

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Katrin Hartmann

# ***In-vitro*-Effekt von Hydroxyethylstärke 130/0,42 auf die canine Thrombozytenfunktion**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Janine Claßen

aus Reinbek

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Robert Köstlin

Tag der Promotion: 09.02.2013

Meiner Schwester und meinen Eltern

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>Struktur und Rolle der Thrombozyten .....</b>	<b>2</b>
1.1.	Struktur der Thrombozyten .....	2
1.1.1.	Strukturen der Membran .....	3
1.1.2.	Mikrotubuli.....	5
1.1.3.	Open Canalicular System .....	5
1.1.4.	Dense Tubular System .....	5
1.1.5.	Zytoskelett.....	6
1.1.6.	Granula .....	6
1.1.6.1.	Elektronendichte Granula.....	6
1.1.6.2.	$\alpha$ -Granula.....	7
1.1.6.3.	Lysosomale Granula.....	8
1.2.	Rolle der Thrombozyten in der primären Hämostase .....	8
1.2.1.	Thrombozytenadhäsion .....	9
1.2.2.	Thrombozytenaktivierung .....	10
1.2.3.	Aggregation.....	11
<b>2.</b>	<b>Methoden zur Messung der Thrombozytenfunktion.....</b>	<b>12</b>
2.1.	<i>In-vivo</i> -Methode zur Messung der Thrombozytenfunktion .....	12
2.2.	Optische Aggregometrie im plättchenreichen Plasma .....	13
2.3.	<i>In-vitro</i> -Methoden zur Messung der Thrombozytenfunktion im Vollblut.....	14
2.3.1.	Vollblutimpedanzaggregometrie .....	14
2.3.2.	Cone and Plate(let) Analyzer .....	16
2.3.3.	Sonoclot.....	17
2.3.4.	Thrombelastografie .....	18
2.3.5.	Durchflusszytometrie .....	21
2.3.6.	Platelet Function Analyzer-100.....	23
<b>3.</b>	<b>Störungen der Thrombozytenfunktion .....</b>	<b>25</b>
3.1.	Verminderte Thrombozytenfunktion.....	25
3.1.1.	Hereditäre Thrombozytopathien .....	25
3.1.2.	Erworbene Thrombozytopathien.....	26
3.1.2.1.	Hydroxyethylstärke .....	27

---

3.1.2.2.	Urämie .....	29
3.1.2.3.	Hyperviskositätssyndrom .....	29
3.1.2.4.	Medikamente .....	30
3.1.2.5.	Weitere Ursachen .....	32
3.2.	Erhöhte Thrombozytenreaktivität .....	32
3.2.1.	Nephrotisches Syndrom .....	32
3.2.2.	Therapie mit Erythropoetin .....	33
3.2.3.	Infektionen .....	33
3.2.4.	Neoplasien .....	33
3.2.5.	Diabetes mellitus .....	33
3.2.6.	Asthma .....	34
<b>III.</b>	<b>PUBLIKATION .....</b>	<b>35</b>
<b>1.</b>	<b>In vitro effect of hydroxyethyl starch 130/0.42 on canine platelet function.....</b>	<b>35</b>
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>40</b>
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>47</b>
<b>VI.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>49</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>51</b>
<b>VIII.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>73</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CalDAG-GEF1	Calcium and Diacylglycerol Guanine Nucleotide Exchange Factor 1
CD	Cluster of differentiation
COL/ADP	mit Kollagen und Adenosindiphosphat beschichtete Messzellen für den Platelet Function Analyzer-100
COP	Colloid osmotic pressure (kolloidosmotischer Druck)
COX	Cyclooxygenase
DTS	Dense Tubular System
FC	Flow cytometry (Durchflusszytometrie)
Fg	Fibrinogen
FVIII:C	Plasmakonzentration des Faktors VIII
GP	Glykoprotein
HES	Hydroxyethylstärke
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
ICAM-2	Intercellular adhesion molecule-2
K	Kollagen
kDa	Kilodalton
LALLS	Low angle laser lights scattering
LIMP-1	Lysosomal integral membrane protein 1
moAb	monoclonal antibody (monoklonaler Antikörper)
MS	molare Substitution
MW	Molekulares Gewicht
NaCl 0,9%	physiologische Kochsalzlösung
NSAIDs	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (nicht-steroidale Antiphlogistika)
OCS	Open Canalicular System
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PFA-100	Platelet Function Analyzer-100
Tab	Tabelle
TEG	Thrombelastografie
vWD	von-Willebrand- Erkrankung

---

vWF	von-Willebrand-Faktor
-----	-----------------------

## I. EINLEITUNG

Hydroxyethylstärken (HES) sind synthetische Kolloide. Sie werden in der Human- und Veterinärmedizin als intravenöse Volumenexpander zur Aufrechterhaltung des Blutdrucks und der Gewebepfusion perioperativ und bei kritisch kranken Patienten eingesetzt (JUNGHEINRICH & NEFF, 2005; KOZEK-LANGENECKER, 2005; JUNGHEINRICH, 2007).

Es ist bekannt, dass HES-Präparate die Thrombozytenfunktion *in vivo* und *in vitro* beeinträchtigen können. Dabei bewirkt die physikochemische Zusammensetzung der HES-Lösung diesen Effekt. Je höher das molekulare Gewicht, je höher das C2/C6-Verhältnis und vor allem je höher die molare Substitution, desto mehr kann ein HES-Präparat die Hämostase beeinflussen (TREIB et al., 1996; TREIB et al., 1997b; TREIB et al., 1997a). In der Humanmedizin konnte gezeigt werden, dass HES-Moleküle zu einem erworbenen von-Willebrand-Syndrom und einer verminderten Faktor-VIII-Konzentration führen und spezifische antithrombozytäre Effekte, wie eine verminderte Expression und Aktivität des Glykoproteins (GP) IIb/IIIa, hervorrufen (DALRYMPLE-HAY et al., 1992; JAMNICKI et al., 2000; STOGERMULLER et al., 2000; SCHARBERT et al., 2004).

Im Laufe der letzten 40 Jahre wurden immer wieder neue „Generationen“ von HES-Präparaten mit verbesserter Pharmakokinetik, aber vergleichbarem Volumeneffekt entwickelt (JUNGHEINRICH & NEFF, 2005).

In der Veterinärmedizin wurden bis jetzt sehr wenige Studien veröffentlicht, die den Effekt von HES auf die Thrombozytenfunktion untersuchten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ältere HES-Präparate die canine Thrombozytenfunktion *in vitro* und *in vivo* beeinträchtigen (WIERENGA et al., 2007; SMART et al., 2009; BACEK et al., 2011).

Das Ziel dieser Studie war es, den *in-vitro*-Effekt von HES 6% 130/0,42 (Venofundin®), einem HES-Präparat der dritten Generation, auf die canine Thrombozytenfunktion mit dem Platelet function analyzer 100 (PFA-100®) zu untersuchen.



## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Struktur und Rolle der Thrombozyten**

Thrombozyten sind kleine fragmentierte Blutzellen und entstehen aus dem Zytoplasma von Megakaryozyten. Sie sind bei Säugetieren kernlos, beim Hund 2 - 4 µm im Durchschnitt groß und zirkulieren bei den meisten Säugetieren für ungefähr fünf bis neun Tagen im Blut. Danach werden sie von Makrophagen in der Leber und der Milz abgebaut (MCKENZIE & REILLY, 2006; WALKER, 2008). Ihre Bildung wird durch das Hormon Thrombopoietin durch einem negativen Feedback-Mechanismus reguliert (BARTLEY et al., 1994; KAUSHANSKY, 1998, 2005). Referenzwerte für die Anzahl der Thrombozyten beim Hund sind 200 - 500 x 10<sup>3</sup>/µl (KAUSHANSKY, 2005; WALKER, 2008). Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle in der Hämostase. Sie sind zudem an pathophysiologischen Prozessen, wie Entzündung, Thrombosebildung, Blutungen und Tumorwachstum, beteiligt (MICHELSON, 2003).

#### **1.1. Struktur der Thrombozyten**

Thrombozyten setzen sich aus unterschiedlichen Strukturen und Zellorganellen zusammen (Abb. 1). Wichtige Ultrastrukturen für die Thrombozytenfunktion sind die Zellmembran mit ihren Glykoproteinrezeptoren, Mikrotubuli, das Open Canalicular System (OCS), das Dense Tubular System (DTS), das Zytoskelett und sekretorische Granula (RODGERS, 1999). Außerdem besitzen Thrombozyten Mitochondrien für den Energiestoffwechsel und Glykogen als Energiequelle (RENDU & BROHARD-BOHN, 2001).

