouse	(Immunotech, Marseille, Frankreich)
PE-anti-human CD61	2,0 ml; 100 tests, Clone:VI-PL2; IgG1-Mouse	(BD Biosciences Pharmingen, Erembodegem, Belgien)
PE-anti-human CD62E-Selektin	2,0 ml; 100 tests, Clone:68-5H11;IgG1-Mouse	(IQ Products, Groningen, Niederlande)
PE-anti-human CD62P	2,0 ml; 100 tests, Clone: CLB-Thromb/6; IgG1-Mouse	(Immunotech, Marseille, Frankreich)
PE-anti-human CD63	2,0 ml; 100 tests, Clone: CLB-grant12; IgG1-Mouse	(Immunotech, Marseille, Frankreich)

2.1.4 Firmenliste

BD Bioscience, Erembodegem, Belgien

Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Corning Costar GmbH, Bodenheim, Deutschland

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Falcon R, Becton Dickinson and Company, Lincoln Park, New Jersey, USA

Haraeus Christ, Osterode, Deutschland

Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland

Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

Immunotech , Marseille, Frankreich

IQ Products, Groningen, Niederlande

Merck, Darmstadt, Deutschland

Sarstedt AG & Co. KG, Kehlheim, Deutschland

Satorius, Göttingen, Deutschland

Schott Glas, Mainz, Deutschland

Sigma Aldrich Co.Ltd, Irvine, UK

Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland

WTW, Weilheim, Deutschland

3 Methode

3.1 Studiendesign

3.1.1 Patientenkollektiv

Die Patientinnen der Studie wurden zwischen Mai 2004 und März 2007 aus der Spezialsprechstunde für Frauen mit RSA der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Klinikums Großhadern rekrutiert. Eingeschlossen wurden 103 nicht-schwangere Frauen, deren letztes Abortgeschehen zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie mindestens 8 Wochen zurück lag, die jünger als 45 Jahre waren und 2 oder mehr Spontanaborte ohne erkennbare Ursache erlitten hatten. In Anlehnung an das derzeit von mehreren Autoren (78)(57)(96) favorisiertes Vorgehen, Frauen mit bereits 2 Spontanaborten zur RSA-Gruppe zu zählen, was unter anderem in der aktuellen Leitlinie zur Diagnostik und Therapie bei wiederholten Spontanaborten der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe im Kapitel Inzidenz und Definition aufgegriffen wurde (3), wurden bereits Frauen mit 2 Fehlgeburten in die Studie eingeschlossen.

Aufgrund eines limitierten uns zur Verfügung stehenden Forschungsbudgets konnten wir im Vorfeld unserer Studie nicht alle der zum Teil sehr kostenintensiven Untersuchungen im Rahmen der RSA-Diagnostik durchführen. Unter Einbeziehung der derzeit noch sehr kontroversen Bewertung der verschiedenen Risikofaktoren für RSA und unter Fokussierung unserer Forschung auf prokoagulatorische Veränderungen wurden deshalb insbesondere Patientinnen mit bestehenden Gerinnungsstörungen bzw. die Gerinnung beeinflussende Faktoren ausgeschlossen. Ausschlusskriterien aus der Studie waren demnach:

1) Nachweis von Anti-Phospholipid-AK (ACL IgG und IgM und β2-Globulin IgG und IgM)
2) homozygote und heterozygote Träger einer Mutation im FV- oder FII G20210A-Gen sowie homozygote Träger einer MTHFR C677T–Mutation
3) Nachweis von antinukleären-AK (ANA-Titer >1:240)
4) erhöhte Leukozyten-Zahlen

5) Nikotinabusus innerhalb der vergangenen 6 Monate

6) Einnahme oraler Kontrazeptiva innerhalb der letzten 6 Monate

Die zur Ermittlung der Ausschlusskriterien erforderlichen Untersuchungen wurden im Vorfeld von unserer Studiengruppe durchgeführt.

3.1.2 Kontrollgruppe

In die Kontrollgruppe wurden im Zeitraum von Mai 2004 bis März 2007 31 Frauen eingeschlossen, die jünger als 45 Jahre waren und mindestens ein lebendes Kind geboren und in der Vorgeschichte keine Fehlgeburten erlitten hatten. IUGR, Frühgeburtlichkeit, IUFT oder Präeklampsie in der Anamnese sowie die unter 3.1.1 genannten Punkte 1) bis 6) führten zum Ausschluss aus der Studie.

3.1.3 Ethikkommission

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität erkannte am 20.11.2003 die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zur Durchführung der Studie an (Projekt-Nr.349/02).

Von allen Frauen liegt eine schriftliche Einverständniserklärung zur Durchführung der Untersuchungen vor.

3.1.4 Grundlagenversuche zu MP

Um zu überprüfen, in wie weit verschiedene Faktoren im Rahmen der MP-Isolation, der Probenaufbewahrung bzw. deren Aufarbeitung einen Einfluss auf die MP-Anzahl haben könnten, führten wir im Vorfeld unserer Messungen im Rahmen der Etablierung der Methode in unserem Labor Grundlagenversuche zu MP durch, die unter anderem ebenfalls Teile der Doktorarbeit von Frau Katharina Nikolajek sind (42).

3.1.4.1 Tageszeitliche Schwankungen der MP

Zur Prüfung von möglichen tageszeitlichen Schwankungen der MP-Anzahlen im Hinblick auf den Abnahmezeitpunkt der Blutproben führten wir zu unterschiedlichen Tageszeiten (8.00 Uhr, 12.00 Uhr, 16.00 Uhr und 20.00 Uhr) Blutabnahmen durch. Die daraus ermittelten MP-Anzahlen zeigten z. T. deutliche Unterschiede im Tagesverlauf, wobei vor allem morgens (8.00 Uhr) und abends (20.00 Uhr) höhere MP-Anzahlen gemessen werden konnten.

3.1.4.2 Lagerung und Stabilität der MP-Proben

In wie weit die Schnelligkeit der Weiterverarbeitung bzw. die Lagerung der Blutproben nach Abnahme bei Raumtemperatur oder auf Eiswasser einen Einfluss auf die MP-Anzahl hatte, überprüften wir, in dem wir Blutproben von ein und demselben Proband sowohl bei Raumtemperatur als auch auf Eiswasser lagerten und nach unterschiedlichen Zeitpunkten (20 min, 40 min und 60 min sowie 2 h, 4 h, 6 h und 24 h) weiterverarbeiteten. Bei den bei Raumtemperatur gelagerten Blutproben kam es innerhalb der ersten 60 min zu einem kontinuierlichen Abfall der MP-Anzahlen, wohingegen sich die MP-Zahlen der auf Eiswasser gelagerten Blutproben im Verlauf zunächst stabil verhielten, um dann nach etwa 40 min anzusteigen. Möglicherweise spielen im Rahmen der Lagerung der Proben bei Raumtemperatur phagozytäre Prozesse eine Rolle, die zur Reduktion der MP-Zahlen führen; diese scheinen durch Lagerung der Proben auf Eiswasser gestoppt werden zu können. Bei Lagerung der Blutproben auf Eiswasser scheinen allerdings nach einer gewissen Zeit mögliche Autoaktivierungsvorgänge durch einen eventuell zu lange wirkenden Kältereiz zu einer Erhöhung der MP-Zahl zu führen.

Im Rahmen der Versuche wurden deshalb alle Blutproben zunächst auf Eiswasser gelagert, um dann innerhalb 20 min weiter verarbeitet zu werden (siehe Kapitel 3.1.5).

Um Aussagen bezüglich einer Veränderung der MP-Anzahlen durch die Art des Einfriervorgangs im Hinblick auf die weitere Lagerung der MP-Proben treffen zu können, führten wir im Vorfeld vergleichende Versuche mit schockgefrorenen und nicht-schockgefrorenen Plasmaproben durch. Insgesamt zeigte sich bei Nicht-Schockgefrieren der Proben in den späteren Messungen eine insgesamt geringere Gesamt-MP-Anzahl. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre in diesem Zusammenhang eine stärkere Kristallbildung und eine hierdurch bedingte Verminderung der MP-Zahlen bei Nicht-Schockgefrieren der Plasmaproben. Aus diesem Grund wurden alle Plasmaproben vor der endgültigen Lagerung kurz schockgefroren.

Um eine Aussage treffen zu können, in welchen zeitlichen Abständen die MP-Proben nach ihrer Aufarbeitung (siehe Kapitel 3.2.3) im Durchflusszytometer eingelesen und gemessen werden mussten (Stabilität der aufbereiteten Proben), überprüften wir die Anzahl der MP nach Aufarbeitung der Proben nach 15 min, 30 min 45 min und 60 min. Hierbei zeigte sich durchweg eine kontinuierliche Abnahme der MP-Anzahlen in allen Proben, die mit zunehmender Dauer bis zum Messen der Proben mehr oder weniger zu nahm. Nach 60 min konnte eine deutliche Abnahme der MP-Zahlen festgestellt werden. Die gewisse Instabilität der MP-Proben musste bei der zukünftigen Planung der Probenaufarbeitung und deren Messung berücksichtig werden und setzte eine genaue logistische Planung voraus.

3.1.5 Probengewinnung und Probenverarbeitung

Die Blutabnahme erfolgte jeweils am Morgen um 8.00 Uhr durch eine hierfür geschulte Person durch Punktion einer antekubitalen Vene mit einer weitlumigen Kanüle (21G) bei einem ungefähren Stauungsdruck von 40 mmHg. Vorversuche ergaben, dass diese Abnahmetechnik keinen Einfluss auf den Aktivierungszustand der Thrombozyten hatte. Zur Bestimmung der MP-Anzahl wurde eine Citrat-Monovette (5 ml Monovette) abgenommen. Um eine Autoaktivierung der Thrombozyten und eine damit verbundene MP-Bildung *in vitro* zu verhindern, wurden die Citrat-Monovetten innerhalb von 20 min für 20 min bei 1550 x g zur Herstellung von plättchenarmem Plasma (PPP) zentrifugiert. Das PPP wurde abpipettiert und in 300 µl-Portionen in Mikroschraubröhrchen aliquotiert. Die Aliquots wurden für 15 min in Flüssigstickstoff schockgefroren und im Anschluss bei -80°C gelagert.

3.1.6 Statistik

Parametrisch verteilte Daten werden als Mittelwerte (±SD) dargestellt. Alle anderen Daten werden dargestellt als Median ((Q1-Q3) = Interquartilsabstand). Unabhängige Variablen wurden unter Verwendung des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests, des Chi-Quadrat-Tests und des *t*-Tests ermittelt. Für P-Werte <0,05 wurde eine statistische Signifikanz festgelegt. Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte unter Verwendung des Programms SPSS für Windows (Statistical Package for Social Science, Version 16,0, Chicago, IL., USA).

3.2 Durchflusszytometrie

3.2.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine *in vitro* Untersuchung, bei der mit Hilfe von AK und Farbstoffen Zellen und von Zellen gebildete Bestandteile (z.B. MP) analysiert werden können.

Die zu untersuchenden Zellen und Zellbestandteile müssen bei diesem Verfahren in einer Zellsuspension vorliegen. Diese wird angesaugt und in eine Messkammer geleitet, durch die kontinuierlich Trägerflüssigkeit gepumpt wird. Kommt es zum Zusammenfluss beider Flüssigkeitsströmungen, wird der Probenstrom durch die laminär strömende Trägerflüssigkeit erfasst, auf die Mitte der Messküvette konzentriert (hydrodynamische Fokussierung) und so stark beschleunigt, dass sich die zu messenden MP perlschnurartig anordnen, um so die Messzelle zu passieren.

In dieser Messzelle werden die MP durch eine Lichtquelle (Argon-Laser) angeregt, um je nach physikalischer Eigenschaft Licht in unterschiedlicher Quantität und Qualität zu streuen. Hierbei werden verschiedene Eigenschaften, wie Größe und Granularität der MP erfasst. Die MP-Größe wird durch das Ausmaß der Vorwärtsstreuung des Laserlichts (Forward-Scatter, FSC) bestimmt, die MP-Granularität durch das Ausmaß der Seitwärtstreuung (Side-Scatter, SSC).

Durch die Verwendung fluoreszierender AK und Annexin V, einem Calcium-abhängigen Protein, werden die MP sichtbar gemacht und können, entsprechend der Wahl der AK, ihren verschiedenen Subpopulationen zugeordnet werden. Aufgrund der jeweiligen Stärke des Fluoreszenzsignals kann auf die Häufigkeit der MP geschlossen werden. Das in unseren Untersuchungen verwendete Durchflusszytometer FACScan der Firma Becton Dickinson enthält als zentrales Element einen Argonlaser mit einer fluoreszenzanregenden Wellenlänge von λ=488 nm. Es können hiermit bis zu drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe auf drei FACS-Kanälen gleichzeitig sichtbar gemacht werden. Voraussetzung dabei ist, dass sich die Farbstoffe in denen von ihnen emittierten Wellenlängen voneinander unterscheiden. Die Detektionswellenlänge von Kanal 1 liegt bei λ=530 nm, die von Kanal 2 bei λ=585 nm und die von Kanal 3 bei λ=650 nm. Als Fluoreszenzfarbstoffe verwendeten wir Fluoreszein-Isocyanat (FITC, mittlere Emissionswellenlänge λ=525 nm), welches auf Kanal 1 des FACS-Gerätes

registriert wird und Phycoerythrin (PE, mittlere Emissionswellenlänge λ=575 nm), das auf Kanal 2 gemessen wird.

3.2.2 Pufferlösungen

Die Calcium– und Citratpufferarbeitslösungen wurden täglich aus den entsprechenden Calcium– und Citratgrundlösungen hergestellt.

Zur Herstellung der Calciumgrundlösung wurden 1,47 g $CaCl_2$ in 100 ml sterilem Aqua dest. gelöst (0,1 mol/l). Die Grundlösung wurde bei 2-8 °C für maximal 10 Monate aufbewahrt.

Zur Herstellung der Citratgrundlösung wurden 1,6 g Tri-Natriumcitrat in 50 ml sterilem Aqua dest. gelöst (3,2% Tri-Natriumcitrat). Die Grundlösung wurde bei 2-8 °C für maximal 2 Monate gelagert.

Für die Herstellung der Calciumpufferarbeitslösung wurden 1 ml der Calciumgrundlösung zu 39 ml PBS gegeben. Die Lösung wurde täglich erneuert.

Die Citratpufferarbeitslösung wurde durch Zugeben von 3 ml Citratgrundlösung zu 27 ml PBS hergestellt. Die Lösung wurde ebenfalls täglich frisch hergestellt.

Der pH–Wert der Arbeitslösungen wurde am pH-Meter auf Werte zwischen 7,36 und 7,43 titriert. Anschließend wurde die Pufferlösung steril gefiltert (0,2 µm Sterilfilter).