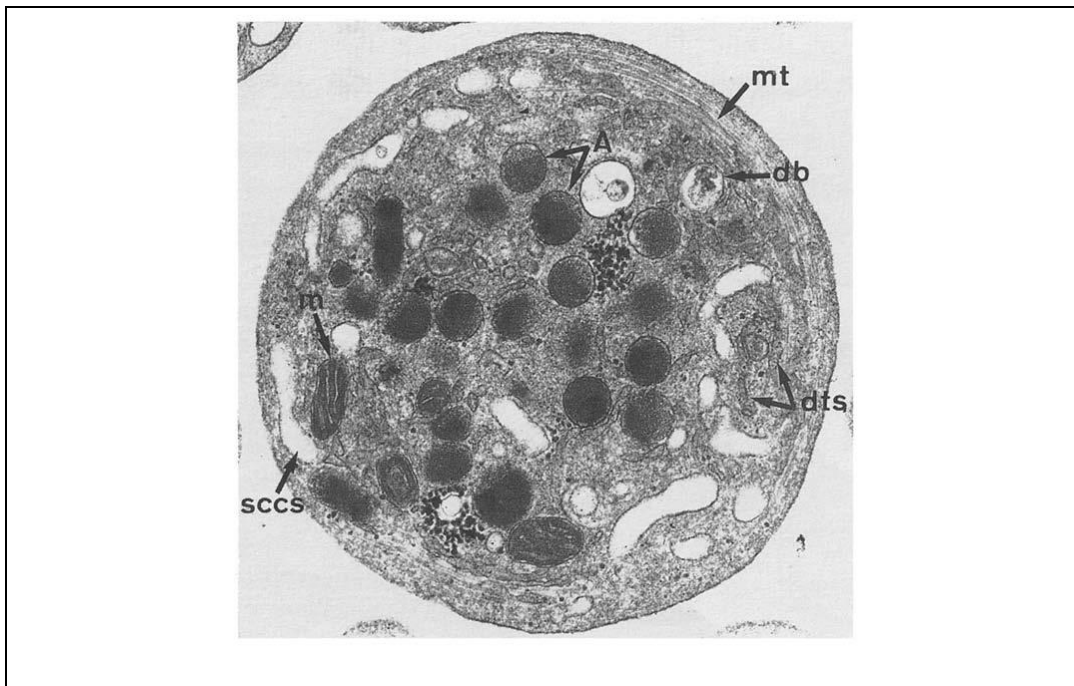


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines ruhenden Thrombozyten in diskoider Form mit Darstellung einzelner Zellstrukturen: Mikrotubuli (mt), Open Canicular System (sccs) und Dense Tubular System (dts), Mitochondrium (m),  $\alpha$ -Granula (A), elektronendichte Granula (db) (HARRISON & CRAMER, 1993).

#### 1.1.1. Strukturen der Membran

Die Membran der Thrombozyten ist charakterisiert durch eine Phospholipiddoppelschicht mit einem zentralen hydrophoben Kern. In diese Doppellipidschicht sind sogenannte Lipid Rafts (Mikrodomänen) eingelagert. Sie bestehen hauptsächlich aus Cholesterin und Sphingolipiden und können die Signaltransduktion bei der Thrombozytenaktivierung und die Reorganisation des Zytoskeletts während der Gerinnselretraktion verbessern und verstärken (BODIN et al., 2005). Innerhalb und außerhalb der Lipid Rafts befinden sich zahlreiche Rezeptoren unterschiedlicher Klassifikationen aus Proteinen und Glykoproteinen (GP), welche wichtig für die Thrombozytenreaktionen sind (Tab. 1). Zu den wichtigsten Rezeptoren gehören GPIb/IX/V und GPVI, welche von-Willebrand-Faktor (vWF) und Kollagen binden, und GPIIb/IIIa, welches der häufigste Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche und wichtig für die Thrombozytenaggregation und Adhäsion ist (BENNETT et al., 2009).

Tab. 1: Klassifikation und Funktion der wichtigsten Rezeptoren der Thrombozytenmembran

Rezeptor	Weitere Bezeichnungen	Klassifikation	Funktion	Referenz
GP IIb/IIIa	$\alpha_{IIb}\beta_3$ CD41/61	Integrin	Fibrinogenrezeptor, 50000-80000/Thrombozyt, mediert Aggregation, Thrombozytenaktivierung führt zur Konformationsänderung und Bindung von Liganden (Fibrinogen, vWF, Fibronektin u. a.)	(NURDEN, 2006)
GP Ib/IX/V		Leucin-Rich Repeat Protein	vWF-Rezeptor, 60000/Thrombozyt, Adhäsion unter hohen Scherkräften, bindet auch an Counter-Rezeptoren P-Selectin (aktivierte Thrombozyten, Endothozellen) und Mac-1 (Neutrophile), weitere Liganden: $\alpha$ -Thrombin, Faktor XI/XIIa, Kininogen	ANDREWS et al., 2003)
ICAM-2	CD 102	Immunoglobulin	Auf Oberfläche aktivierter und nicht aktivierter Thrombozyten, 3000/Thrombozyt, einziger $\beta_2$ -Integrin-Ligand, Leukozyten-Thrombozyten Interaktion bei Entzündung und Thrombose	DIACOVO et al., 1994)
GP VI		Immunoglobulin	Hauptkollagenrezeptor, Thrombozytenaktivierung	GROSS et al., 1999)
PECAM-1	CD31	Immunoglobulin	Inhibition und Verstärkung der Thrombozytenaktivierung	JONES et al., 2001; WEE & JACKSON, 2005)

CD: Cluster of Differentiation; GP: Glykoprotein; ICAM-2: Intercellular adhesion molecule-2; PECAM-1: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1

### **1.1.2. Mikrotubuli**

Mikrotubuli sind feste, hohle zylindrische Strukturen und sind als eine Art Ring direkt unter der Zellmembran angeordnet. Sie bestehen aus Protofilamenten von alpha-beta-Tubulindimeren, die in einer Helix angeordnet sind. Mikrotubuli sind verantwortlich für die diskoidale Form der ruhenden Thrombozyten während der Blutzirkulation. Sobald ein Thrombozyt aktiviert wird, findet ein Umbau des Rings aus Mikrotubuli statt, damit der Thrombozyt seine Form ändern kann (HARTWIG, 2006).

### **1.1.3. Open Canalicular System**

Das Open Canalicular System (OCS) oder auch Surface-Connected Canalicular System ist ein Labyrinth aus untereinander verknüpften Kanälen, das mit der Thrombozytenoberfläche verbunden ist und weit in das Zytoplasma hineinzieht (WHITE & ESCOLAR, 1991). Das OCS dient bei einer Entzündungsreaktion zur Aufnahme von extrazellulären Partikeln, wie Viren und Bakterien, und zur Freisetzung von Granulainhalten nach der Thrombozytenaktivierung. Dennoch sind Thrombozyten keine richtigen Phagozyten, da immer eine Verbindung nach extrazellulär besteht bleibt (WHITE, 2005). Viele der Thrombozytenoberflächenrezeptoren sind auch im OCS vorhanden. Während der Thrombozytenaktivierung kann das OCS als Membranreservoir fungieren und sich ausstülpen. So kann es die Thrombozytenoberfläche vergrößern und die Anzahl der Oberflächenrezeptoren erhöhen (ESCOLAR et al., 1989). Die Thrombozyten von Equiden und Wiederkäuern enthalten kein OCS (GADER et al., 2008).

### **1.1.4. Dense Tubular System**

Das Dense Tubular System (DTS) ist ein Überbleibsel des glatten endoplasmatischen Retikulums der Megakaryozyten. Es befindet sich in der Nähe der Mikrotubuli. Das DTS kann durch seine Cyclooxygenasen und Thromboxan-Synthetasen Prostaglandin synthetisieren und dient der Kalziumspeicherung. Das Kalzium wird von Sarko-Endoplasmatischen-Retikulum-Kalzium-ATPasen nach intrazellulär und von Plasmamembran-Kalzium-ATPasen nach extrazellulär gepumpt (KOVACS et al., 1997). Die Kalziumspeicher des DTS machen ungefähr 30% des Gesamtkalziums eines Thrombozyten aus und werden während der Thrombozytenaktivierung mobilisiert und in das Zytoplasma freigesetzt. Diese Kalziummobilisierung ist wichtig für die Bewegung und Freisetzung der

Granula (RENDU & BROHARD-BOHN, 2001).