3.2.3 Probenansätze

3.2.3.1 Mikropartikel-Isolation

Die MP wurden nach einer von *Nieuwland et al.* publizierten Methode (75) isoliert und analysiert. Die tief gefrorenen Plasmaproben aus PPP wurden zunächst schonend über einen Zeitraum von zirka 1 Stunde auf Eis bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden 250 µl Plasma abpipettiert und in ein 1,5 ml Mikroschraubröhrchen gegeben und bei 20°C für 30 min bei 17570x g ultrazentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 2x 100 µl und 1x 25 µl MP-freier Überstand vorsichtig unter Schonung des MP-Pellets entfernt. Die

restlichen 25 µl Plasma inklusive MP-Pellet wurden in 225 µl Citratpuffer resuspendiert und erneut bei 20°C für 30 min mit 17570x g zentrifugiert.

Im Anschluss wurden erneut 2x 100 µl und 1x 25 µl Überstand abpipettiert und das MP-Pellet in 75 µl Citratpuffer resuspendiert. Aus der so gewonnenen MP-Suspension (100 µl) wurden später pro Probenansatz 5 µl verwendet.

3.2.3.2 Antikörpervorbereitung

Zur Verwendung der AK waren im Vorfeld Waschschritte erforderlich, um die AK-Stammlösungen von eventuell vorhandenen Verunreinigungen zu befreien. Als Waschpuffer verwendeten wir die Calciumpufferarbeitslösung. Die AK-Stammlösung wurden mit Calciumpuffer in 1,5 ml Mikroschraubröhrchen verdünnt und für 5 min bei 17570 x g ultrazentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere Hälfte des Überstandes abpipettiert und pro Probenansatz 5 µl verwendet.

3.2.3.3 Vorbereitung von Annexin V

Bei der Verwendung von Annexin V-FITC und Annexin V-PE waren nach Herstellerangaben im Vorfeld keine Waschschritte notwendig. Die verwendeten Annexin V-Stammlösungen wurden mit Calciumpuffer in 1,5 ml Mikroschraubröhrchen verdünnt (Annexin V-FITC 1:10; Annexin V-PE 1:20). Für die Probenansätze verwendeten wir jeweils 5 µl der verdünnten Annexin V-Lösung.

3.2.3.4 Mikropartikel-Proben

Zur eindeutigen Identifikation der MP-Population im Durchflusszytometer wurden alle Proben mit Annexin V-FITC gefärbt. In Abhängigkeit von den zu untersuchenden MP-Subpopulationen wurde ein entsprechender zweiter, PE markierter AK zugegeben. Bei der Verwendung des Anti-CD144-AK, der nur FITC gelabelt bezogen werden konnte, verwendeten wir Annexin V-PE.

Für unsere Untersuchungen ergaben sich pro zu messender Studienperson 9 Probenansätze. Als Negativkontrolle für Annexin V wurden 35 µl der Citratpuffer-Arbeitslösung mit 5 µl Annexin V-FITC (1:10)/Annexin V-PE (1:20) und 5 µl der MP-Suspension gemischt. Für alle weiteren Proben wurden jeweils 35 µl der Calciumpuffer-Arbeitslösung verwendet, da Annexin V nur in Gegenwart von Calcium an MP bindet. Für die Negativkontrolle der AK wurden 5 µl des in

Calciumpuffer verdünnten IgG1-R-PE-AK (1:10), 5 µl der Annexin V-FITC-Lösung (1:10) und 5 µl der MP-Suspension gemischt. Ein entsprechendes Vorgehen erfolgte unter Verwendung des Anti-CD144-FITC-AK, für den als Negativkontrolle 5 µl IgG1-FITC (1:10), 5 µl der Annexin V-PE-Lösung (1:20) und 5 µl der MP-Suspension verwendet wurden. Zur Identifikation der MP-Subpopulationen wurden jeweils 5 µl des jeweiligen, in Calciumpuffer verdünnten Anti-CD-AK, 5 µl der MP-Suspension und 5 µl der Annexin V-Lösung suspendiert. Die Endlösung enthielt ein Volumen von 50 µl. Die Proben wurden für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Durch Zugabe und Resuspension von 900 µl Citratpuffer zur Annexin V-Negativkontrolle und 900 µl Calciumpuffer zu den übrigen Proben wurde die Reaktion gestoppt. Zur durchflusszytometrischen Messung wurden die Proben in FACS-Röhrchen pipettiert und vor dem Einlesen in das FACS-Gerät nochmals resuspendiert.

AK	AK-menge	Annexin-FITC	Annexin-PE	MP-Suspension	Citrat-puffer	Calcium-puffer
Annexin-FITC	5µl			5µl	35µl	
Annexin-PE	5µl			5µl	35µl	
IgG-FITC	5µl		5µl	5µl		35µl
IgG-PE	5µl	5µl		5µl		35µl
CD61-PE	5µl	5µl		5µl		35µl
CD62E-PE	5µl	5µl		5µl		35µl
CD63-PE	5µl	5µl		5µl		35µl
CD62P-PE	5µl	5µl		5µl		35µl
CD144-FITC	5µl		5µl	5µl		35µl

Tab. 2: Pipettierschema der Probenansätze zur MP-Messung

3.2.4 Geräteeinstellung

Die Messung der MP erfolgte mit dem Durchflusszytometer FACScan TM.Cytometer (Firma Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) des Gerinnungslabors der Medizinischen Klinik III, Forschungslabor A, Klinikum Großhadern. Es handelt sich dabei um ein Fünfparameter-Durchflusszytometer, welches simultan Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht mit einem Argonlaser (15 mW bei λ=488nm) misst. Das Zellanalysegerät besitzt 1024 Kanäle zur

Signalauflösung, mit welchen vier Dekaden logarithmisch verstärkt gemessen werden können.

Die Proben wurden mit einer Geschwindigkeit von 60 µl/min für 1 min eingelesen. Um die gespeicherte Datenmenge nicht unnötig zu vergrößern, wurde im FSC eine Schwelle festgelegt, unter der die mitregistrierten Verunreinigungen und Luftblasen in den Proben nicht gespeichert wurden. Sowohl für den FSC als auch für den SSC wurde die logarithmische Darstellung gewählt.

3.2.5 Auswertung der Messungen

Zur Erstellung der MP-Analysemaske im Computerprogramm Cell-Quest™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) wurde im Vorfeld Plasmamessungen durchgeführt, um eine Abgrenzung der MP von der Thrombozytenpopulation zu erreichen. MP wurden in den durchflusszytometrischen Auswertungen mittels Vollblutmessungen definiert als Annexin V+ Ereignisse, die kleiner als Thrombozyten waren (< 1 µm). In dem in Abb. 9 mit R1 gekennzeichneten Bereich kommen in Abgrenzung zu den benachbarten Thrombozyten neben Zelldebris die MP zur Darstellung.

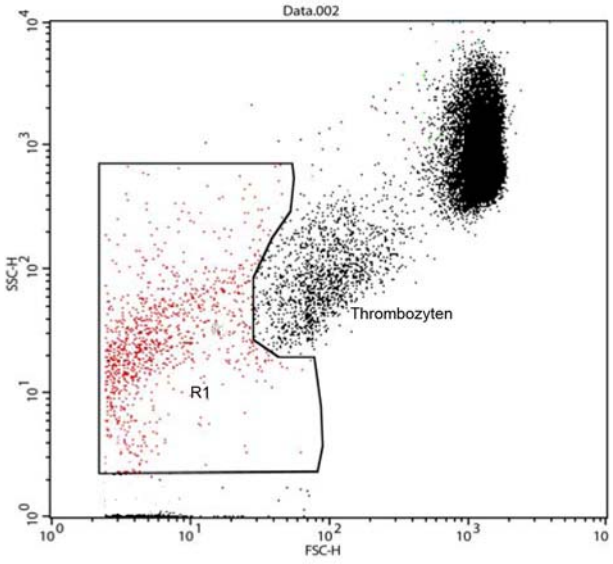


Abb. 9: Abgrenzung MP von Thrombozyten

Abb. 10 zeigt die von uns im Computerprogramm Cell-Quest™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) erstellte Analysemaske als SSC–FL1-, SSC–FL2- und FL2-FL1-Dotplot. Der mit R1 gekennzeichnete Bereich im ersten Dotplot aus Abb. 10 sowie die Region R1 des Dotplots aus Abb. 9 entsprechen sich.

FL1 stellt die auf Kanal 1 gemessene Fluoreszenzstärke des mit FITC markierten Annexin V bzw. des AK zur Identifikation der MP dar. Im Bereich der Region R2 des SSC–FL1-Dotplots (Abb. 10) finden sich die für Annexin V+ MP.

FL2 stellt die auf Kanal 2 registrierte Fluoreszenzstärke der mit PE gelabelten AK bzw. des mit PE markierten Annexin V dar. In der Region R3 des SSC–FL2-Dotplots (Abb. 10) kommen die für den entsprechenden Anti-CD-AK+ MP-Subpopulationen zur Darstellung.

In der im Dotplot FL2-FL1 mit UR gekennzeichneten Region (Abb. 10) sind sowohl die für Annexin V–FITC+ MP als auch für den jeweiligen Anti-CD-AK+ MP dargestellt. Diese wurden zur Berechung der MP-Konzentrationen herangezogen.

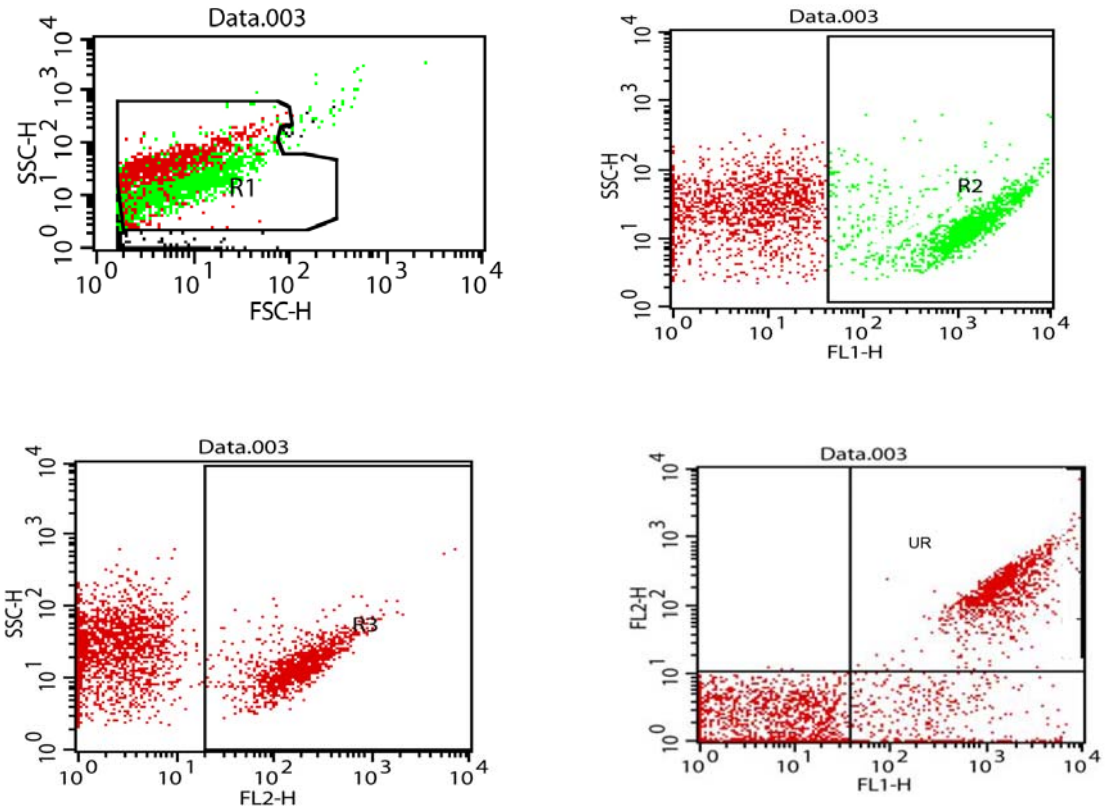


Abb. 10: MP-Analysemaske, Computerprogramm Cell-Quest™, USA

Die MP-Anzahlen/µl Plasma wurden entsprechend der folgenden Formel nach *Berckmans et al*. (11) ermittelt:

MP/l = N x (100 µl /5 µl) x (950/µl/V) x 106/250 µl)

- N = absolute MP-Anzahl der Probe (Upper Right-Region, UR-Region des FL2/FL1-Dotplots)
- 100 µl = Volumen der MP-Suspension pro Patientenprobe
- 5 µl = Pro Probenansatz verwendetes MP-Suspensionsvolumen
- 950 µl = Endvolumen der Probe vor Einlesen im Durchflusszytometer
- 250 µl = Plasmavolumen vor MP-Isolation
- V = Probeneinzug des Durchflusszytometers in µl/min

Um die tagesabhängigen Schwankungen des Probeneinzugs zu berücksichtigen, wurde täglich das Volumen bestimmt, welches pro Minute vom Durchflusszytometer eingezogen wurde. Hierbei wurde das Gewicht eines mit Aqua dest. gefüllten FACS-Röhrchen vor und nach eines zehnminütigen Probeneinzugs ermittelt und hieraus der tägliche FACS–Einzug (V) errechnet. Der so analysierte Probeneinzug lag zwischen 50 und 97 µl/min.

3.2.6 Ermittlung der Verdünnungsstufe von Antikörpern und Farbstoffen zur Detektion der MP

Für alle verwendeten AK und Farbstoffe wurden im Vorfeld Ag-AK-Bindungskurven erstellt, um so das Konzentrationsoptimum zu ermitteln, bei dem der Sättigungsbereich des jeweiligen AK erreicht wurde und im Durchflusszytometer eine konstante Anzahl an MP detektiert werden konnte. Dabei wurden die jeweiligen AK-Stammlösungen und Farbstoffe in aufsteigenden Verdünnungsstufen mit der Calciumpuffer-Arbeitslösung verdünnt.

3.2.6.1 Annexin V

Zum Nachweis der MP diente Annexin V. Es handelt sich um ein eigenfluoreszierendes Protein, welches vor allem im Bereich negativ geladener Phospholipide auf Zellmembranen bindet. Wir verwendeten Annexin V FITC und -PE gelabelt. Abb. 11 und Abb. 12 zeigen die Zahl der detektierten MP in Abhängigkeit von steigenden Annexin V-Verdünnungen in logarithmischer Darstellung (Annexin V-Stammlösung verdünnt mit Calciumpuffer). Ein stabiles Maximum bezüglich der MP–Zahlen zeigte sich bei einer Annexin V-FITC-Verdünnung von 1:10 (Abb. 12). Für alle Versuchsreihen wurde deshalb diese Verdünnungsstufe gewählt. Annexin V-PE wurde in der Verdünnungsstufe 1:20 verwendet (Abb. 11). Pro Probenansatz wurden jeweils 5 µl verwendet.