#### **1.1.5. Zytoskelett**

Das Zytoskelett der Thrombozyten besteht aus den Proteinen Aktin, Spektrin, Filamin, Adduktin und dem vWF-Rezeptor (GPIb/IX/V). Das Zytoskelett der Thrombozyten kann in zwei Komponenten eingeteilt werden, einem Membranskelett und einem umfangreichen Aktingerüst im Zytoplasma. Beide Komponenten und ihre Bestandteile sind untereinander verbunden. Bei der Thrombozytenaktivierung findet eine schnelle Änderung der Zellform von diskoid nach sphäroid statt, und es kommt zur Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien. Diese Änderung der Zellform geht mit komplexen Ab- und Umbauvorgängen und Reorganisation des Zytoskeletts und einer Verdopplung der Aktinfilamente einher (HARTWIG, 2006).

#### **1.1.6. Granula**

Thrombozyten enthalten drei Arten sekretorischer Granula, die für die Thrombozytenfunktion wichtig sind: elektronendichte Granula oder auch Dense Bodies,  $\alpha$ -Granula und lysosomale Granula. Sie dienen der Speicherung verschiedener Substanzen und enthalten Membranproteine, die wichtig und unterstützend für die Funktionen und Reaktionen der Thrombozyten sind. Eine Thrombozytenaktivierung führt zur Degranulation mit extrazellulärer Sekretion des Granulainhaltes und Expression der Granulamembranproteine auf der Thrombozytenoberfläche (HARRISON & CRAMER, 1993; MCNICOL & ISRAELS, 1999).

##### **1.1.6.1. Elektronendichte Granula**

Elektronendichte Granula, oder auch Dense Bodies genannt, dienen der Speicherung von Serotonin, Kalzium, anorganischem Phosphat, ADP und metabolisch nicht aktivem ATP (HOLMSEN & WEISS, 1979; MCNICOL & ISRAELS, 1999). Das Serotonin wird aktiv vom Zytoplasma in die Granula transportiert. Die Serotoninkonzentration in den Granula ist 1000fach höher als im Zytoplasma. Die Kalziumspeicher beinhalten ca. 70 % des Gesamtkalziums eines Thrombozyten und werden während der Thrombozytenaktivierung im Gegensatz zu den Kalziumspeichern des DTS nicht mobilisiert (SKAER et al., 1974). Durch das Kalzium sind die Dense Bodies im Elektronenmikroskop ohne weitere Färbung sichtbar. Nach Exozytose des Granulainhaltes wirken ADP und Serotonin als Thrombozytenagonisten und dienen zur Aktivierung und

Rekrutierung weiterer Thrombozyten (MCNICOL & ISRAELS, 1999). Außerdem enthalten elektronendichte Granula verschiedene Membranproteine, die bei der Thrombozytenaktivierung durch Fusion mit der Zytoplasmamembran auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert werden (MCNICOL & ISRAELS, 1999).

#### **1.1.6.2. $\alpha$ -Granula**

Der Inhalt der  $\alpha$ -Granula ist heterogen und besteht aus membrangebundenen Proteinen, die auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert werden können, und freien Proteinen, die in den extrazellulären Raum freigesetzt werden können (HARRISON & CRAMER, 1993; BLAIR & FLAUMENHAFT, 2009). In  $\alpha$ -Granula von Menschen, Mäusen und Schweinen konnte eine getrennte Ablagerung von vWF und Fibrinogen nachgewiesen werden. Dies ermöglicht eine gezielte Sekretion dieser Proteine bei der Thrombozytenaktivierung (SCHMITT et al., 2001; SEHGAL & STORRIE, 2007). Desweiteren können die gespeicherten Proteine entweder bereits auf dem Level der Megakaryozyten durch Biosynthese oder durch Endozytose und Pinozytose oder erst auf dem Level der zirkulierenden Thrombozyten durch Endozytose und Pinozytose (z.B. Fibrinogen, Immunglobuline, Albumin) in die Granula gelangen (GEORGE & SAUCERMAN, 1988; HARRISON & CRAMER, 1993).

Eine Massenspektrometrieanalyse des Proteoms von humanen  $\alpha$ -Granula ergab eine Anzahl von 284 Proteinen (MAYNARD et al., 2007). Darunter waren adhäsive Proteine, wie vWF und Thrombospondin, Plasmaproteine, wie Albumin und IgG, Gerinnungsfaktoren, Mitogene, wie Platelet Derived Growth Factor, Proteasehemmer und Glykoproteine (HARRISON & CRAMER, 1993; MAYNARD et al., 2007).

Wichtige Membranproteine der  $\alpha$ -Granula sind P-Selektin, GPIb/IX/V, GPIIb/IIIa, PECAM-1 und GPIV. Sie werden durch Fusion mit der Plasmamembran oder dem OCS während der Thrombozytenaktivierung auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert (BERGER et al., 1993; CRAMER et al., 1994; BERGER et al., 1996). Auch die Inhalte der  $\alpha$ -Granula können so bei der Thrombozytenaktivierung freigesetzt werden (FLAUMENHAFT, 2003). Es ist bekannt, dass die zahlreichen Proteine der  $\alpha$ -Granula wichtige Funktionen in der Hämostase, bei Entzündungsreaktionen, bei antimikrobiellen Vorgängen, Wundheilung und in der Angiogenese haben (BLAIR & FLAUMENHAFT, 2009). Die wichtigsten Proteine der  $\alpha$ -Granula für eine physiologische Hämostase

sind vWF, Fibrinogen und Faktor V (HARRISON & CRAMER, 1993).

#### **1.1.6.3. Lysosomale Granula**

Lysosomale Granula beeinhalten hydrolytische Enzyme, wie Proteasen und Glykosidasen, die bei niedrigem pH-Wert aktiv sind (BENTFELD-BARKER & BAINTON, 1982). Ihre Membranproteine, wie Lysosomal Integral Membrane Protein-1-(LIMP-1) werden bei der Thrombozytenaktivierung auf der Plasmamembran exprimiert (RENDU & BROHARD-BOHN, 2001).

### **1.2. Rolle der Thrombozyten in der primären Hämostase**

Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle in der primären Hämostase, da sie als erste Instanz Verletzungen des Gefäßendothels verschließen und somit einen möglichen Blutverlust minimieren. Die gesamte Hämostase kann in drei Schritte untergliedert werden. Während der primären Hämostase wird ein temporäres Gerinnsel von Thrombozyten gebildet, um das verletzte Gefäß abzudichten. Dieses Gerinnsel wird im Laufe der sekundären Hämostase durch die Bildung eines Fibrinnetzwerks stabilisiert. Das Zytoskelett der Thrombozyten trägt zur Thrombusretraktion und Festigung bei. Bei der tertiären Hämostase wird durch die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin das Fibrinnetzwerk und das Gerinnsel aufgelöst (GERRARD, 1988; RODGERS, 1999; MCMICHAEL, 2005).

Während der primären Hämostase findet eine Adhäsion, Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten statt. Diese Prozesse sind sehr komplex und erfordern verschiedene Interaktionen zwischen Thrombozyten, Endothel, Subendothel und vWF. Eine Vielzahl von Liganden und Rezeptoren ist beteiligt. Diese Interaktionen sind von der lokalen Geschwindigkeit des Blutflusses abhängig (JACKSON et al., 2003).

In intakten Blutgefäßen zirkulieren die Thrombozyten in einem ruhenden Zustand und besitzen eine diskoide Zellform. Das intakte Gefäßendothel verhindert eine Thrombozytenaktivierung und Aggregation durch die Synthese und Sekretion von Prostazyklinen und Stickstoffoxiden (RODGERS, 1988). Außerdem bildet das Endothel Substanzen, wie ADPasen, Heparansulfat und Thrombomodulin, die Thrombozytenagonisten hemmen oder abbauen. Auch die sich abstoßenden elektronennegativen Ladungen von Thrombozyten und Endothelzellen tragen zur Verhinderung der Adhäsion an intaktes Gefäßendothel bei. (ESMON et al., 1983; MARCUS et al., 1997; RUGGERI, 2003).

### 1.2.1. Thrombozytenadhäsion

Ist das Gefäßendothel geschädigt, wird darunter liegendes subendotheliales Gewebe frei. Die initiale Thrombozytenadhäsion an das Subendothel wird durch Kollagen und vWF herbeigeführt (Abb. 2) (MCMICHAEL, 2005).

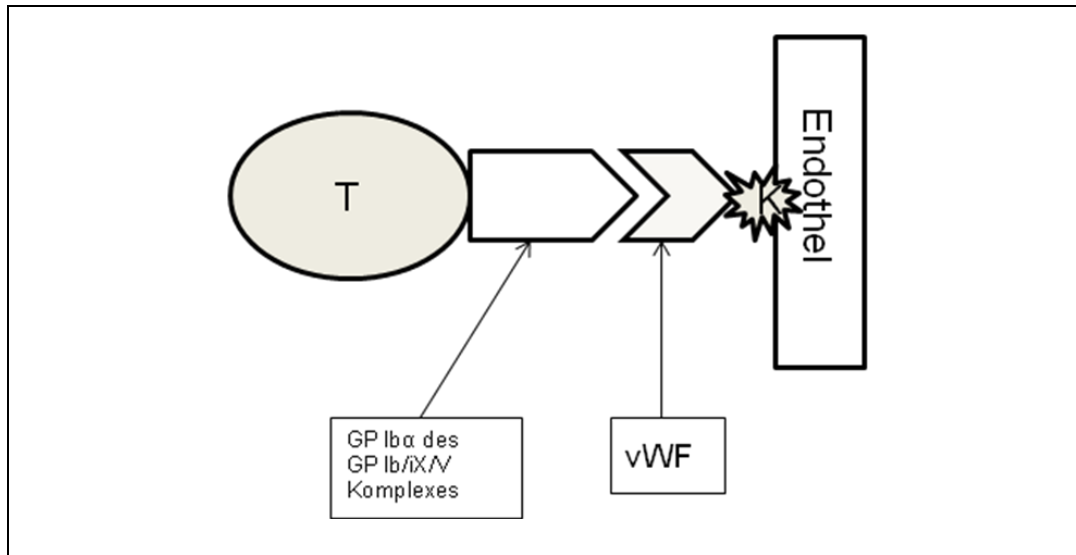


Abb. 2: Prinzip der Thrombozytenadhäsion bei hohem Scherstress. GP: Glykoprotein, K: Kollagen, T: Trombozyt, vWF: von-Willebrand-Faktor.

Der vWF ist ein multimerisches adhäsives Glykoprotein und hat mehrere Aufgaben. Er ist Trägerprotein für Faktor VIII und schützt ihn vor frühzeitiger Proteolyse. Außerdem ist er das wichtigste Adhäsionsmolekül in der primären Hämostase. Er wird zum einen von Endothelzellen sezerniert. In diesen wird der vWF in sekretorischen Vesikeln, den Weibel-Palade-Körperchen, gespeichert. Zum anderen wird er von Megakaryozyten sezerniert und in  $\alpha$ -Granula und Thrombozyten gespeichert. Durch verschiedene Substanzen wie Thrombin, Fibrin, Kollagen, Platelet-Activating Faktor, Histamin und Epinephrin kann vWF freigesetzt werden. Nach der Freisetzung kann vWF entweder in den Blutstrom gelangen, oder an subendotheliales Kollagen gebunden werden. Auf der Thrombozytenoberfläche gibt es zwei Rezeptoren für vWF: GPIIb/IIIa und GPIb $\alpha$  des GPIb/IX/V-Komplexes. Der vWF mediiert sowohl die Thrombozytenadhäsion an extrazelluläre Matrix, als auch die Aggregation der Thrombozyten untereinander (MEYER et al., 1991; RUGGERI, 2003).

Durch lockeres kurzes Anheften des Thrombozytenrezeptors GPIb $\alpha$  an den vWF beginnen die Thrombozyten am Endothel entlang zu rollen. Dieses „Rolling“ wird durch P-Selektin, das von aktivierten Endothelzellen exprimiert wird, vermittelt (NURDEN & CAEN, 1975, 1976; CAEN et al., 1977; FRENETTE et al., 1995). Nachdem die Thrombozytenadhäsion an das Endothel durch vWF und Kollagen



zustande kommt, findet eine Konformationsänderung statt, und der Rezeptor GPIIb/IIIa wird auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert (NURDEN & CAEN, 1975). Weiterhin stimuliert subendotheliales Kollagen die Thrombozyten zur Expression weiterer Membranrezeptoren für Fibrinogen und vWF, welche wichtig für die Thrombozytenaggregation sind (THOMAS, 2002).

Dieser beschriebene Weg der Thrombozytenadhäsion findet bei hohem Scherstress statt. Bei niedrigem Scherstress wird die Adhäsion durch Kollagen, Fibronectin und Laminin vermittelt (Abb. 3) (KROLL et al., 1996).

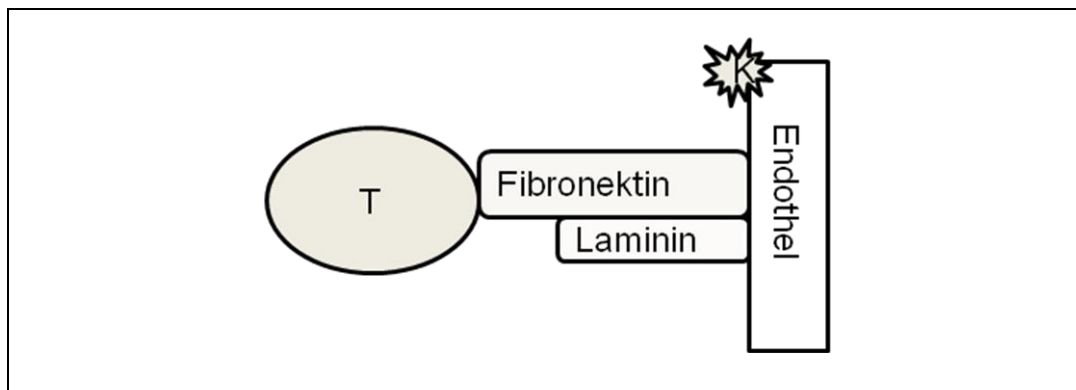


Abb. 3: Prinzip der Thrombozytenadhäsion bei niedrigen Scherkräften. K: Kollagen, T: Thrombozyt.

### 1.2.2. Thrombozytenaktivierung

Die Thrombozytenaktivierung kann durch die Adhäsion selbst oder auch adhäsionsunabhängig durch Thrombin bei einer Entzündung hervorgerufen werden (MCMICHAEL, 2005). Die Thrombozytenaktivierung führt zu einer Zellformänderung, zu einer Degranulation von  $\alpha$ - und elektronendichten Granula, die ihre Inhalte über das OCS freisetzen, und zur Expression von Oberflächenrezeptoren, wie z. B. GPIIb/IIIa, die für die Thrombozytenaggregation wichtig sind (THOMAS, 2002).

Eine Thrombozytenaktivierung durch Kollagen, Thrombin, Thromboxan  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) und ADP wird durch einen Signalweg induziert, der die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht (DETWILER et al., 1978; MCMICHAEL, 2005). Durch den erhöhten Kalziumspiegel setzen die Thrombozyten wiederum Agonisten wie ADP, Epinephrin und Serotonin aus ihren  $\alpha$ - und elektronendichten Granula frei und sezernieren TXA<sub>2</sub> und Platelet-Activating Factor. All diese Agonisten dienen der Aktivierung, Adhäsion und Aggregation weiterer Thrombozyten. TXA<sub>2</sub> ist hauptverantwortlich für die Thrombozytenaggregation und Vasokonstriktion (FUNK, 2001; MCMICHAEL, 2005).

Unter niedrigen Scherkräften wird die Thrombozytenaktivierung von Thromboxan A<sub>2</sub>, unter hohen Scherkräften von ADP herbeigerufen (MOAKE et al., 1988; MCMICHAEL, 2005). Thrombin führt unter allen Scherkräften über den GPIb/IX/V-Komplex und Protease-Activated Receptors zur Aktivierung (JACKSON et al., 2003).

### 1.2.3. Aggregation

Bei der Thrombozytenaggregation werden weitere zirkulierende Thrombozyten rekrutiert, aktiviert und in den wachsenden Thrombus integriert. Die Thrombozytenaggregation kann durch Agonisten wie ADP, Serotonin und Epinephrin, welche von elektronendichten Granula freigesetzt werden, und durch neu synthetisierte Moleküle, wie Platelet-Activating Faktor und Thromboxan A<sub>2</sub>, stimuliert werden (GENTRY, 2010). Die Aggregation wird bei hohen Scherkräften hauptsächlich durch GPIb/IX/V und vWF, und bei niedrigen Scherkräften vor allem durch GPIIb/IIIa und Fibrinogen vermittelt (Abb. 4 und 5) (LOSCALZO, 2001).