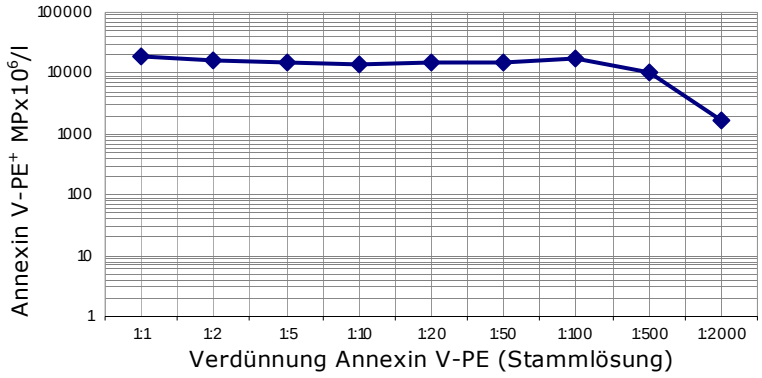


Abb. 11: Verdünnungskurve Annexin V-PE

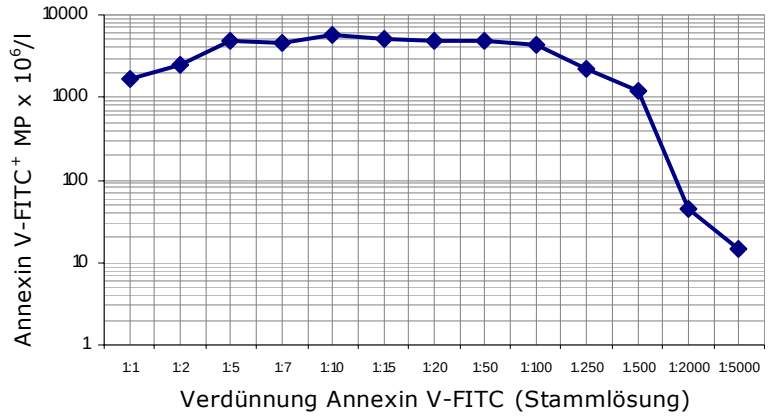


Abb. 12: Verdünnungskurve Annexin V-FITC

3.2.6.2 Anti-CD61-AK (Glycoprotein IIIa, β_3)

Zur Identifikation der PMP wurde der PE gefärbten AK gegen CD61 verwendet, der im Bereich des Fibrinogenrezeptors IIb/IIIa von Thrombozyten und von ihnen gebildeten MP bindet. Abb. 13 zeigt in logarithmischer Darstellung die Ag-AK-Bindungskurve von Anti-CD61-PE in Abhängigkeit verschiedener Verdünnungsstufen. Auffällig ist eine geringere Anzahl der MP bei einer niedrigen Verdünnungsstufe des AK (1:1). Dieser Effekt zeigte sich auch bei anderen von uns getesteten AK.

Der Anti-CD61-AK wurde in einer Verdünnung von 1:10 verwendet. Somit war ein deutlicher Abstand zu den Verdünnungsstufen gewährleistet, innerhalb derer es zu einem deutlichen Abfall der MP-Anzahlen kam (1:2; 1:15). Je Probenansatz verwendeten wir 5 µl der AK-Lösung.

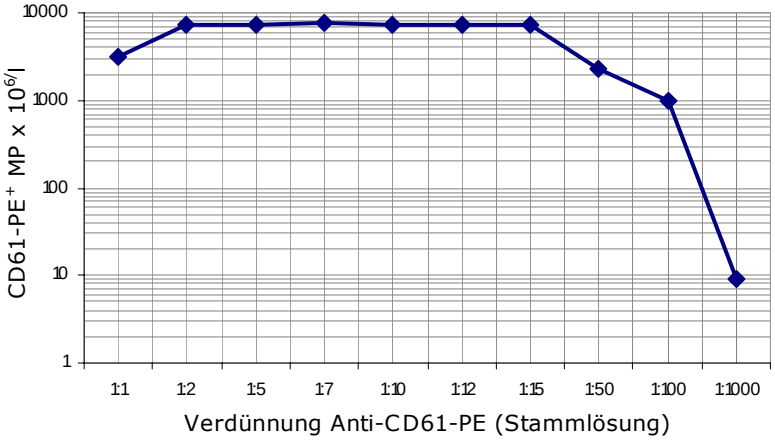


Abb. 13: Verdünnungskurve Anti-CD61-PE

3.2.6.3 Anti-CD62 (P-Selektin)

Zum Nachweis von MP aus aktivierten Thrombozyten wurde der PE markierte AK Anti-CD62P verwendet, der an das Glykoprotein P-Selektin im Bereich der Membranen von aktivierten Thrombozyten und von ihnen gebildeten MP bindet. Zur Ermittlung des Sättigungsbereiches des AK, bei der die höchste Anzahl aktivierter thrombozytärer MP gemessen werden konnte, erstellten wir die in Abb. 14 gezeigte AK-Bindungskurve. Ein stabiles Sättigungsniveau zeichnete sich bei AK-Verdünnungen von 1:5 bis 1:15 ab. Die höchsten MP-Zahlen wurden mit der Verdünnung von 1:10 erreicht. Für die folgenden Versuchsreihen wurde Anti-CD62P in einer Verdünnung von 1:10 verwendet. Je Probenansatz verwendeten wir 5 µl der AK-Verdünnungslösung.

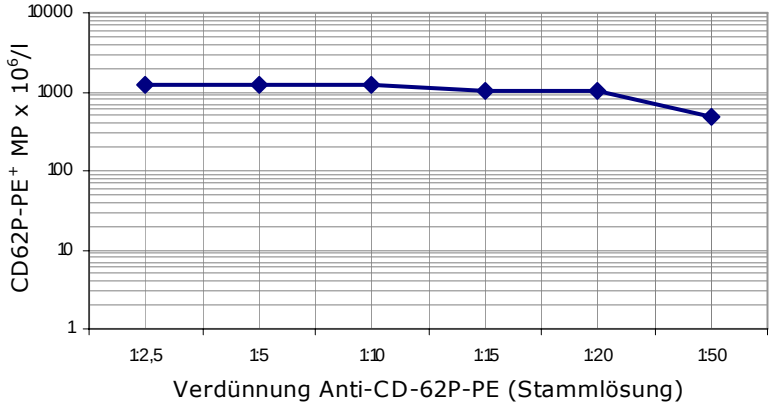


Abb. 14: Verdünnungskurve Anti-CD62P-PE

3.2.6.4 Anti-CD144 (VE-Cadherin)

Zum Nachweis von EMP wurde der AK Anti-CD144 in einer Verdünnung von 1:2 verwendet. Abb. 15 zeigt die Bindungskurve des AK. Ein sicheres Sättigungsplateau zeichnete sich unter Verwendung dieses AK nicht ab (Abb. 15). Ein Maximum der MP-Anzahl zeigte sich bei einer Verdünnung von 1:2. Für die weiterführenden Versuche wurde deshalb diese Verdünnungsstufe gewählt. Der AK konnte nur FITC markiert bezogen werden. Je Probenansatz wurden 5 µl der AK-Lösung verwendet.

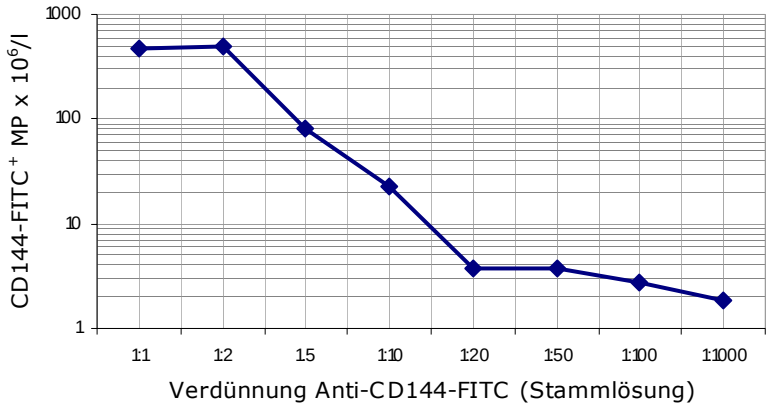


Abb. 15: Verdünnungskurve Anti-CD144-FITC

3.2.6.5 Anti-CD62 (E-Selektin)

Zum Nachweis von MP aktivierter EC wurde der PE gelabelte Anti-CD62E-AK verwendet, der selektiv an EC und an die von ihnen gebildeten MP bindet. Abb. 16 zeigt die Verdünnungskurve von Anti-CD62E-PE. Bei einer Verdünnung von 1:2 konnte die höchste MP-Anzahl gemessen werden, weshalb für die Versuche diese Verdünnungsstufe gewählt wurde. Je Probenansatz wurden 5 µl der AK-Lösung verwendet.

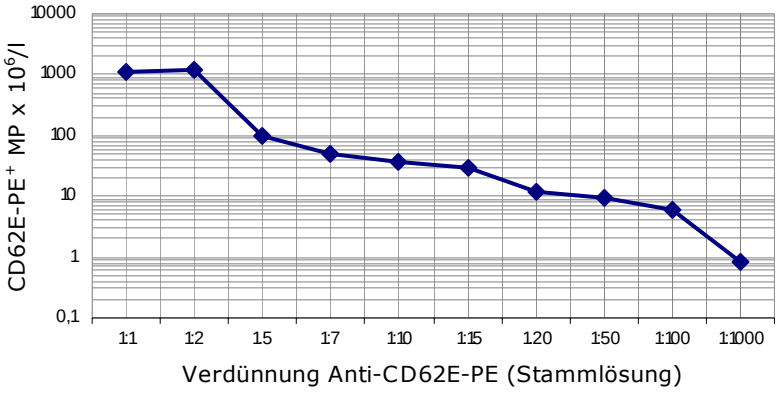


Abb. 16: Verdünnungskurve Anti-CD62E-PE

3.2.6.6 Anti-CD51 (Vibronectin-Rezeptor)

Abb. 17 zeigt die Verdünnungskurve von Anti-CD51-FITC. CD51 ist unter anderem im Bereich von EC, B-Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten nachweisbar. Anti-CD51 wird von einigen Forschergruppen zum Nachweis von endothelialen MP verwendet. In Abb. 17 ist die Verdünnungsreihe von Anti-CD51 dargestellt. Hier zeigt sich, dass wiederum ein sicheres Sättigungsplateau des AK nicht erreicht werden konnte. Wir verwendeten Anti-CD51 in einer Verdünnung von 1:1. In den Versuchen wurden 5 µl der AK-Lösung verwendet.

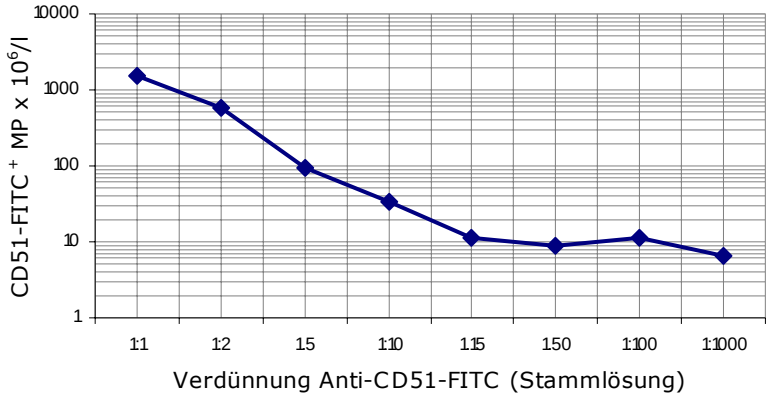


Abb. 17: Verdünnungskurve Anti-CD51-FITC

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika der Studiengruppe

52 Frauen der insgesamt 103 RSA-Studienpatientinnen erfüllten die Einschlusskriterien der Studie nicht:

- 8 Patientinnen zeigten eine heterozygote Mutation im FV-Gen (n=8)
- 3 Patientinnen zeigten eine heterozygote Mutation im FII G20210A-Gen (n=2)
- in 11 Fällen konnte eine homozygote Mutation im MTHFR C677T-Gen nachgewiesen werden (n=11)
- bei 9 Patientinnen lag ein APLS vor (n=9)
- in 6 Fällen waren die ANA erhöht (Titer >1:240) (n=6)
- bei jeweils einer Patientin lag ein von-Willebrand-Jürgens-Syndrom (n=1) sowie ein Lupus erythematodes (n=1) vor
- 13 Patientinnen waren unerwarteter Weise schwanger (4.-6. SSW) (n=13).

In der Kontrollgruppe erfüllten insgesamt 7 Frauen die Einschlusskriterien nicht:

- 2 Frauen zeigten eine homozygote Mutation im FV-Gen (n=2)
- 1 Frau zeigte eine heterozygote Mutation im FII G202010A-Gen (n=1)
- in 3 Fällen konnte ein APLS (n=3) sowie
- in einem Fall wurden erhöhte Leukozytenzahlen nachgewiesen (n=1).

Insgesamt wurden 51 Frauen in die Studiengruppe aufgenommen. Hiervon hatten 22 Frauen in der Vorgeschichte maximal 2 (RSA_2) und 29 Frauen 3 oder mehr Fehlgeburten erlitten (RSA_3). In die Kontrollgruppe wurden insgesamt 24 Frauen eingeschlossen.

Tab. 3 fasst die Daten der Studienpopulation zusammen. Die Frauen der RSA-Gruppe waren im Vergleich zur Kontrollgruppe jünger (RSA_2 versus Kontrollgruppe p=0.02; RSA_3 versus Kontrollgruppe p=0.05). Unterschiede hinsichtlich der Thrombozytenzahlen lagen in beiden Gruppen nicht vor.

Parameter	**RSA_2 (n=22)**	**RSA_3 (n=29)**	**Kontrollgruppe (n=24)**
Alter (in Jahren)	33.7±5.5*	34.5±6.0*	37.7±4.9*
Schwangerschaften	2.8±1.2*	4.2±1.1*	1.7±0.6*
Geburten	0.8±1.0*	0.6±0.7*	1.7±0.6*
Thrombozytenzahlen (G/L)	295±63	299±57	284±55
MP			
CD61+ (PMP)	5030 (2937-6890)	3930 (1629-7249)	3959 (2299-5936)
CD144+ (EMP)	999 (484-1837)	897 (544-1430)	683 (218-1544)
CD62E+ (EMP)	397 (220-530)	357 (148-563)	306 (193-680)

Tab. 3: Parameter der Studienpopulation; Daten präsentiert als Mittelwert **±** SD (Standardabweichung);(*P-Wert: p<0.05 signifikant). MP-Zahlen (x10^6/L) als Mittelwerte dargestellt (interquartiler Abstand)

Bei dem Großteil der Studienpatientinnen (RSA_2 und RSA_3) ereignete sich die Fehlgeburt in der Frühschwangerschaft, (vor bzw um die 12. Schwangerschaftswoche (SSW) (RSA_2: ≤ 12 SSW (n=15), > 12 SSW (n=2); sowohl ≤ als auch > 12 SSW (n=5). RSA_3: ≤ 12 SSW (n=21), sowohl ≤ als auch > 12 SSW (n=8)).