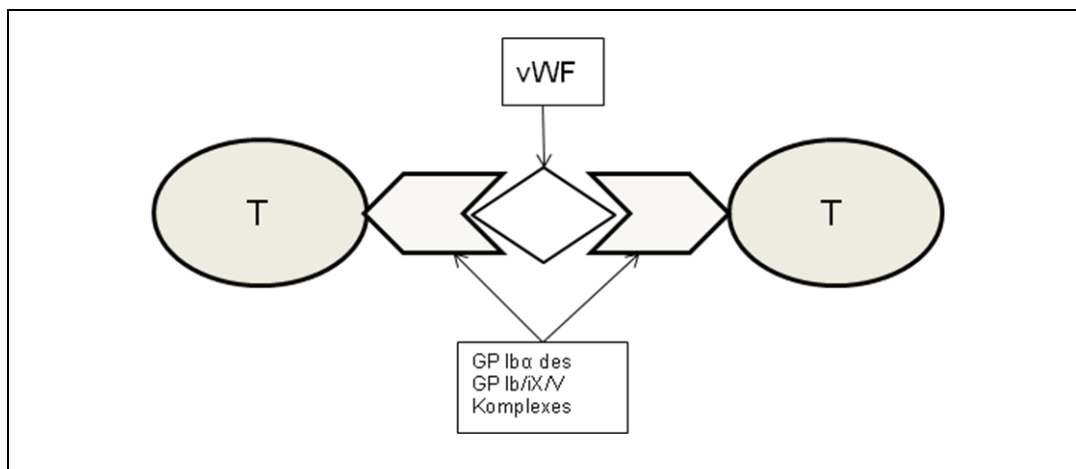


Abb. 4: Prinzip der Thrombozytenaggregation bei hohem Scherstress. GP: Glykoprotein, T: Thrombozyt, vWF: von-Willebrand-Faktor.

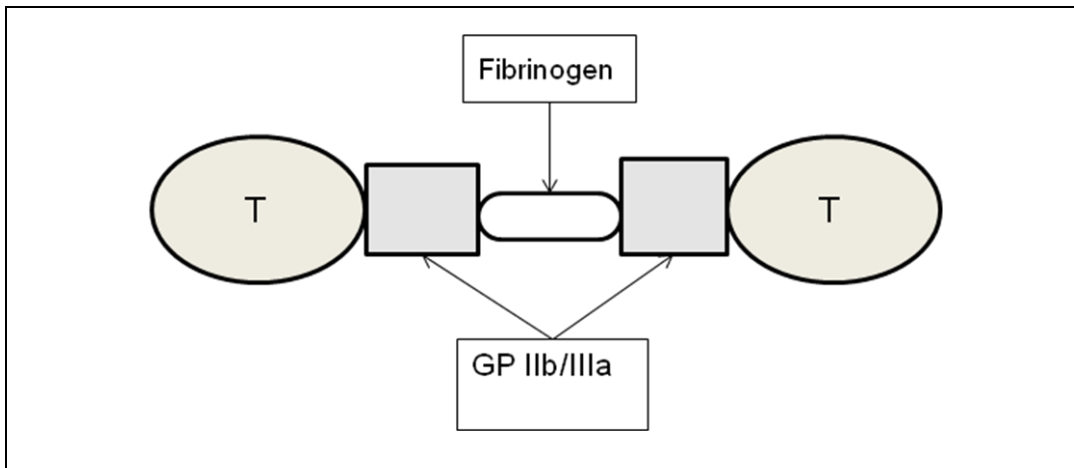


Abb. 5: Prinzip der Thrombozytenaggregation bei niedrigen Scherkräften. GP: Glykoprotein T: Thrombozyt.

Aktivierte Thrombozyten bieten über GPIIb/IIIa den Gerinnungsfaktoren die Möglichkeit zur Ausbildung eines Fibrinnetzwerks. Dadurch wird der Thrombus stabilisiert (THOMAS, 2002).

## 2. Methoden zur Messung der Thrombozytenfunktion

Eine Messung der Thrombozytenfunktion wird durchgeführt, um die Wirkung einer antithrombozytären Therapie zu überprüfen oder um Störungen der primären Hämostase zu untersuchen. Es können *in-vivo*- von *in-vitro*-Methoden unterschieden werden (JANDREY, 2012).

### 2.1. *In-vivo*-Methode zur Messung der Thrombozytenfunktion

Die Buccal Mucosal Bleeding Time (BMBT) ist das älteste Verfahren, um die Thrombozytenfunktion zu testen. Das Verfahren wurde zum ersten Mal im Jahre 1910 von Duke beschrieben und wurde im Laufe der Zeit modifiziert (DUKE, 1910).

Eine standardisierte oberflächliche Inzision wird an der hochgebundenen Oberlippe des Hundes mittels einer federgelagerten Klinge gesetzt und die Zeit bis zum Stoppen der Blutung gemessen (Abb. 6). Dabei werden abfließende Blutstropfen mit einem Filterpapier aufgesaugt, ohne die Inzisionsstelle mit dem Papier zu berühren. Die BMBT für gesunde Hunde liegt < 3 Minuten (JERGENS et al., 1987). Die gesetzte Inzision ist oberflächlich genug, um durch die Bildung eines primären Thrombozytenpropfs wieder verschlossen zu werden. Da Fibrin für den Verschluss der Inzision nicht nötig ist, wird die sekundäre Hämostase

durch diesen Test nicht untersucht (STOKOL, 2005). Eine Verlängerung der BMBT deutet auf eine Thrombozytopathie, Thrombozytopenie oder ein vWD hin (BROOKS & CATALFAMO, 1993; MARKS, 2000).



Abb. 6: Setzen der Inzision an der Innenseite der hochgebundenen Oberlippe eines Hundes mit einem standardisierten BMBT-Gerät (linke Abbildung). Standardisierte oberflächliche Inzision an der Oberlippe eines Hundes (rechte Abbildung) (JANDREY, 2012).

Nachteil an diesem Test ist die Subjektivität der Messung. Außerdem ist die BMBT ein globaler Test der primären Hämostase und ist nicht spezifisch für eine spezielle Störung der primären Hämostase. Auch ist die BMBT relativ insensitive, da sie erst bei schwereren Defekten verlängert ist (STOKOL, 2005). Vorteilhaft an diesem Test ist, dass er kostengünstig ist und, dass kein speziell ausgebildetes Personal für seine Durchführung nötig ist.

Beim Menschen ist dieser Test aufgrund seiner fehlenden Spezifität und Sensitivität, um ein präoperatives Blutungsrisiko oder eine Thrombozytopathie festzustellen, nahezu abgeschafft (POSAN et al., 2003; JANDREY, 2012). Bei Tieren wird die BMBT zur Erkennung von Störungen der primären Hämostase eingesetzt, z. B. wenn bei blutenden Tieren die Routineuntersuchungen der Hämostase, wie Thrombozytenanzahl und Gerinnungsparameter, im Referenzbereich liegen. Außerdem wird die BMBT zum präoperativen Screening eingesetzt, um das Blutungsrisiko bei prädisponierten Rassen (z. B. Dobermann) abzuschätzen (POSAN et al., 2003; STOKOL, 2005; HARRISON & MUMFORD, 2009).

## **2.2. Optische Aggregometrie im plättchenreichen Plasma**

Als Goldstandard zur Untersuchung von Störungen der primären Hämostase wird die optische Aggregometrie im plättchenreichen Plasma nach Born, welche in den 1960ern entwickelt wurde, angesehen (BORN, 1962). Sie wurde vor allem in den

1960ern bis 1980ern verwendet (CALATZIS, 2007). Bei diesem Verfahren können im plättchenreichen Plasma mit Hilfe von Zugabe verschiedener Thrombozytenagonisten (z. B. Kollagen, ADP, Thrombin) in unterschiedlichen Konzentrationen mehrere Störungen der Thrombozytenfunktion, wie Membran- und Rezeptordefekte und Medikamenteneffekte untersucht werden (BRAINARD et al., 2007; HARRISON & MUMFORD, 2009; BRAINARD et al., 2010). Die optische Aggregometrie basiert auf dem Prinzip einer GPIIb/IIIa-vermittelten Thrombozytenaggregation mit Fibrinogen. Durch die Agonistenzugabe werden die Thrombozyten im Plasma aktiviert und es bilden sich Makroaggregate. Dadurch wird die Lichttransmission im plättchenreichen Plasma erhöht und von einem Detektor registriert (MICHELSON, 2009).

Nachteilig an dieser Methode ist, dass ein großes Blutvolumen benötigt wird. Sie ist mit hohem technischem Aufwand verbunden. Außerdem spiegelt diese Technik nicht die *in-vivo*-Verhältnisse und Mechanismen in einem verletzten Gefäß wieder, da plättchenreiches Plasma nötig ist und keine hohen Scherkräfte erreicht werden (MICHELSON, 2009); (JANDREY, 2012).

### **2.3. *In-vitro*-Methoden zur Messung der Thrombozytenfunktion im Vollblut**

Zu den *in-vitro*-Methoden zur Messung der Thrombozytenfunktion im Vollblut gehören Vollblutimpedanzaggregometrie, Cone and Plate(let) Analyzer, Sonoclot, Thrombelastographie (TEG), Durchflusszytometrie (Flow Cytometry, FC) und der Platelet Function Analyzer-100 (PFA-100). Verfahren im Vollblut haben mehrere Vorteile. Vollblut ist die natürliche Umgebung der Thrombozyten, in der sie aktiviert werden und aggregieren. Auch muss die Probe nicht zentrifugiert werden, wodurch es zu Artefakten der Thrombozyten kommen könnte und die großen Thrombozyten versehendlich mit abzentrifugiert werden. Außerdem sind Interaktionen zwischen Leukozyten und Thrombozyten im Rahmen der Thrombozytenaktivierung wichtig (STAFFORD et al., 2003; DYSZKIEWICZ-KORPANTY et al., 2005). Die Messverfahren im Vollblut wurden in den letzten 25 Jahren vorwiegend durchgeführt (CALATZIS, 2007).

#### **2.3.1. Vollblutimpedanzaggregometrie**

Die Vollblutimpedanzaggregometrie wurde 1979 vorgestellt und basiert auf der Impedanzmessung zwischen zwei Elektroden (CARDINAL & FLOWER, 1980). Hierbei werden die Elektroden in eine mit Kochsalzlösung verdünnte

antikoagulierte Vollblutprobe eingetaucht, und die Probe wird mit einem magnetischen Rührstab gerührt. Sobald ein elektrischer Strom fließt, adhären die Thrombozyten an den Elektroden und bilden eine monomolekulare Schicht auf ihnen. Durch die Zugabe von Agonisten (ADP, Kollagen, Arachidonsäure) beginnen weitere Thrombozyten an die bereits adhärenierten Thrombozyten zu binden, und es bildet sich ein Thrombozytenaggregat. Dadurch erhöht sich die Impedanz (gemessen in Ohm [ $\Omega$ ]) zwischen diesen zwei Elektroden, welche gemessen und grafisch aufgezeichnet werden kann (Abb. 7). Die Erhöhung der Impedanz korreliert mit dem Grad der Aggregation (CARDINAL & FLOWER, 1980). Die Vollblutimpedanzaggregometrie basiert, wie die optische Aggregometrie, auf dem Prinzip einer GPIIb/IIIa-vermittelten Thrombozytenaggregation mit Fibrinogen.

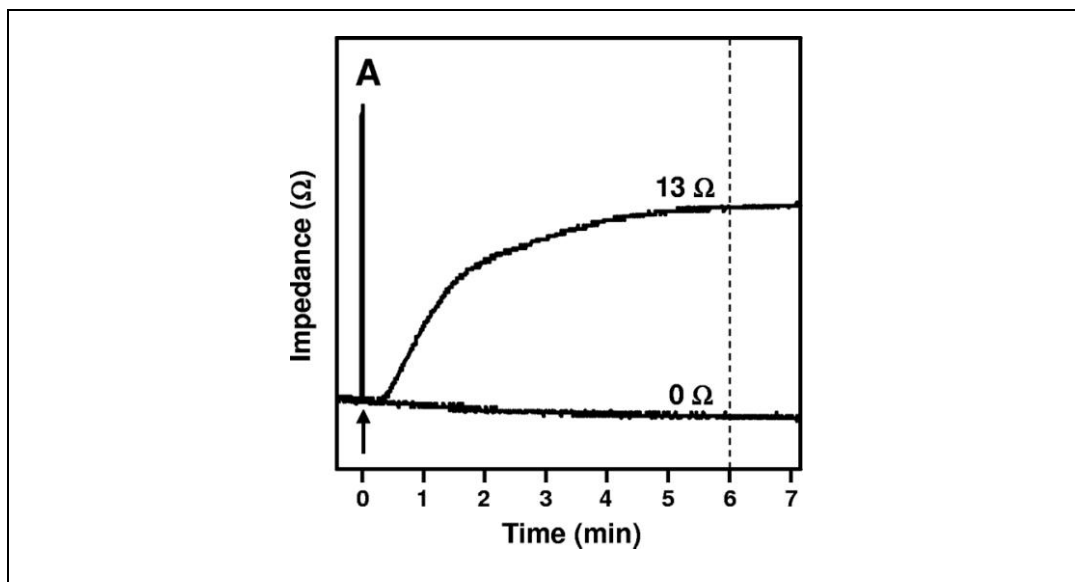


Abb. 7: Beispiel einer Impedanzaggregometriemessung eines gesunden Menschen (obere Kurve) und 24 Stunden nach der Einnahme von 300 mg Clopidogrel (untere Kurve). Der Pfeil zeigt die Zugabe des Agonisten ( $0,5 \mu\text{mol/L}$  ADP) an. Die gestrichelte Linie zeigt die Impedanz nach sechs Minuten an (IVANDIC et al., 2006).

Vorteile dieser Messmethode gegenüber der optischen Aggregometrie sind eine verkürzte Probenbearbeitungszeit, da kein plättchenreiches Plasma hergestellt werden muss. Außerdem werden die physiologischen Verhältnisse durch die Messung im Vollblut besser simuliert als bei der optischen Aggregometrie (CALATZIS, 2007; MICHELSON, 2009).

Nachteile dieser Methode sind trotzdem ein hoher Zeitaufwand und ein relativ großes Probenvolumen. Außerdem ist geschultes Personal nötig, und es werden

keine hohen Scherkräfte erreicht (MICHELSON, 2009). Auch müssen die eingesetzten Elektroden nach jeder Analyse gereinigt werden. Dies stellt ein potentiell Infektionsrisiko, einen zusätzlichen Arbeitsaufwand und eine mögliche Fehlerquelle dar (CALATZIS, 2007).

Die Impedanzaggregometrie wurde in der Humanmedizin bisher eingesetzt, um Thrombozytendysfunktionen durch Medikamente und Erkrankungen zu untersuchen (DALBY et al., 1999; WATALA et al., 2005; IVANDIC et al., 2006). Das Multiplate<sup>®</sup>-System ist eine Weiterentwicklung der Vollblutimpedanzaggregometrie und ist semi-automatisiert (TOTH et al., 2006). Mit diesem Gerät wurden in der Veterinärmedizin bereits Studien an Schafen und Hunden durchgeführt (BAUMGARTEN et al., 2010; KALBANTNER et al., 2010; KALBANTNER et al., 2011).

### **2.3.2. Cone and Plate(let) Analyzer**

Dieses Verfahren wurde 1997 von Varon und Savion vorgestellt und basiert auf der „Cone and Plate“-Methode aus der Viskosimetriemessung (VARON et al., 1997). Es testet die Thrombozytenadhäsion und- aggregation im antikoaguliertem Vollblut unter arteriellen Flussbedingungen, also hohen Scherkräften. Hierbei wird die Thrombozytenaktivierung durch schnelles Drehen eines Konus auf einer Platte und die dadurch entstehenden Scherkräfte hervorgerufen. Die aktivierten Thrombozyten heften sich an die Platte an und aggregieren. Nach Waschen und Anfärben können die anhaftenden Thrombozyten mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Zum einen wird die prozentuale Bedeckung der Plattenoberfläche durch die Thrombozyten (Surface Coverage) softwaregesteuert berechnet. Dieses quantifiziert die Thrombozytenaktivität und -adhäsion. Außerdem wird die mittlere Größe der Thrombozytenaggregate gemessen. Dies spiegelt die Aggregationrate wieder (SAVION & VARON, 2006).

Da dieses Messprinzip, also die Adhäsion der Thrombozyten an die Platte durch hohe Scherkräfte, nicht sensitiv für eine Thrombozytenhemmung durch Clopidogrel oder Aspirin ist, wird zur Überprüfung der Wirkung dieser Medikamente die sogenannte „inverse Aggregometrie“ durchgeführt. Dabei werden die Thrombozyten vor der Analyse mit ADP oder Arachidonsäure stimuliert und inkubiert (SAVION & VARON, 2006; VAN WERKUM et al., 2010).

Vorteilig an der Messung mit einem Cone and Plate(let) Analyzer ist, dass ein

geringes antikoaguliertes Blutvolumen (130 µl) benötigt wird. Die Blutprobe bedarf keiner weiteren Bearbeitung. Außerdem ist die Messung durch vollautomatische Geräte, wie dem Impact-R<sup>TM</sup>, einfach durchzuführen. Durch die hohen Scherkräfte werden *in-vivo*-Verhältnisse simuliert (JANDREY, 2012).

Bisher wurde das Gerät nur für den Menschen validiert. Es ist sehr sensitiv um angeborene Defekte der primären Hämostase wie Störungen der Thrombozytenadhäsion und -aggregation zu untersuchen. (VARON et al., 1997; SAVION & VARON, 2006).