Bei 12 Frauen der Gruppe RSA_2 lag in der Anamnese keine erfolgreich abgeschlossene Schwangerschaft vor; in der Gruppe RSA_3 waren hiervon 17 Frauen betroffen. Im Vergleich hierzu war bei 10 Frauen der Gruppe RSA_2 und bei 17 Frauen der Gruppe RSA_3 eine erfolgreiche Schwangerschaft mit einer Lebendgeburt vorausgegangen (sekundäre RSA).

4.2 Annexin V positive (+) Mikropartikel

Vergleicht man die Konzentrationen an zirkulierenden Annexin V+ MP, so zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den RSA-Patientinnen und der Kontrollgruppe. Dennoch konnten bei 8 von 29 der RSA-Patientinnen mit 3 und mehr Aborten (RSA_3) und bei 2 von 22 Patientinnen mit 2 Aborten (RSA_2) erhöhte Konzentrationen von Annexin V+ MP (Konzentration >10.000 x 10^6/L) nachgewiesen werden im Vergleich zu einer Frau der Kontrollgruppe (p=0.038; Abb. 18). Die erhöhten MP-Anzahlen korrelierten nicht mit dem Alter, dem Menstruationszyklus, der Anzahl der Schwangerschaften oder Entbindungen, der Zahl der Früh- oder Spätaborte oder der Thrombozytenzahlen der Studienpatientinnen.

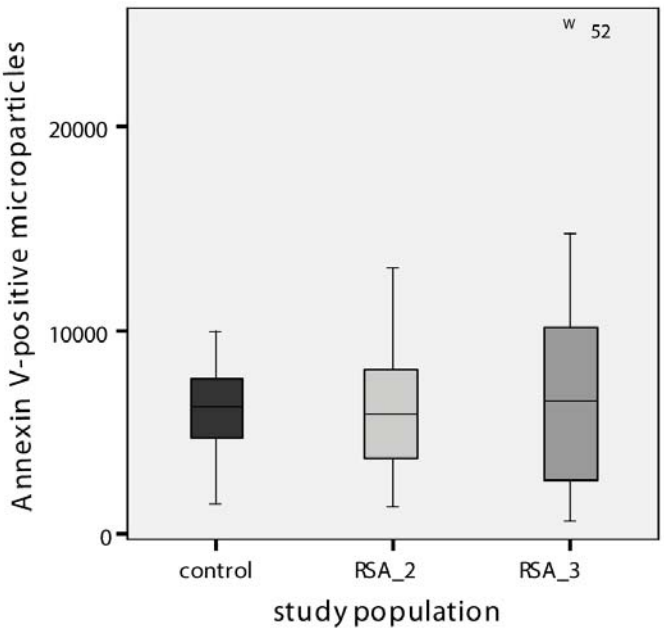


Abb. 18: Annexin V+ MP (x10^6/L) der Studienpopulation. Daten in Form eines Boxplots dargestellt. RSA_3: RSA-Patientinnen mit 3 und mehr Aborten; RSA_2: RSA-Patientinnen mit 2 Aborten. 52=RSA-Patientin, bei der die MP-Konzentration über dem Interquartilsabstand lag

Tab. 4 zeigt die Charakteristika der RSA-Patientinnen mit MP-Konzentrationen > 10.000 (x10^6/L).

RSA-Gruppe	Alter	Gravidität	Parität	RSA	≤ 12. SSW	> 12. SSW	Zyklusphase	Anzahl Thrombozyten	Annexin V+ MP
2	41	2	0	1	2	0	2	352	10453
2	31	2	0	1	1	1	3	226	13010
3	33	3	0	1	2	1	2	356	14800
3	29	3	0	1	3	0	2	313	24802
3	36	6	3	1	4	0	1	294	10314
3	41	6	1	2	5	0	2	289	14339
3	25	4	1	2	3	0	1	n.d.	11878
3	37	5	1	2	4	0	2	332	13813
3	36	4	0	1	3	0	1	356	13002
3	40	3	0	1	3	0	2	200	10184

Tab. 4: Charakteristika der RSA-Frauen mit MP >10.000 (x10^6/L)

Erläuterungen zu Tab. 4: RSA Gruppe: 2 = RSA_2, 3 = RSA_3; Gravidität = Anzahl der Schwangerschaften, Parität = Anzahl der Entbindungen; ≤ 12. SSW: Fehlgeburt vor/um 12. SSW, > 12. SSW: Fehlgeburt nach der 12. SSW. Menstruationszyklus: 1 = Follikelphase, 2 = Lutealphase, 3 = unbekannt. MP–Zahlen (x 10^6/L). Thrombozytenzahlen (x 10^3/L).

4.3 Thrombozytäre Mikropartikel

Sowohl die Konzentrationen von PMP (CD61+) als auch die Konzentrationen der von aktivierten Thrombozyten stammenden MP (CD62 P+, CD63+) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den RSA-Patientinnen und den Frauen der Kontrollgruppe. Die Konzentration der PMP korrelierten innerhalb jeder Studiengruppe mit der Anzahl der Annexin V+ MP ($p<0.001$).

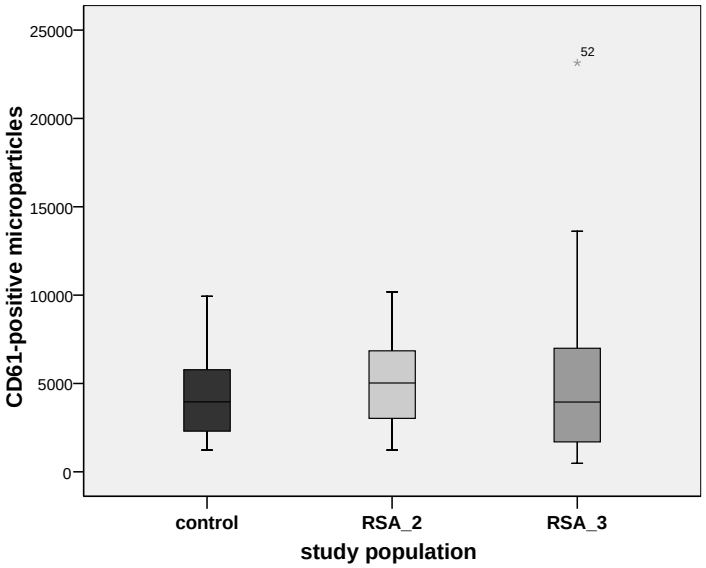


Abb. 19: CD61+ PMP ($x10^6$/L). Daten dargestellt als Boxplot. 52=RSA-Patientin, bei der die MP-Konzentration über dem Interquartilsabstand lag

4.4 Endotheliale Mikropartikel

Bezüglich der Konzentrationen von CD144+ und CD63E+ EMP bei den RSA-Patientinnen und der Kontrollgruppe zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Abb. 20 und Abb. 21 zeigen vergleichend die Anzahl der CD144+ EMP und CD62E+ EMP.

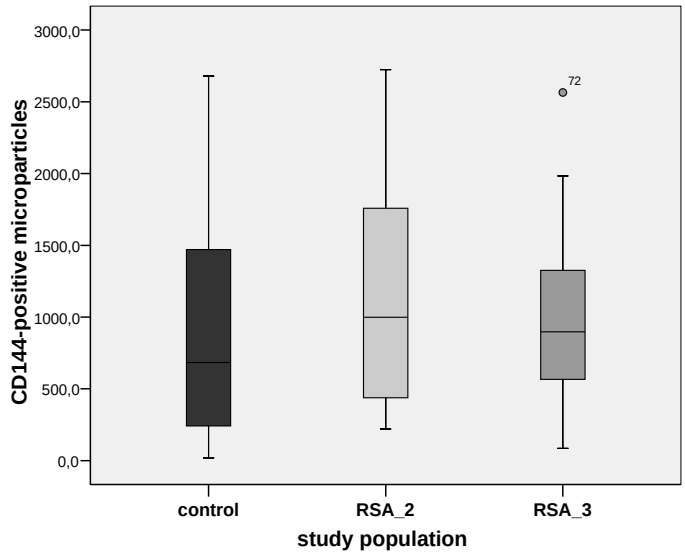


Abb. 20: CD144+ EMP (x10^6/L). Daten dargestellt als Boxplot. 72 = RSA-Patientin, bei der die MP-Konzentration über dem Interquartilsabstand lag

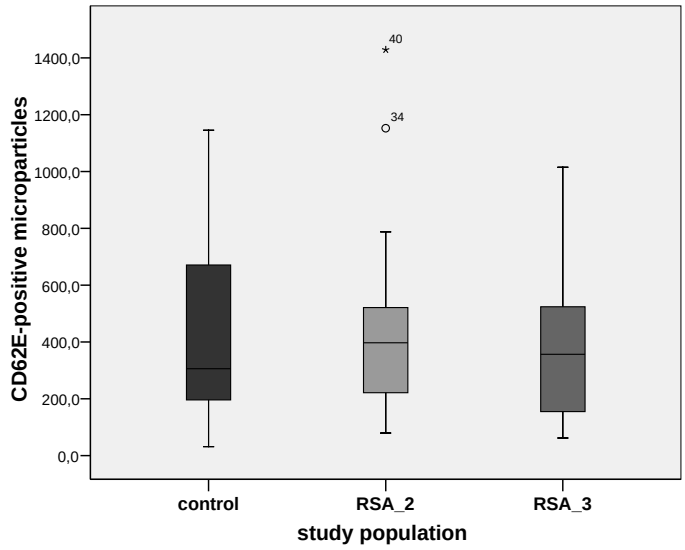


Abb. 21: CD62E+ EMP (x10^6/L). Daten dargestellt als Boxplot. 40 und 34 = RSA-Patientinnen, bei denen die MP-Konzentrationen über dem Interquartilsabstand lagen

4.5 Patientenkollektiv

Die derzeit verfügbare Literatur bezüglich RSA gestaltete sich sehr heterogen. Viele der Kontroversen beruhen auf der unterschiedlichen Einschätzung und Bewertung von Risikofaktoren für RSA und der sich hieraus ergebenden Therapieoptionen bzw. deren Effektivität. In Bezug auf das methodische Vorgehen (Definitionen, Ein- und Ausschlusskriterien etc.) innerhalb der unterschiedlichen Studien zeigt sich ebenfalls eine breite Varianz (28). Abb. 22 zeigt eine Reihe von Einflussgrößen, deren Standardisierung von Experten in Bezug auf Studien mit RSA in Zukunft gefordert wird. So ist derzeit unter anderem eine Definition von RSA innerhalb der Studienlandschaft nicht klar festgelegt. Viele Autoren schließen, entsprechend der Definition der WHO Frauen mit 3 und mehr konsekutiven Fehlgeburten vor der 20. SSW in ihre Studien ein. Demgegenüber favorisiert eine Reihe von Autoren auch den Einschluss von Frauen mit bereits 2 vorausgegangenen Aborten. In Anlehnung an diese Untersuchungen bildeten wir unser Studienkollektiv aus Frauen mit 2 und mehr vorangegangenen Spontanaborten, wobei 56,9% der Frauen zur Gruppe mit 3 und mehr und 43,1% zur Gruppe mit lediglich 2 Aborten zählten. Möglicherweise ist in dieser Gruppe allerdings das Risiko eines erneuten Aborts nur geringfügig erhöht, da für das Abortgeschehen eventuell nur sporadisch aufgetretene chromosomale Mutationen ursächlich gewesen sein könnten. Durch den Einschluss derartiger Patientinnen könnte somit die Aussage hinsichtlich des Einflusses des untersuchten Risikofaktors verfälscht sein (28).

Methodologic factors to evaluate in studies of recurrent pregnancy loss.

Factor to evaluate	Effect on study outcome
Definition of RPL as >2 miscarriages	Decreases difference in frequency of factor studied in CCS or treatment effect in RCT
Ascertainment bias	Increases prevalence of factor studied
Selection of controls	Increases difference in prevalence of factor studied in CCS or treatment effect in RCT
Advanced age of patients	Increases recurrence of RPL
Uneven monitoring of two cohorts studied	Increases difference in prevalence of factor
Historical controls	Increases treatment effect in treatment trials
Poor characterization of miscarriage and subgroups of RPL	Renders comparisons between studies and meta-analyses difficult
Premature termination after interim analysis	Decreases or increases treatment effect in RCT
Inclusion after detection of fetal heart action	Decreases treatment effect in RCT
No exclusion of aneuploid abortuses	Decreases treatment effect in RCT

Note: RPL = recurrent pregnancy loss; CCS = case–control studies; RCT = randomized control trials.

Christiansen. Management of recurrent pregnancy loss. Fertil Steril 2005.

Abb. 22: Kontroverse Einflussgrößen innerhalb RSA-Studien (28)

In unseren Untersuchungen konnten wir lediglich bei 19,6% (n=10) der RSA-Patientinnen erhöhte MP-Anzahlen nachweisen. Innerhalb dieser Subgruppe gehörten etwa 80% der Patientinnen der Gruppe mit 3 und mehr Aborten an. Obwohl in unseren Untersuchungen die Mehrzahl (n=19; 65,5%) der RSA-Patientinnen mit 3 und mehr Aborten keine erhöhten MP-Anzahlen aufwiesen, sollte dieser Aspekt in folgenden MP-Studien nochmals Berücksichtigung finden und anhand eines größeren Kollektivs bei Frauen mit 3 und mehr Aborten erneut überprüft werden.

In Bezug auf die bei Paaren mit RSA durchgeführte Diagnostik existieren ebenfalls unterschiedliche Empfehlungen und Vorgehensweisen, weshalb es auch hier einer Standardisierung bedarf. Abb. 23 zeigt empfohlenen Untersuchungen bei RSA und deren Bewertung innerhalb verschiedener Studien.

Recommended investigations of recurrent pregnancy loss patients.

Investigation	Documentation
Hysterosalpingography or hysteroscopy or sonohysterography	A
Karyotyping of the couple	A
Thyroid hormones	A
Androgens, LH, FSH in patients with irregular menstruations	B
APTT-/dRVVT/lupus anticoagulant	A
IgG and IgM anticardiolipin antibodies	A
Factor V Leiden mutation	A
Mannan-binding lectin	B
Maternal HLA-G and HLA-DR types	B

Note: A = value documented in many studies; B = value suggested in few but large studies; APTT = activated partial thrombin time; dRVVT = dilute Russel's viper venom time.

Christiansen. Management of recurrent pregnancy loss. Fertil Steril 2005.

Abb. 23: Diagnostik bei Paaren mit RSA (28)

Wir rekrutierten unser Patientenkollektiv aus der Spezialsprechstunde für Frauen mit RSA aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Klinikums Großhadern. Eine Abklärung der Patientinnen hinsichtlich endokriner, anatomischer und z. T. genetischer Ursachen war im Rahmen dieser Sprechstunde bereits erfolgt. Bei etwa 41% der Studienpatientinnen lag im Abortgewebe ein unauffälliger Karyotyp vor. Bei 6% der Patientinnen konnten Aneuploidien nachgewiesen werden. In 47% lag uns keine genetische Untersuchung des embryonalen Gewebes vor. Hinsichtlich chromosomaler Veränderungen der Paare war bei 45% eine unauffällige genetische Testung erfolgt. Bei 55% der Paare lag uns keine genetische Testung vor.