### 2.3.3. Sonoclot

Der Sonoclot ist ein Gerät, das zum ersten Mal 1975 beschrieben wurde. Es misst Änderungen in der mechanischen Impedanz in einer Blutprobe (VON KAULLA et al., 1975).

Es werden Änderungen der Blutviskosität und Gerinnselelastizität über eine vibrierende Sonde in der Blutprobe gemessen und als Kurve aufgezeichnet. Diese Kurve spiegelt den gesamten Prozess der Hämostase, von der initialen Fibrinbildung und Polymerisation über Thrombozyteninteraktionen und Gerinnself retraktion und -lyse wieder. Anhand ihres Verlaufes können Aussagen über einzelne Aspekte der Hämostase, wie z. B. die Thrombozytenfunktion oder die Fibrinolyse, gemacht werden. Durch die Zugabe verschiedener Reagenzien kann der Sonoclot für unterschiedliche klinische Fragestellungen genutzt werden (HETT et al., 1995).

Der Sonoclot ist nicht sensitiv für Thrombozyteninhibitoren wie Aspirin und Clopidogrel, da die Thrombozytenfunktion mittels Thrombin gemessen wird (JANDREY, 2012). Vorteile des Sonoclots sind die relativ einfache Durchführung der Messung durch computergestützte Software, Kostengünstigkeit und die handliche Größe des Geräts (JANDREY, 2012).

In der Humanmedizin wurde der Sonoclot zur perioperativen Überwachung der Hämostase und zur Überwachung antikoagulanter Therapien eingesetzt (HETT et al., 1995). In der Veterinärmedizin wurde er bei Pferden und Hunden mit standardisierten Gerinnungstest verglichen und stellt eine mögliche Messmethode für die Heparintherapie beim Hund dar (DALLAP SCHAER et al., 2009; BABSKI et al., 2012).



#### **2.3.4. Thrombelastografie**

Die Thrombelastografie (TEG) ist das älteste Verfahren in der Gerinnungsdiagnostik und wurde 1948 zum ersten Mal vorgestellt (HARTERT, 1948e). Durch die TEG wird die globale Hämostase, also die Thrombozyteninteraktion mit der Gerinnungskaskade über Thrombozytenaggregation bis hin zur Fibrinbildung und Fibrinolyse, untersucht.

Hauptsächlich besteht das Gerät aus zwei Teilen: einer oszillierenden Küvette und einem frei hängenden Stift, der an einem Torsionsdraht befestigt ist. Die Blutprobe wird in die Küvette gegeben. Solange die Blutprobe flüssig ist, wird der Stift nicht durch die Oszillationen der Küvette beeinflusst. Sobald die Gerinnung in der Blutprobe einsetzt und sich Gerinnsel und Fibrinfäden bilden, werden die Bewegungen der Küvette auf den Stift übertragen. Es werden dabei kontinuierlich die viskoelastischen Eigenschaften des sich bildenden Blutgerinnsels gemessen und die kinetischen Änderungen als Thrombelastogramm graphisch aufgezeichnet (Abb. 8A). Dabei ergeben spezielle Defekte der Hämostase ein charakteristisches Thrombelastogramm (Abb. 8B) (MALLET & COX, 1992).

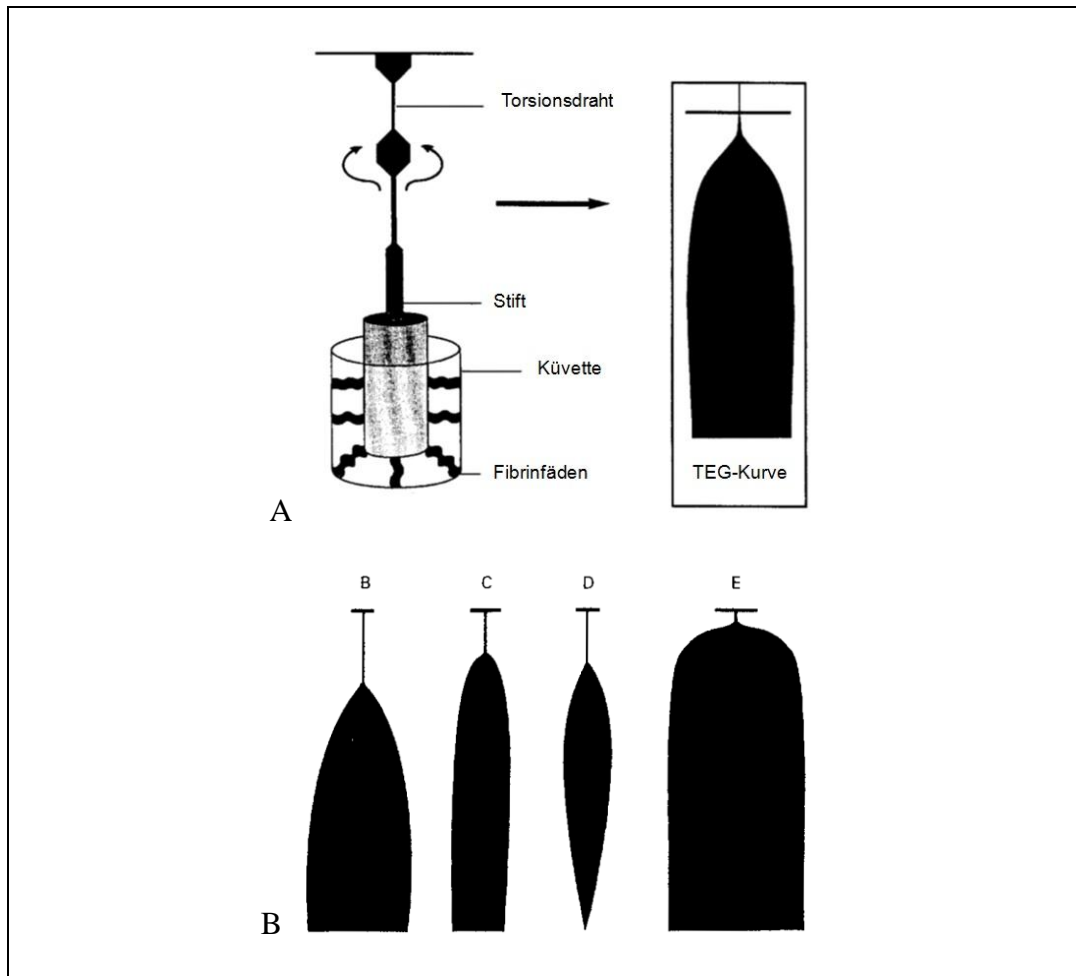


Abb. 8: A: Prinzip der Thrombelastografie. B: Beispiele für charakteristische Veränderungen der Thrombelastogramme bei speziellen Defekten der Hämostase: Hämophilie (B), Thrombozytopenie (C), Fibrinolyse (D), Hyperkoagulabilität (E). (MALLET & COX, 1992)

Es können folgende Parameter durch diese TEG- Kurve gemessen werden: Reaction time, K-time,  $\alpha$ -angle, maximum amplitude und lysis (Abb. 9). Die Bedeutung dieser Parameter und deren Beeinflussung sind in Tabelle 2 dargestellt.

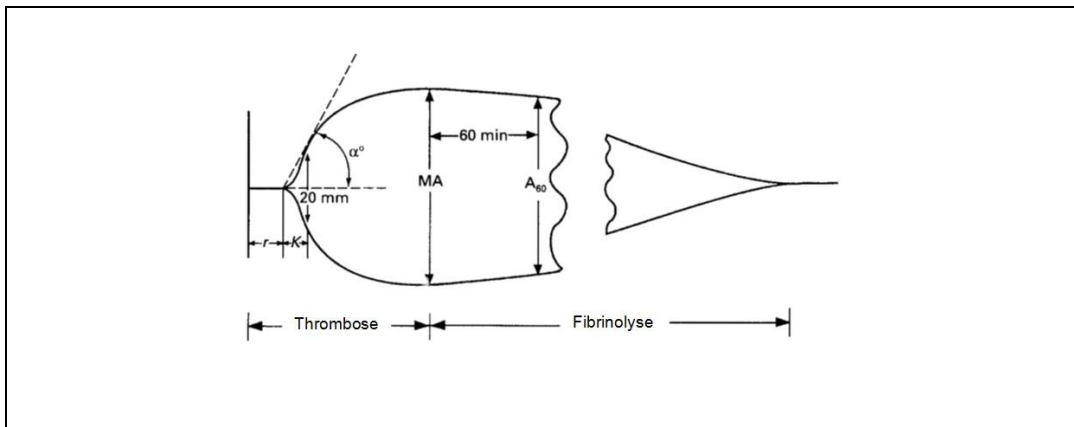


Abb. 9: Analyse eines Thrombelastogramms. r: reaction time, K: Clot formation time,  $\alpha$ :  $\alpha$ -angle, MA: maximale Amplitude,  $A_{60}$ : Amplitude nach 60 Minuten (MALLET & COX, 1992).