Wie bereits dargelegt, ist die Inzidenz chromosomaler Auffälligkeiten bei Paaren mit RSA mit nur 4,7% sehr gering. Da allerdings derartige Veränderungen in Studien als eindeutig kausal für RSA bewertet wurden (28), sollte in folgenden Untersuchungen eine genetische Abklärung der Paare mit RSA im Vorfeld erfolgen.

Genetische Auffälligkeiten im embryonalen Gewebe scheinen bei RSA im Vergleich zu sporadischen Aborten eine eher untergeordnete zu spielen. *Ogasawara et. al*. konnten zeigen, dass mit steigender Anzahl an Fehlgeburten die Inzidenz chromosomaler Aberrationen im embryonalen Gewebe abnahm (78). In Untersuchungen von *Carp et al.* hatten Frauen mit nachgewiesener Aneuploidie im Abortgewebe eine bessere Prognose hinsichtlich einer

Lebendgeburt in einer folgenden Schwangerschaft im Vergleich zu Frauen mit genetisch unauffälligem Abortgewebe (23).

In unserer Studie wurden Frauen mit RSA untersucht. Geht man also davon aus, dass bei RSA andere Faktoren als chromosomale Veränderungen im embryonalen Gewebe für die wiederholten Fehlgeburten verantwortlich sind, so bleibt zu diskutieren, ob der Nachweis genetischer Auffälligkeiten im Abortgewebe als Ausschlusskriterium aus RSA-Studien gewertet werden soll. Dies sollte nochmals vor dem Hintergrund der Tatsache beleuchtet werden, dass ein Nachweis einer Aneuploidie in einem Abort nicht als Erklärung für die zuvor oder noch folgenden Fehlgeburten herangezogen werden kann (120). Trotz allem ist eine genetische Untersuchung des Abortgewebes in Bezug auf eine Abschätzung der Prognose für weitere Schwangerschaften und das ggf. frühzeitige Einleiten weiterführender diagnostischer Maßnahmen und möglicher Therapien durchaus zu befürworten (23).

4.6 Auswahl der Antikörper

4.6.1 Nachweis von Mikropartikeln mittels Annexin V

Annexin V gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die hauptsächlich im Bereich von negativ geladenen Phospholipiden binden. Ursprünglich wurde Annexin V als *placental anticoagulant protein I* bezeichnet. Es handelt sich um ein Calcium-abhängiges, eigenfluoreszierendes Protein, welches *in vivo* antikoagulatorische Eigenschaften besitzt. Annexin V ist unter anderem auf der Oberfläche von Thrombozyten, Endothelzellen und Trophoblastzellen lokalisiert und übernimmt dort eine wichtige Funktion in der Regulation der Hämostase.

Annexin V weist im Vergleich zu Gerinnungsfaktoren (FVa) eine etwa 1000-fach stärkere Bindung an PS auf (5)(105). Es entfaltet seine antikoagulatorischen Eigenschaften durch Blockade von PS, wodurch Gerinnungsfaktoren nicht mehr an dieses binden und dadurch aktiviert werden können.

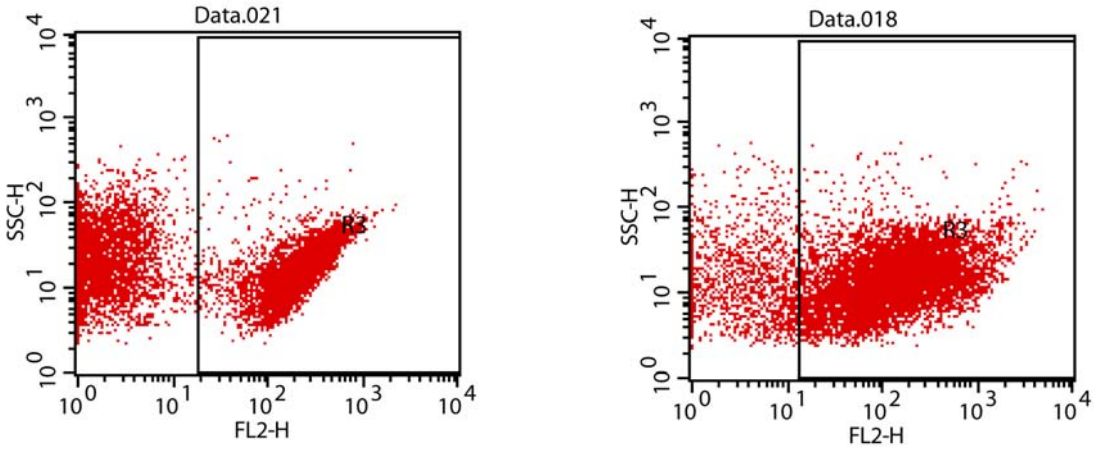
MP sind in der Lage, an Annexin V zu binden und dieses zu neutralisieren. Annexin V wird in der Plazenta vor allem im Bereich des Syncytiotrophoblasten gebildet und besitzt dort eine entscheidende Funktion in der Abwehr von prokoagulatorischen Effekten. Durch seine hohe Affinität zu PS wirkt es als

kompetitiver Inhibitor in Bezug auf die Bindung im Bereich von prokoagulatorischem PS (119).

Rand et al. konnten zeigen, dass Annexin V im Bereich von Plazentazotten bei Frauen mit RSA weitaus geringer vorhanden war, als bei Frauen mit normalem Schwangerschaftsverlauf (88). Ein möglicher Erklärungsansatz für RSA in diesem Zusammenhang wäre, dass MP durch die Beeinträchtigung der Annexin V-Funktion im Bereich des intervillösen Raumes die Abwehrmechanismen desselben reduzieren und zusammen mit den physiologischen prokoagulatorischen Veränderungen in der Schwangerschaft unter anderem zu Schädigungen des Syncytiotrophoblasten, zu Plazentainfarkten und Aborten führen.

PS findet sich bei vitalen Zellen auf der intrazellulären Seite der Zytoplasmamembran. Im Rahmen der Zellaktivierung gelangt PS an die Membranaußenseite, woran Annexin V binden kann.

Da MP unter anderem durch Zellaktivierung gebildet werden und sie auf ihrer extrazellulären Membranseite Strukturen der Ursprungzelle aufweisen, findet sich auf ihrer Oberfläche auch Annexin V. Aus diesem Grund eignet sich das mit Farbstoffen markierte Annexin V zum Nachweis von MP. Wir verwendeten Annexin V in erster Linie FITC markiert, da sich hiermit, nach vergleichenden Untersuchungen mit PE gelabeltem Annexin V, die MP-Populationen besser vom übrigen Zelldebris abgrenzen ließen (Abb. 24). Beim Färben der MP mittels Anti-CD-AK, die nur mit FITC markiert bezogen werden konnten, verwendeten wir Annexin V-PE.



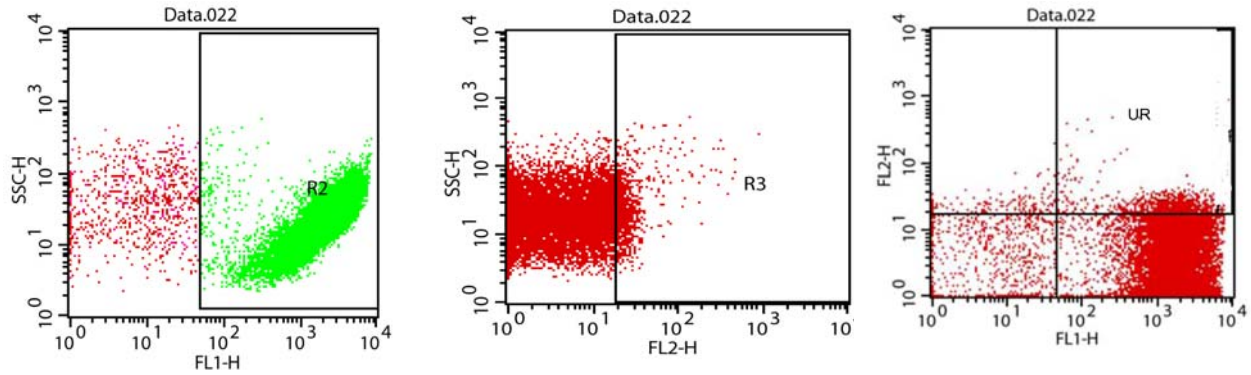
Annexin V-FITC markierte MP (R3)

Annexin V-PE markierte MP (R3)

Abb. 24: Vergleich von Annexin V-FITC und Annexin V-PE hinsichtlich der besseren MP-Abgrenzung von Zelldebris

In Untersuchungen von *Horstmann et. al.* konnte mittels Annexin V nur ein Teil der von aktivierten EC stammenden EMP nachgewiesen werden. Unter Verwendung von Anti-CD62E wurden im Vergleich zur Markierung mit Annexin V 35-fach höhere EMP-Zahlen gemessen (51). Die Forschergruppe schloss daraus, dass lediglich ein geringer Prozentsatz der EMP Annexin V auf der Oberfläche binden konnte und Annexin V somit zu deren Nachweis nicht geeignet war.

Die Auswahl von Annexin V für unsere Versuchsreihen erfolgte vor dem Hintergrund, dass das für die Annexin V-Bindung entscheidende PS als wesentlicher Membranbaustein im Bereich aller MP-Membranen vorhanden ist und Annexin V somit als Marker aller MP dient. Verglichen wir unsere EMP-Gesamtzahlen mit den Angaben aus der Literatur (56), so entsprachen diese den von uns ermittelten Werten. Die von *Horstmann et al.* vorgenommene alleinige Verwendung von Annexin V als Fluoreszenzfarbstoff zur Subtypisierung der MP ist nach unserer Auffassung fragwürdig. Ein sichereres Nachweisprinzip wäre unseres Erachtens die von uns vorgenommene Doppelt-Markierung sowohl mit Annexin V als auch mit dem entsprechenden, für die jeweilige MP-Subgruppe charakteristischen Anti-CD-AK.



Annexin V+ MP (R2) | CD62E+ MP (R3) | Annexin V+MP/CD62E+ MP (UR)

Abb. 25: Schaubild der allein für Annexin V+ MP (R2), der nur für CD62E+ MP und der sowohl für Annexin V+ MP als auch für CD62E+ MP (UR)

4.6.2 Identifikation thrombozytärer Mikropartikel: Antikörper gegen CD41 und CD61

Die Bildung von PMP ist abhängig von einem intakten Glykoprotein IIb/IIIa-Komplex und einer Bindung von Fibrinogen. Während der Plättchenaktivierung erfährt der Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor eine Konformationsänderung, die die Bindung von Fibrinogen ermöglicht. Fibrinogen vermittelt die Thrombozytenaggregation, indem es nebeneinander liegende Plättchen über den GP IIb/IIIa-Rezeptor miteinander verbindet. Die entscheidende Stelle innerhalb des Fibrinogens mit dem es an den GPIIb/IIIa-Rezeptor bindet, ist die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD). Durch Zugabe von monoklonalen AK gegen RGD bzw. gegen GP IIb/IIIa (A2A9, 7E3, PAC1) zu aktivierten Thrombozyten gelingt es, die Bildung von MP zu blockieren (41).

Untersuchungen bei Patienten mit Glanzmann-Naegeli Thrombasthenie, einer seltenen autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung mit verminderter Anzahl bzw. vollständigem Verlust des GP IIb/IIIa-Rezeptors und einer daraus resultierenden erhöhten Blutungsneigung, zeigen eine eingeschränkte Fähigkeit der MP-Bildung (41). In Untersuchungen hinsichtlich der Oberflächenbeschaffenheit von PMP konnte mit Hilfe von AK gegen den GP IIb/IIIa-Komplex der Nachweis erbracht werden, dass diese MP ebenfalls den Fibrinogenrezeptor auf ihrer Oberfläche trugen (53).

Zum Nachweis von PMP testeten wir im Vergleich die AK Anti-CD61 und Anti-CD41, die beide im Bereich des Glykoproteins IIb/IIIa des Fibrinogenrezeptors von Thrombozyten und den von ihnen gebildeten MP binden. Zirka 90% der Annexin V+ MP waren ebenfalls positiv für den Anti-CD61-AK, was zu übereinstimmenden Ergebnissen mit der Literatur führte. Deshalb ist davon auszugehen, dass es zu keinen Interaktionen des Anti-CD61-AK mit Annexin V im Sinne einer Verklumpung der Farbstoffe kam. Der Anti-CD41-AK zeigte im Vergleich eine deutlich schwächere Bindung am Fibrinogenrezeptor (Mittelwert der mit CD41 markierten MP-Anzahlen: $1{,}9 \times 10^9$/l; Mittelwert der mit CD61 markierten MP-Anzahlen: $5{,}1 \times 10^9$/l). Unter Verwendung von Anti-CD41-AK konnten im Vergleich bei ein und derselben Studienperson durchschnittlich nur 37% der PMP detektiert werden, die mit Anti-CD61 nachgewiesen werden konnten. Somit ist im Rahmen unserer Untersuchungen mit Anti-CD61 ein besserer Nachweis der PMP möglich. Die Abgrenzung der mit Anti-CD61-AK

markierten MP-Population vom übrigen Zelldebris gelang im Vergleich zur Markierung mit Anti-CD41-AK besser, weshalb in den weiteren Untersuchungen der AK Anti-CD61 verwendet wurde. Unter Berücksichtigung der Konzentrationsbestimmungen verwendeten wir den PE-markierten AK in einer Konzentration von 1:10.

4.6.3 Identifikation aktivierter thrombozytärer Mikropartikel: Anti-CD63 und Anti-CD62P (P-Selektin)

Anti-CD63 und Anti-CD62P sind AK, die an aktivierte Thrombozyten und deren MP binden. Die in ruhenden Thrombozyten enthaltenen α-Granula werden bei Aktivierungsvorgängen exozytiert, wobei Anti-CD62P an das in der Membran der α-Granula verankerte und durch den Aktivierungsvorgang an die Membranoberfläche gelangte Glykoprotein P-Selektin binden kann. P-Selektin konnte ebenfalls innerhalb der sog. Weibel-Palade-Körperchen im Bereich von EC nachgewiesen werden (13)(68). Im Falle einer Aktivierung des Endothels durch Thrombin oder andere Mediatoren kommt es zu einer schnellen Verlagerung des P-Selektins an die Zelloberfläche. P-Selektin fungiert sowohl auf Plättchen als auch auf EC in erster Linie als Adhäsionsprotein für Leukozyten. Der Nachweis von P-Selektin als zirkulierendes Protein in der Peripherie gelingt im Bereich der Phospholipid-Membranen von MP oder, in sehr geringen Mengen, in freier ungebundener Form (36). Erhöhte Werte für die lösliche Form des P-Selektins waren vermehrt nachweisbar bei Patienten mit artheriosklerotischen Gefäßveränderungen (91).

In vergleichenden Untersuchungen hinsichtlich der antigenen Strukturen von EMP und PMP zeigte sich, dass nur auf thrombozytären MP P-Selektin eindeutig nachweisbar war und im Bereich von EMP ein Binden von Anti-CD62P nicht statt fand (2).

Der Anti-CD63-AK bindet an das Glykoprotein 53 (CD63; lysosome-associated membran protein 3), eine antigene Struktur im Bereich thrombozytärer Lysosomen. Unter dem Einfluss bestimmter Mediatoren, die eine Thrombozytenaktivierung zur Folge haben, wird CD63, vergleichbar dem P-Selektin, auf die Membranaußenseite verlagert. Dementsprechend hat sich Anti-CD63 ebenfalls als thrombozytärer Aktivitätsmarker etabliert. In Analysen bezüglich der Proteinstrukturen von endothelialen Palade-Weibel-Körperchen konnte neben P-Selektin und dem von Willebrandfaktor (vWF) auch CD63 nachgewiesen werden (118). Damit ist nicht ausgeschlossen, dass bei Messungen mit Anti-CD63 auch aktivierte Endothelzellen oder deren MP detektiert werden.

Untersuchungen bezüglich der Expression von CD63 im Bereich von EMP und PMP sind derzeit nicht verfügbar. Durch die Tatsache allerdings, dass MP

Proteinstrukturen ihrer Ursprungszellen tragen, ist CD63 möglicherweise sowohl auf der Oberfläche von PMP als auch EMP vorhanden. Somit wäre eine eindeutige Abgrenzung der beiden MP-Subpopulationen mittels Anti-CD63 nicht möglich.

Van der Zee et al. führten *in vitro* Versuche durch, hinsichtlich des Vorkommens von P-Selektin und CD63 auf PMP von unstimulierten und stimulierten Thrombozyten sowie auch von PMP aus Plasmaproben von Patienten mit stabiler Angina Pectoris, periphere arterieller Verschlusskrankheit oder Myokardinfarkt (67). In Vorversuchen (2) verglichen sie die Ag-Expression von PMP und EMP hinsichtlich des Vorkommens von P-Selektin und konnten in diesem Fall eine Kreuzreaktionen mit EMP ausschließen.

Um nachzuweisen, dass mit AK gegen CD63 selektiv aktivierte PMP nachgewiesen werden können, wären vergleichende Untersuchungen hinsichtlich des Vorkommens von CD63 auf EMP und PMP erforderlich.

4.6.4 Nachweis endothelialer Mikropartikel durch Anti-CD144-Antikörper

Die Bedeutung von VE-Cadherin (CD144) liegt darin, dass es selektiv im Bereich interzellularer Verbindungen von EC vorkommt. Dort trägt es wesentlich zur Zelladhäsion zwischen einzelnen EC bei. Des Weiteren kommt CD144 eine entscheidende Rolle in der Regulation der interzellularen Permeabilität zu (17).

Um nachzuweisen, dass VE-Cadherin auch selektiv im Bereich von EMP vorkommt und demnach deren spezifischen Nachweis garantiert, untersuchten *Joop et al.* durchflusszytometrisch die Ag-Strukturen von MP die von EC, Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten gebildet wurden (56). Ihre Ergebnisse zeigten, dass CD144 ausschließlich auf EMP nachzuweisen war, womit etwaige Kreuzreaktionen mit anderen MP-Subpopulationen ausgeschlossen werden konnten.

Anti-CD144 erweist sich demnach als geeigneter AK, um endotheliale MP spezifisch zu detektieren.

4.6.5 Identifikation aktivierter endothelialer Mikropartikel: Anti-CD62E-Selektin und Anti-CD51

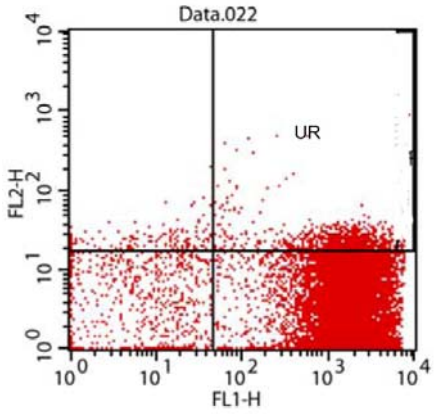
E-Selektin gehört zu einer Reihe von endothelialen Adhäsionsmolekülen, die einerseits in gelöster Form im Plasma vorkommen, andererseits aber auf der Oberfläche des Endothels nachzuweisen sind. Sie vermitteln unter anderem die reversible Bindung von Leukozyten im Rahmen von entzündlichen Vorgängen im Bereich endothelialer Strukturen und erleichtern so die Zytokin-vermittelte Migration von Entzündungszellen in die Gefäßwand. *Abid Hussein et al*. verglichen in Untersuchungen die Ag-Strukturen von aktivierten und ruhenden EC und den von ihnen gebildeten EMP. Dabei konnte E-Selektin ausschließlich im Bereich aktivierter EC-Kulturen und den von ihnen gebildeten MP nachgewiesen werden (2). Demzufolge kann mit AK gegen CD62E ein selektiver Nachweis von MP aus aktivierten EC *ex vivo* erbracht werden.

Einige Forschergruppen verwendeten zum Nachweis endothelialer MP AK gegen den Vitronectin-Rezeptor (CD51), der sich unter anderem im Bereich von EC, B-Lymphozyten, Monozyten und Plättchen nachweisen lässt. In Untersuchungen von *Minagar et al*. zeigten sich im Plasma von Patienten mit Multipler Sklerose erhöhte Anzahlen an EMP. Dabei waren bei Patienten mit akuter Exacerbation der Erkrankung vor allem EMP erhöht, die positiv für CD31 (PECAM-1) waren, während bei Patienten in Remission vor allem CD51+ EMP nachweisbar waren (71). In Untersuchungen von *Abid Hussein et al.* war CD51 sowohl auf EMP als auch auf PMP kaum nachweisbar (2).

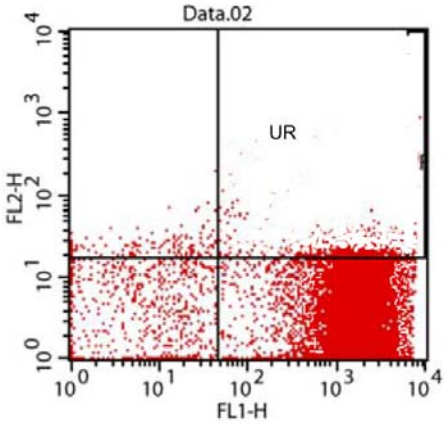
Unter Berücksichtigung der uneinheitlichen Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass bei der Verwendung von Anti-CD51 die selektive Bestimmung von EMP erschwert möglich ist.

Im Rahmen unserer Messungen war sowohl mit Anti-CD51 als auch mit Anti-CD62E keine sichere Abgrenzung der EMP-Populationen vom übrigen Zelldebris möglich (Abb. 26). Die sich bei unserer Datenauswertung ergebenden EMP-Zahlen stimmten jedoch bei der Verwendung von Anti-CD62E mit entsprechenden Angaben in der Literatur überein. Im Hinblick darauf, dass in vergleichenden Messungen bezüglich der Bindungseigenschaften von Anti-CD51 und Anti-CD62E in unserem Labor bei der Verwendung von Anti-CD51 der Sättigungsbereich zusätzlich nicht erreicht werden konnte, sich bei der

Verdünnungskurve von Anti-CD62E jedoch eine Sättigungstendenz abzeichnete, entschlossen wir uns zur Verwendung des PE-markierten Anti-CD62E-AK.



Annexin V+/CD62E+ MP (UR)



Annexin V+/CD51+ MP (UR)

Abb. 26: Vergleich der Abgrenzung von EMP (CD62E+ MP und CD51+ MP) von Zelldebris

Zusammenfassend gelingt der Nachweis von EMP mit den hierfür derzeit verfügbaren AK eher erschwert. Die Ergebnisse der verschiedenen Forschergruppen bezüglich der EMP-Zahlen sind uneinheitlich. In einem Vergleich von mit Anti-CD62E markierten EMP aus EC-Kulturen und der entsprechenden Negativkontrolle mit IgG war in Untersuchungen von *Joop et al.* die Fluoreszenzstärke der mit dem AK gefärbten EMP nur geringfügig stärker als die der Negativkontrolle (56).

Horstmann et. al. konnten unter Verwendung des gleichen AK 35-fach höhere EMP-Zahlen im Vergleich zu entsprechenden Kontrolluntersuchungen nachweisen (51). Die Ursache der differierenden Forschungsergebnisse scheint nicht allein in der Wahl der AK zu liegen. Abhängig von z. B. der Zentrifugationsdauer des Plasmas zur Herstellung von PPP ergaben sich unterschiedliche Messergebnisse. Untersuchungen zeigten, dass bei einer 2-minütigen Zentrifugation mit 13.000x g lediglich 80% aller MP sedimentierten. Anderer Untersuchungen wiederum konnten nachweisen, dass es, unabhängig von der Dauer der Zentrifugation, nicht möglich ist, 100% der MP aus dem Plasma zu extrahieren, da manche MP sich hinsichtlich ihrer Dichte nicht vom Plasma unterscheiden ließen (51). Vergleicht man die in der Literatur angegebenen unterschiedlichen Messtechniken zur MP-Bestimmung, hat sich als Referenzmethode die FACS-

Analyse etabliert. In einigen Untersuchungen allerdings wird zu MP-Bestimmung die ELISA-Technik herangezogen (79), die keine Aussage bezüglich der MP-Quantität zulässt. Hiermit ist ein Vergleich der Ergebnisse der ELISA- und FACS-Methode hinsichtlich der sich ergebenden MP-Konzentrationen nicht möglich. Es bedarf deshalb einer einheitlichen Standardisierung bezüglich der Probengewinnung (Blutabnahme), Probenaufarbeitung (Zentrifugation), Messtechnik sowie Auswertung der Messergebnisse.

4.7 Expression von zirkulierenden Mikropartikeln bei RSA-Patientinnen

In den vorliegenden Untersuchungen ergaben sich bezüglich der MP-Konzentrationen bei Frauen mit RSA im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede. Allerdings konnte in einer Subgruppe von Patientinnen mit RSA erhöhte MP-Konzentrationen nachgewiesen werden. Um ein eventuell erhöhtes prokoagulatorisches Potential dieser MP *in vivo* bzw. *in vitro* zu überprüfen, wurde von einem Teil unserer Arbeitsgruppe Untersuchungen zur Bestimmung von Prothrombin-Fragment 1+2 (F 1+2) – Nachweis der Thrombinbildung *in vivo* - sowie zur Thrombinbildungkapazität mittels Thombin-Generation-Assay (TGA) – Nachweis der Thrombinbildung *in vitro* - durchgeführt. Bei den RSA-Patientinnen mit 3 und mehr Spontanaborten war die Konzentration an Prothrombin 1+2 höher (163,2±59,3 (104-261) pmol/L) im Vergleich zu den RSA-Patientinnen mit 2 Aborten (146,3±45,8 (87-244) pmol/L) und zu den Frauen der Kontrollgruppe (151,5± 55,1 (104-261) pmol/L), ohne dass jedoch signifikante Unterschiede auftraten. In Bezug auf die Thrombinbildung *in vitro* (TGA) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Studiengruppen.

Zur Differenzierung der Thrombinbildung über die extrinsische- bzw. intrinsische Gerinnungskaskade wurden selektive AK verwendet: Anti-FXI und Anti-FXII zur Hemmung des intrinsischen- und Anti-FVII zur Hemmung des extrinsischen Gerinnungspfades. Eine vorherige Inkubation mit Anti-FVIIa führte nicht zu einer Inhibierung der Thrombinbildung. Dies legt die Vermutung nahe, dass in unserem Studienkollektiv der Mechanismus der Thrombinbildung über den Weg der extrinsischen Gerinnungskaskade eine untergeordnete Rolle spielte. Eine Inkubation mit Anti-FXIa führte hingegen zu einer signifikanten Hemmung der Thrombinbildung. Dies zeigte sich am deutlichsten in der Subgruppe der RSA-Patientinnen mit MP-Konzentrationen >10.000 ($x10^6$/L) (p=0,001), so dass bei diesen Patientinnen die Thrombinbildung möglicherweise vom Weg der intrinsischen Gerinnungskaskade mit Aktivierung von FXI abhängt (110).

Diese Vermutung wird unterstützt durch Untersuchungen zur prokoagulatorischen Aktivität von MP (124). Die durch Stimulierung von EC aus humanen Nabelschnurvenen mit TNFa gewonnen MP konnten dabei bezüglich ihrer Thrombinbildungskapazität durch Inhibierung mittels Anti-TF-AK (VIC7) nur

unwesentlich beeinträchtigt werden. Die intrinsische Aktivierung des Gerinnungssystems (sog. Kontaktaktivierung) setzt unter anderem das Vorhandensein negativ geladener Oberflächenstrukturen voraus. Hieran kann FXII binden, woraus dessen Aktivierung resultiert. FXIIa spaltet als Komplex mit Präkallikrein FXI. FXIa aktiviert FIX zu FIXa, der zusammen mit FVIIIa den sog. intrinsischen Tenasekomplex bildet. Dieser setzt im weiteren Verlauf der Gerinnung FX zu FXa um.

Die negativ geladenen Phospholipide finden sich als PS und PC auf der Oberfläche von MP, worüber die Aktivierung der intrinsischen Gerinnungskaskade erfolgen könnte. Das Vorhandensein hoher Konzentrationen von MP, und somit hoher Konzentrationen an PS und PC, würden demnach eine erhöhte Fähigkeit zur Aktivierung des Gerinnungssystems implizieren. *Sugimura et al*. konnten zeigen, dass die Injektion von negativ geladenen Phospholipiden in schwangere Mäuse zu Thrombosen im Bereich des Plazentabettes sowie zur Reduktion des Geburtsgewichts der Jungtiere führte (104). Da wir in unseren Untersuchungen keinen Zusammenhang zwischen der Konzentration an MP und einer prokoagulatorischen Neigung *in vivo* oder *in vitro* herstellen konnten, liegt für uns die Überlegung nahe, dass MP bei Frauen mit RSA möglicherweise zusätzlich über andere pathophysiologische Veränderungen als über die Beeinträchtigung des Gerinnungssystems in die feto-maternale Integrität eingreifen.

Fehlgeburten bei zugrundeliegender thrombophiler Störung werden unter anderem auf thrombotische Geschehen im utero-plazentaren Gefäßbett zurückgeführt. Bei einigen RSA-Patientinnen wurden vermehrte Fibrinablagerungen im intervillösen Raum der Plazenta beschrieben (46)(87). Die RSA-Patientinnen unserer Studiengruppe waren zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses nicht schwanger. Möglicherweise stellen MP bei RSA ein chronisches Phänomen dar, im Sinne einer erworbenen Thrombophilie, welche eventuell erst im Rahmen einer eingetretenen Schwangerschaft klinisch manifest wird. Um diesen Sachverhalt zu klären, sind weiterführende Untersuchungen in Bezug auf MP und deren prokoagulatorische Kapazität bei RSA-Patientinnen im Rahmen einer Schwangerschaft erforderlich. Möglicherweise würden diese RSA-Patientinnen dann von einer low-dose-Heparinisierung und/oder einer Therapie mit Aspirin während der Schwangerschaft profitieren.

Im Unterschied zu den Untersuchungen durch *Carp et al.* konnten wir weder erhöhten CD144+ EMP noch erhöhte MP-Anzahlen von aktivierten EC (CD62E) bei Frauen mit RSA im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen (25). *Carp et. al.* kombinierten zum Nachweis der EMP monoklonale AK gegen CD51 und CD31. In Untersuchungen hinsichtlich der antigenen Eigenschaften von EMP und EC konnte gezeigt werden, dass deren Oberflächenmoleküle häufig stark differierten. So war Anti-CD31 ein geeigneter Marker zum Nachweis von EC und PMP, nicht jedoch zur Detektion von EMP, auf denen CD31 kaum nachweisbar war (2).

Hinsichtlich der Verwendung von Anti-CD51 zum Nachweis von EMP liegen ähnliche Ergebnisse vor. In zwei voneinander unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass CD51 auf verschieden Arten von EC nachzuweisen war, jedoch kaum auf den von ihnen gebildeten MP (2)(55). Der geeignete Nachweis endothelialer MP aus Plasmaproben mit vorwiegend PMP mittels der AK Anti-CD31/Anti-CD51 scheint somit vor diesem Hintergrund fragwürdig.

In den Untersuchungen von *Laude et al.* gelang der Nachweis eines signifikanten Unterschiedes hinsichtlich der MP-Konzentrationen bei Frauen mit RSA im Vergleich zur Kontrollgruppe (61). Wir konnten dies in unseren Untersuchungen nicht nachvollziehen.

RSA-Patientinnen zeigen eine erhöhte Prävalenz hinsichtlich hereditärer Thrombophilien (20)(46). Bei Untersuchungen in Bezug auf den Zusammenhang von prokoagulatorischen MP und RSA setzt dies im Vorfeld ein Screening der Studienteilnehmerinnen auf eventuelle angeborenen oder erworbenen Thrombophilien voraus. Eine Diagnostik bezüglich der häufigsten Gerinnungsstörungen in Zusammenhang mit RSA wurde von *Laude et al*. nur teilweise durchgeführt (lediglich Ausschluss von APLS). Die differierenden Ergebnisse in Bezug auf die Höhe der MP-Konzentrationen in unseren Untersuchungen im Vergleich zu denjenigen von *Laude.et.al.* könnten somit ihre Ursache im Studieneinschluss von Frauen mit nichterkannter Thrombophilie sowie der Verwendung unterschiedlicher MP-Nachweismethoden haben, wodurch sich falsch hohe MP-Konzentrationen in den Untersuchungen von *Laude et. al.* ergeben haben könnten.

5 Zusammenfassende Schlussfolgerung und Ausblick

RSA liegt ein multifaktorielles Geschehen zugrunde. Ziel dieser Arbeit war es, unter Fokussierung auf Aspekte innerhalb möglicher Veränderungen des Gerinnungssystems bei Frauen mit RSA durch Beleuchtung eines neuen, möglichen Risikofaktors einen weiteren Erklärungsansatz für RSA zu liefern.

In unseren Untersuchungen von RSA-Patientinnen konnten wir keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf zirkulierende MP-Konzentrationen im Vergleich zu Frauen der Kontrollgruppe nachweisen. Lediglich in einer Subgruppe der RSA-Patientinnen zeigten sich erhöhte Konzentrationen von Annexin V+ MP. Das prokoagulatorische Potential dieser MP in Bezug auf die Thrombinbildung *in vivo* und *in vitro* zeigte ebenso keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Studiengruppen. Entscheidend in diesem Zusammenhang ist, dass sich die Bedeutung von MP nicht allein auf Veränderungen hinsichtlich einer vermehrten Gerinnbarkeit beschränken. Vielmehr scheinen MP auf vielfältige andere Prozessabläufe bezüglich Endothelfunktionen, Angiogenese, Entzündungsprozesse sowie interzellulärem Transport und Austausch Einfluss zu nehmen (29). Hinsichtlich deren Rolle in Bezug auf die pathophysiologischen Abläufe bei RSA-Patientinnen kann deshalb nur weiter spekuliert werden. Eine ungestörte embryonale sowie plazentare Entwicklung setzt eine Vielzahl von reibungsfreien Abläufen in Bezug auf die Angiogenese und endotheliale Funktion voraus. Möglicherweise greifen MP in einen oder mehrere der genannten Abläufe ein, die zu einer Beeinträchtigung der embryonalen und fetalen Entwicklung führen. Um derartige (patho-) physiologischen Vorgänge weiter zu erforschen, sind weiterführende Untersuchungen zu MP-Konzentrationen und der Bedeutung von zirkulierenden MP in der normalen und gestörten Schwangerschaft erforderlich.

6 Literaturverzeichnis

(1) Abalovich M, Gutierrez S, Alcaraz G, Maccallini G, Garcie A, Levale O. Overt and subclinical hypothyroidism complicating pregnancy. Thyroid 2002;12:63-68

(2) Abid Hussein MN, Meesters EW, Osmanovic N, Romijn FP, Nieuwland R, Sturk A. Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo. J Thromb Haemost 2003;1:2434-43

(3) Aktuelle Leitlinien der DGGG und AWMF

(4) Andoh A, Tsujikawa T, Hata K, et al. Elevated circulating platelet-derived microparticles in patients with active inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2005;100(9):2042-8

(5) Andree HA, Hermes WT, Hernker HC, Willems GM. Displacement of factor Va by annexin V. In:Andree HA, editor. Phospholipid binding and antikaogulant action of annexin V. Maastricht. The Netherlands: Universitaire Pers Maastricht; 1992.p.73-85

(6) Aoki K, S Kajiura, Y Matsumoto, M Ogasawara, S Okada; Y Yagami, N Gleicher: Preconceptional natural-killer-dell activity as a predictor of miscarriage. Lancst 1995; 345:1340-1342

(7) Aupeix K, Hugel B, Martin T et. al. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. J Clin Invest 1997;99(7):1546-1554

(8) Barry OP, Prarico D,Lawson JA, Fitzgerald GA. Transecellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet micropartixcles. J Clin Invest 1997;99(9):2 118-2127

(9) Barry OP, Pratico D, Savani RC, Fitzgerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. J Clin Invest 1998;102(1):136-144

(10) Basse F, Gaffet P; Bienvenue A. Correlation between inhibition of cytoskeleton proteolysis and anti-vesikulation effect of calpeptin during A23187-induced activaton of human platelets: are vesicles shed by filopod fragmentation? Biochim Biophys Acta 1994;1190(2):217-224

(11) Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN et. al. Cell derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. Thromb Haemost 2001;85(4):639-64

(12) Berckmans RJ, Nieuwland R, Tak PP, Boing AN, Romijn FP, Kraan M, Breedveld FC, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles from synovial fluid of inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependet mechanism. Arthritics Rheum 2002;46(11):2857-2866

(13) Bonfanti R, Furie BC, Furie B, Wagner DD. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. Blood

1989;73:1109-1112

(14) Brach DW, T Flint Porter, MJ Paiodas, MA Belfort, B Gonik: Obstetric uses of intravenous immunoglobulin: Successes, failures and promises. J Allergy Clin Immunol 2001;108:133-138

(15) Brenner B. Haemostatic changes in pregnancy.Thromb Res 2004;114(5-6):409-14

(16) Bretelle F, Sabatier F, Desprez D, et al. Circulating microparticles: a marker of procoagulant state in normal pregnacy and pregnancy complicated by preeclampsia or intrauterine growth restriction. Thromb Haemost 2003;89(3):486-92

(17) Breviario F, Caveda L, Corada M, Martin-Padura I, Navarro P, Golay J, Introna M, Gulino D, Lampugnani G, Dejana E. Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin -5), an endothelial –specific cadherin. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15(8):1229-39

(18) Brigham SA.,Conlon C,Farquharson RG. A longitudinal study of pregnancy outcome following idiopathic recurrent miscarriage. Hum. Reprod 1999; 14:2868-7

(19) Buchholz T, Lohse P, Rogenhofer N, Kosian E, Pihusch R, Thaler CJ. Polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes are associated with recurrent spontaneous miscarriages. Human Reprod. 2003;18(11):2473-7

(20) Buchholz T, Thaler CJ. Inherited thrombophilia:impact on human reproduction.Am J Reprod Immunolo 2003;50(1):20-32

(21) Buloetti C, Flamigni E, Giacomucci E: Reproductive failture due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. Human Reprod 1996;2:118-136

(22) Carp H, Dolizky M, Tur-Kaspa I, Inbal A. Heriditary thrombophilias are not associated with a dcrease live birth rate in women with recurrent miscarriage. Fertil Steril 2001; 75:678-682.

(23) Carp H, Toder V, Aviram A, Daniely M, Mashiach S, Barkai G. Karyotype of abortus in recurrent miscarriage. Fetil Steril 2001, 75:678-82.

(24) Carp H, Toder V, Torchinsky A, Portuguese S, Lipitz S, Gazit E, et al. Allogenetic leukocyte immunization after five or more miscarriages. Recurrent Miscarriages Immunotherapie Trialista Group. Hum Peprod 1997;12:250-5.

(25) Carp, H., et al., Prevalence of circulating procoagulant microparticles in women whith recurrent miscarriage: a case-controlled study. Hum. Reprod, 2004. 19(1):p.191-5

(26) Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R et al. P-Selektin induces the expression of tissue factor on monocytes. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91(19):8767-8771

(27) Chironi G, Simon A, Hugel B, Del Pino M, Gariepy J, Freyssinet JM, Tedgui A. Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis

burden in asymptomatic subjects. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Dec;26(12):2775-80

(28) Christiansen OB, Andersen AMN, Bosch E, Daya S, Delves PJ, Hviid TV, Kutteh WH, Laird SM, Li TC, van der Ven K. Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss Fertil Steril 2005;83(4), 821-839.

(29) Coleman ML, Sahai EA, Yeo M et. al. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. Nat Cell Biol 2001;3(4):339-345

(30) Combes V, Simon AC, Grau GE et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant

(31) Coulam CB. Unexplained recurrent pregnancy loss:epilogue.Clin Obstet Gynecol 1986;29:999-1004.

(32) Daniel L, Fakhouri F, Joly D, Mouthon L, Nusbaum P, Grunfeld JP, Schifferli J, Guillevin L, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. Kidney Int. 2006 Apr;69(8):1416-23

(33) De Braekeler M, Dao TN. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses Hum Reprod 1990;5:519-28

(34) Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, Arnoux D, Anfosso F, Bardin N, Veit V, Combes V, Gentile S, Moal V, Sanmarco M, Sampol J. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. Thromb Haemost. 2004 Apr;91(4):667-73

(35) Dudding TE, Attia J. The association between adverse pregnancy outcomes and maternal factor V Leiden genotype: a meta-analyse. Thromb Haemost 2004;91:700-711

(36) Dunlop LC, Skinner MP, Bendall LJ et al. Characterization of GMP-140 (P-Selektin) as a circulating plasma protein. J Exp Med 1992;175:1147-50

(37) Empson M, M Lassere, JC Craig, JR Scott: Recurrent pregnancy loss with Antiphopholipid antibody:systematic review of therapeutic trials. Obstet Gynecol 2002; 99:135-144

(38) Fourcade O, Simon MF, Viode C et al. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatic acid in membrane microvesicles shed from activated cels. Cell 1995;80(6)919-927

(39) Fox JE, Austin CD, Boyles Jk, Steffen PK. Role of membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane. J Cell Biol 1990;111(2):483-493

(40) Fox JE. The platelet cytoskeleton. Thromb Haemost 1993; 70(6):884.893

(41) Gemmell CH, Sefton MV, Yeo EL. Platelet-derived microparticle formation

involeves glycoprotein IIb-IIIa. Inhibition by RGDS and a Glanzmann´s thrombasthenia defect. J Biol Chem 1993; 268(20):14586-14589

(42) Geschlechtsspezifische und menstruationszyklusabhängige Unterschiede in der Expression von Mikropartikeln

(43) Gilbert GE, Sims PJ, Wiedmer T et al. Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII. J Biol Chem 1991;266(26):17261-17268

(44) Gonzalez-Quintero VH, Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman L, O´Sullivan JM, Ahn YS. Elevated plasma endothelial microparticles in preeklampsie. Am J Obstet Gynecol 2003;189(2):589-593

(45) Greer IA, Haemostasis and thrombosisi in pregnancy. In:Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, editors. Haemostasis and thrombosis, 3rd. ed. Edinburgh:Curchill Livingstone; 1994.p.987-1015

(46) Greer IA. Thrombophilia:implications for pregnancy outcome.Thromb Res 2003;109(2-3):73-81

(47) Greer, I.A., Procoagulant microparticles: new insights and opportunities in pregnancy loss? Thromb Haemost, 2001;85(1):3-4

(48) Harlow FH, Brown MA, Brighton TA, Smith SL, Trickett AE. Kwan Yl et al. Platelet activation in the hypertensive disorders of pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2002;187:1686-93

(49) Hirahara F, Andoh N, Sawai K, Hirabuki T, Uemura T, Minaguchi H. Hyperprolactinemic recurrent miscarriage and results of randomized bromocriptine treatment trials. Fertil Steril 1998; 70:246-252

(50) Hoffman M, Monroe DM, Roberts HR. Coagulation faktor IXa binding to activated platelets and platelet-derived microparticles: a flox cytometric study. Thromb Haemost. 1992;68:74

(51) Horstmann LL, Jy W, Jimenez JJ, Ahn YS: Endothelial microparticles as marker of endothelial dysfunction. Front Biosci 2004;9:1118-1135

(52) Horstmann Ll, Jy W, Jimenez JJ., Bidot C, Ahn YS. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. Keio J Med 2004;53(4).210-30

(53) Hughes M, Hayward CPM, Warkentin TE, Horsewood P, Chorneyko KA, Kelton JG. Morphological analysis of mikroparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia. Blood 2000;96(1):188-194

(54) Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N. Evidence-based guidelines for investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. Human Reprod 2006; 21:2216-2222.

(55) Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. Endothelialcells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. Thromb Res 2003:109(4):175-80

(56) Joop K, Berckmanns RJ, Nieuwland R et al. Microparticles from patients with multiple organ dysfunktion syndrom and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. Thromb Haemost 2001;85(5):810-820

(57) Kiprov DD, Nachtigall RD, Weaver RC, Jacobson A, Main EK, Garovoy MR. The use of intravenous immunoglobulin in recurrent pregnancy loss associated with combined alloimmune and autoimmune abnormalities. AJRI 1996;36:228-234.

(58) Knijff-Dutmer EA; Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, van de Laar MA. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2002;46(6):1498-503

(59) Krikun G, Lockwood CJ, Wu XX, Zhou XD, Guller S, Calandri C, et al. The expression of the placental anticoagulant protein, annexin V, by villous trophoplasts, immunolocalization and in vitro regulation. Placenta 1994;15:601-12

(60) Kujovich JL. Thrombophilia and pregnancy complications. AJOG 2004; 191:412-24

(61) Laude, I., et. al., Circulating procoagulant microparticles in women with unexlained pregnancy loss: a new insight. Thromb.Haemost, 2001. 85(1):p.18-21

(62) Lee YL, Jy W, Horstmann LL, Janania J, Reyes Y, Kelley RE, Ahn YS. Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. Thromb Res 1993;72:295-304

(63) Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckermann E, Laird S. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. Human Reprod. Update 2002;8:463-481

(64) Lorant DE, Zimmermann GA, McIntyre TM, Prescott SM. Platelet-activating factor mediates procoagulant activity on the surface of endothelial cells by promoting leukocyte adhesion. Semin Cell Biol 1995;6(5):295-303

(65) Maekawa M, Ishizaki T, Boku S et. al. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM.kinase. Science 1999;285(5429):895-898

(66) Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. Circulation. 2000 Feb 29;101(8):841-3

(67) Mark van der Zee P, Biro E, Ko Y, de Winter RJ, Hack CE, Struk A, Nieuwland R. P-Selektin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripherial disease and myocardial infarction. Clin Chem 2006;52(4):657-64

(68) McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. J Clin Invest 1989;84:92-99

(69) Menge S, Müller-Lantzsch C, Keck C, Tempfer C. Habituelle Aborte – ein aktueller Überblick über Ursachen und therapeutische Möglichkeiten. Geburtsh Frauenheil 2004;64:574-583

(70) Mesri M, Altieri DC. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. J Immunol 1998;161(8):4382-4387

(71) Minagar A, Jy W; Jimenez JJ, Sheremata WA, Mauro L M, Mao WW, Horstmann LL, Ahn YS. Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. Neurology 2001;56; 1319-1324

(72) Miyazaki Y, Nomura S,Miyake T et al. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles . Blood 1996; 88(9): 3456-3464

(73) Miyoshi H, Umeshita K, Sakon M et al. Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. Gastroenterology 1996; 110(6):1897-1904

(74) Nieuwland R, Berckmanns RJ, McGregor S, Böing AN, Romijin FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. Blood 2000;95:930-5

(75) Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveed-Eijkman RC Maquelin KN, Roozendaal KJ, Jansen PG et al. Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. Circulation 1997;96(10):3534-41

(76) Nomura S, Komiyama Y; Miyake T et al. Amyloid beta-protein precursor-rich platelet microparticles in thrombotic disease. Thromb Haemost 1994; 72(4):519-522

(77) Nomura S, Yanabu M; Kido H et al. Antiplatelet autoantibody-related microparticles in patients with idiopathic (autoimmune) thrombocytopenic purpura. Ann Hematol 1991;62(4):103-107

(78) Ogasawara M, Aoki K, Okada S; Suzumori K. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. Fertil Steril 2007;73:300-4.

(79) Osumi K, Ozeki Y, Saito S, Nagamura Y, Ito H, Kimura Y, Ogura H, Nomura S: Development and assessment of enzyme immunoassay for platelet-derived micropaticles. Thromb Haemost 2001; 85:326-330

(80) Patel KD, Zimmermann GA, Prescott SM, McIntyre TM. Novel leukocyte agonists are released by endothelial cells exposed to peroxide. J Biol Chem 1992;267(21):15168-15175

(81) Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo L, Perez C, Saez C, Panes O, Matus V, Mezzano D. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. Thromb Haemost. 2006 Jan;95(1):94-9.

(82) Pitney WR, Dacie JV. A simple method of studying the generation of thrombin in recalcified plasma. J Clin Pathol 1953;6:9

(83) Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM et al. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. Hypertension 2003;41(2):211-217

(84) Preston, F.E. Rosendaal, F.R., Walker, I.D., et al. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia.Lancet.1996 Oct 5;348(9032):913-6

(85) Quenby SM., Farguharson RG. Predicting recurring miscarriage: what is important? Obstet Gynecol 1993; 82: 132-8

(86) Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. Lancet 2006 Aug 12;368(9535):601-11

(87) Rai R, Tuddenham E, Backos M, Jivraj S, El`Gaddal S, Choy S, et al. Thromboelastography, wholeblood haemostasis and recurrent miscarriages. Hum Reprod 2003;18(12):2540-3

(88) Rand JH, Wu XX, Guller S, Gil J, Guha A, Scher J, et al. Reduction of annexin V (plazental anticoagulant protein-I) on placental villi of women with antiphospholipid antibodies and recurrent spontaneous abortion. Am J Obstet Gynecol 1994;171:1566-72

(89) Reginald PW, Beard RW, Chappel J: Outcome of pregnancies processing beyond 28 weeks gestation in women with a history of recurrent miscarriage. Br J Obstet Gynecol 1994;643-648

(90) Rey E, Kahn SK, David M, Shier I: Thrombophilic disorders and fetal loss: am metaanalysis. Lancet 2003;361:901-908.

(91) Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Solubel P-Selektin and risk of future cardiovascular events. Circulation 2001;103:491-5

(92) Roque H, Paidas MJ, Funai EF, Kuczynski E, Lockwood CJ. Maternal thrombophilias are not associated with early pregnancy loss. Thromb Haemost 2004; 91, 290-295.

(93) Sanson BJ, Friederich PW, Simioni P, Zanardi S, Hilsman MV, Girolami A, ten Cate JW, Prins MH.The risk of abortion and stillbirth in antithrombin-, protein C-, and protein S-deficient women. Thromb Haemost. 1996;75:387-388

(94) Satta N, Toti F, Feugeas O et al.Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. J Immunol 1994;153(7):3245-3255

(95) Schecter AD, Spim B, Rossikhina M et al. Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells. Circ Res 2000;87(2):126-132

(96) Scott JR, Branch WD. Immunology of early pregnancy loss. Contemporary Ob/Gyn 1998;43:40-56.

(97) Sims PJ, Faioni EM, Wiedemer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. J Biol Chem 1988;263(34):18205-18212

(98) Sims PJ, Wiedemer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to the vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. J Biol Chem 1989;264(29):17049-17057

(99) Smiley PL, Stremler KE, Prescott SM, Zimmermann GA, McIntyre TM. Oxidatively fragmented phosphatidylcholines activate human neutrophils through the receptor for platelet-activating factor. J Biol Chem 1991;266(17):11104-11110

(100) Stern JJ, Dorfmann AD, Gutierez-Najar MD. Frequency of abnormal karyotype among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion. Fertil Steril 1996;65:250-3.

(101) Stirling Y, Wolf L, North WR, Seghatachi MJ, Meade TW. Haemostasis in normal pregnancy. Thromb Haemost 1984; 52:176-82

(102) Stirrat GM., Recurrent miscarriageI: Definition and epidemiology. Lancet 1990; 336:673-8

(103) Stray-Pederson B, Stray-Pederson S. Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. Am J Obstet Gynecol 1984;148: 140-146.

(104) Sugimura, M., et al., Annexin V inhibits phosphatidylserin-induced intrauterine growth restriction in mice. Placenta, 1999.20(7):555-60

(105) Sun J, Bird P, Salem HH: Interactionof annexin V and platelets: effects on platelets function and protein S binding: Thromb Res 1993;69:289-96

(106) Tans J, Rosing J, Thomassen MC et al. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles. Blood 1991;77(12):2641-2648

(107) Tate DA, Bode AP, Nichols TC, Dehmer GJ. Platelet activation detected by platelet-derived microparticles in coronary sinus blood from patients with unstable coronary syndromes. Circulation 1992;86:3193 A

(108) Taube J, McWilliam N, Luddington R, Byrne CD, Baglin T. Activated protein C resistance: effect of platelet activation, platelet-derived microparticles, and atherogenic lipoproteins. Blood 1999;93(11):3792-3797

(109) Toth B, Lok CA, Boing A, Diamant M, van der Post JA, Friese K, Nieuwland R. Microparticles and exosomes: impact on normal and complicated pregnancy. Am J Reprod Immunol. 2007 Nov;58(5):389-402

(110) Toth B, Nieuwland R, Kern M, Rogenhofer N, Berkmans R, Rank A, Lohse P, Friese K, Thaler, Ch. J.Systemic changes in haemostatic balance are not

associated with increase levels of circulating microparticles in women with recurrent spontaneous abortion. AJRI 2008;59:159-166

(111) Toth B., Liebhardt S., Steinig K., Ditsch N., Rank A., Spannagl M., Bauerfeind I., Friese K., Reininger, A
Platelet-derived microparticles and coagulation activation in breast cancer patients.Thrombosis Haemostasis, in Revision befindlich

(112) Triolo G, Ferrante A, Cicca F, Accardo-Palumbo A et al. . Randomized study of subcutaneous low molecular weight heparin plus aspirin versus intravenous immunoglobulin in the treatment of recurrent fetal loss associated with antiphospholipid antibodies. Artritis and rheumatism Vol.48,No. 3 March 2003, pp 728-31

(113) Van Dunne FM, Doggen CJ, Heemskerk M, Rosendaal FR, Helmerhorst FM. Factor V Leiden mutation in relation to fecundity and miscarriage in women with venous thrombosis. Hum Reprod 2005;20, 802-806.

(114) Van Wijk MJ, Svedas E, Boer K, Nieuwland R et al. Isolated microparticles, but not whole plasma, from women with preeklampsie impair endothelium-dependet relaxation in isolated myometrial arteries from healthy pregnant women. Am J Obstet Gynecol 2002;187(6):1686-1693

(115) Van Wijk, MJ, et al., Microparticles in cardiovascular diseases. Cardiovascular Research 59 (2003) 277-287

(116) Vanitier D, Dufour P, Cosson M, Houpeau JL: Antiphospholipid syndrome and recurrent miscarriages Europe J Obstet Gynecol Reprod Biol 2001;96:37-50

(117) Varadi K, Siekmann J, Turecek PL,Schwarz HP, Marder VJ. Phospholipid-bound tissue factor modulates both thrombin generation and APC-mediated factor Va inactivation. Thromb Haemost 1999;82:1673-1679

(118) Vischer UM, Wagner DD. CD63 is a component of Palade-Weibel bodies in human endothelial cells. Blood 1993;15;82(4)1184-19

(119) Wang, X., et al., Annexin V is critical in the maintenance of murine placental integrity. Am J Obstet Gynecol, 1999, 180(4):1008-16

(120) Warburton D, Kline J, Stein Z, Hutzler M, Chin A, Hassold T. Does the karyotype of a spontaneous predict the karyotype of a subsequent abortion? Am J Hum Genet 1987;41:465-83.

(121) Wiedemer T, Sims PJ. Participation of protein kinases in complement C5b-9- induced shedding of platelet plasma membrane vesicles. Bloood 1991; 78(11):2880-2886

(122) Wölfler MM, S Rimbach: Morphologische Ursachen als Faktor beim habituellen Abort. Gynäk Endokrin 2005; 3:18-24

(123) Yano Y, Kambayashi J, Shiba E et al. Tha role of protein phosphorylation and cytoskeletal reorganisation in microparticle formation from theplatelet

plasma membrane. Biochem J 1994; 299(Pt1):303-308

(124) Zielosko, Annett: Kontinuierliche Messung der zellgetriggerten Thrombinbildung – Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität von Zellen, Fachbereich Pharmazie, Philipps-Universität Marburg, 2003

(125) Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phopholipid asymmetry in blood cells. Blood 89:1121-1132, 1997

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in

Systemic changes in haemostatic balance are not associated with increased levels of circulating microparticles in women with recurrent spontaneous abortion

Bettina Toth, Rienk Nieuwland, Meike Kern, Nina Rogenhofer, Rene Berckmans, Andreas Rank, Peter Lohse, Klaus Friese, Christian Thaler. Am J Reprod Immunol. 2008 Feb;59 (2):159-66.

7 Danksagung

Für die Übernahme der vorliegenden Dissertation an der medizinischen Fakultät der LMU sowie für die Überlassung des Themas und die Betreuung bedanke ich mich vielmals bei Frau PD Dr. med. Bettina Toth.

Für die Möglichkeit der Nutzung der Laborräume im Frauenforschungslabor des Klinikums Großhadern danke ich Herrn Prof. Dr. med. K. Friese.

Für die Bereitstellung der Laborräume sowie der Laborgeräte im Forschungslabor A der Medizinischen Klinik III des Klinikums Großhadern sowie für die Betreuung insbesondere zu Beginn dieser Arbeit möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Andreas Rank bedanken.

Insgesamt möchte ich unserer gesamten Arbeitsgruppe meinen Dank aussprechen. An dieser Stelle sind insbesondere Frau Marianne Fileki und Frau Andrea Peichl zu nennen, für ihre Unterstützung in labortechnischen Belangen. Ein großer Dank gilt meiner Mitdoktorandin Frau Katharina Nikolajek für die stete gegenseitige Motivation und den Wissensaustausch.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich bis zum Schluss auf vielerlei Weise unterstützend begleitet haben. Ganz besonders danken möchte ich meinen Mann, Lars Schiemann, der mich vor allem in schwierigen Phasen immer wieder aufgefangen hat.

Lebenslauf

04.01.1977	geboren in Schwäbisch Hall
1983	Grundschule in Schwäbisch Hall
1987	Erasmus-Widman-Gymnasium, Schwäbisch Hall
Juni 1996	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
Oktober 1996	Beginn des Studiums der Rechtswissenschaften an der Ludwig-Karls-Universität in Heidelberg
April 1999	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
September 2001	Ärztliche Vorprüfung
September 2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2003	Beginn der Dissertation bei Fr. PD Dr. med. B. Toth im Frauenforschungslabor der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe im Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München
September 2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	Praktisches Jahr in den Fächern Chirurgie (Städtisches Krankenhaus München-Neuperlach, Direktor Prof. Dr. med. B. Günther), Innere Medizin (Medizinische Klinik II im Klinikum Großhadern, München, Direktor Prof. Dr. med. B. Göke, Medizinische Klinik III im Klinikum Großhadern, München, Direktor Prof. Dr. med. W. Hiddemann) und Gynäkologie (Klinikum Starnberg, Chefarzt Prof. Dr. med. C. Anthuber)
Oktober 2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit Mai 2006	Assistenzärztin in der Frauenklinik vom Roten Kreuz, München, Chefarzt Prof. Dr. med. W. Eiermann.