Tab. 2: Bedeutung der verschiedenen gemessenen Parameter bei TEG und ROTEM (JANDREY, 2012).

TEG	ROTEM	Messung von	Hauptsächliche Beeinflussung
Reaction time (R)	Clot time (CT)	Initiale Fibrinbildung	Gerinnungsfaktoren
Kinetik (K)	Clot formation time (CFT)	Geschwindigkeit der Gerinnungsbildung	Fibrinogen, Faktor XIII, Thrombozyten
Alpha angle ( $\alpha$ )	Alpha angle ( $\alpha$ )	Geschwindigkeit der Gerinnungsbildung	Faktor XIII, Thrombozyten, Fibrinogen
Maximale Amplitude (MA)	Maximum Clot firmness (MCF)	Maximale Gerinnungsfestigkeit	Thrombozyten, Fibrinogen
Lysis (LY30, LY60)	Clot lysis (CL30, CL60)	Fibrinolysis	Plasmin

Die Rotationsthembelastometrie (ROTEM) ist eine weiterentwickelte Form der TEG. Die Küvette ist hierbei stationär und der Stift rotiert, sodass dieses System nicht mehr anfällig für Erschütterungen ist. Diese Methode wird als point-of-care-Methode eingesetzt. Die Messung der Viskoelastizität und die Erstellung der Grafik geschieht bei diesem System über eine optische Lichtreflektion (KOL & BORJESSON, 2010). ROTEM wurde bereits für den Hund und für das Pferd validiert (PALTRINIERI et al., 2008; SMITH et al., 2010).

Die TEG misst die gesamte Hämostase einschließlich der Fibrinolyse. Diese Methode gibt also Auskunft über die komplexen Vorgänge der Hämostase (JANDREY, 2012).

Nachteile der Methode sind, dass nur niedrige Scherkräfte erreicht werden. Außerdem wird die Wirkung von Acetylsalicylsäure und Clopidogrel nicht, und die von GPIIb/IIIa nur teils erfasst. Eine spezielle Erfassung der Thrombozytenfunktion ist mit der TEG auch nicht möglich (JANDREY, 2012).

Die TEG wird zum perioperativen Monitoring bei Lebertransplantationen und Herzoperationen und zur Beurteilung von Hypo- und Hyperkoagulabilität, Monitoring von antithrombozytären Therapien, Mangel an Gerinnungsfaktoren, Hyperfibrinolyse oder auch in der Transfusionsmedizin herangezogen (CHEN & TERUYA, 2009; BISCHOF et al., 2010). Mit einer Zusatzmessung, dem sogenannten TEG Platelet Mapping, kann eine Thrombozytenhemmung durch die Zugabe spezieller Thrombozytenaktivatoren gesondert untersucht werden. Sie dient dem Monitoring von antithrombozytären Medikamenteneinnahmen (CHEN & TERUYA, 2009).

Es wurden viele Studien an gesunden und kranken Hunden mittels TEG durchgeführt (WIINBERG et al., 2005; BRAINARD et al., 2007; KRISTENSEN et al., 2008; WIINBERG et al., 2008; WAGG et al., 2009; WIINBERG et al., 2009; BACEK et al., 2011; JANDREY, 2012). Beim Hund ist die TEG nicht sensitiv für eine Thrombozytenhemmung durch Antagonisten wie Aspirin, Abciximab oder Clopidogrel (BRAINARD et al., 2010; BRAINARD et al., 2011).

### **2.3.5. Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie (Flow cytometry, FC) ist eine potente und vielseitige Methode, um eine Zelle näher zu charakterisieren. Für die FC wird die Blutprobe, je nach Fragestellung, mit unterschiedlichen kommerziell erhältlichen fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern (moAb) und Farben inkubiert, mit denen die zu untersuchenden Zellen gekennzeichnet werden. Nach der Aktivierung der Thrombozyten (oder anderen Blutzellen) werden die Zellen durch einen Zentralstrahl an einem Laser vorbei geleitet. In Abhängigkeit ihrer Größe, Gestalt und spezifischen Anfärbung senden die Zellen dabei charakteristische Lichtsignale aus. Optische Detektoren quantifizieren das Streulicht und die Fluoreszenzemission jeder Zelle, die dann entsprechend ihrer zu untersuchenden Eigenschaften (z. B. Zellrezeptoren, Oberflächenantigene, Granula) einsortiert wird. Zusätzlich werden die Zellen elektrostatisch sortiert. Das Analyseergebnis besteht aus der Summe der Einzelmessungen und kann als Punktediagramm (Abb. 10), bei dem jeder Punkt eine Zelle darstellt, oder als Konturendiagramm, bei dem

jede durchgezogene Linie die gleiche Anzahl an Zellen darstellt oder als Histogramm angezeigt werden. Durch das sogenannte Gating kann eine bestimmte Zellpopulation selektiert und gezielt untersucht werden. Zur Untersuchung von Thrombozyten wird als erstes ein moAb verwendet, der spezifisch für GPIb, IIb oder IIIa ist (z. B. anti- CD41 oder anti-CD-61), um die Thrombozyten in der Probe zusammen mit ihrem typischen Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht zu identifizieren. Der zweite moAb oder die Farbe ist dann spezifisch für das zu untersuchende Epitop, wie z. B. ein Membranprotein oder Granula. Dabei ist die Dichte des zu untersuchenden Epitops direkt proportional zur emittierten Fluoreszenz des moAb. Auch gibt es aktivierungsabhängige moAb, die z. B. Konformationsänderungen bei der Thrombozytenaktivierung messen können (PICKER, 2011).

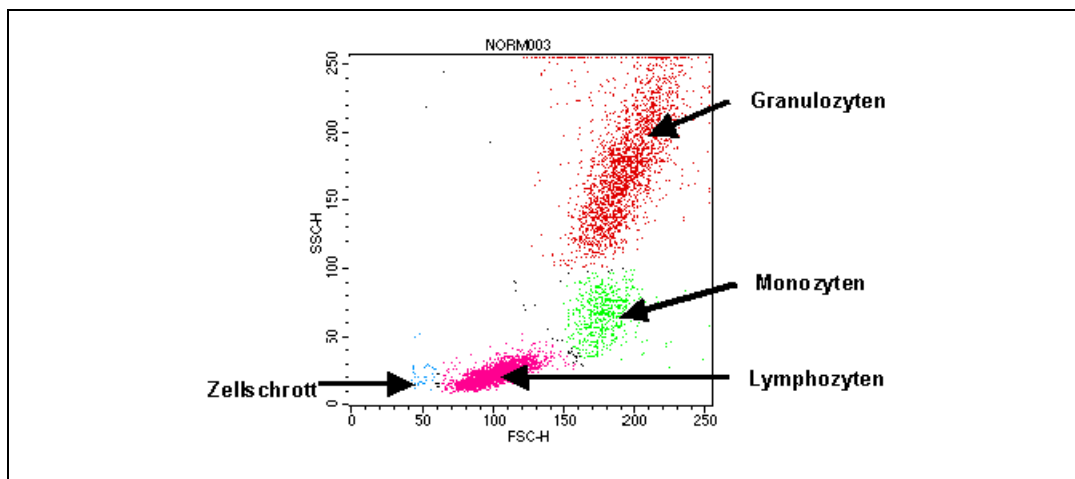


Abb. 10: Punktediagramm zur Darstellung der Ergebnisse einer Blutprobenanalyse mittels Durchflusszytometrie (KRUSE, 2012).

Vorteile der FC sind, dass nur ein sehr kleines Blutvolumen benötigt wird und spezifische Eigenschaften der Thrombozyten genau untersucht werden können (PICKER, 2011). Nachteilig an der FC ist, dass die Vorbereitung der Probe sehr aufwendig, die labortechnische Ausrüstung relativ teuer und hoch spezialisiertes und routiniertes Personal für die FC nötig ist (JANDREY, 2012).

In der Humanmedizin werden als Routineuntersuchung hauptsächlich die basalen Thrombozytenrezeptoren quantifiziert und der Inhalt der Thrombozytengranula ermittelt, da diese beiden Tests zum Screening von vererbten Thrombozytendefekten dienen (PICKER, 2011). Durch die FC können physikalische und antigenetische Eigenschaften der Thrombozyten, wie z. B. Expression von Oberflächenrezeptoren, gebundene Liganden, einzelne Komponenten der Granula, Interaktionen der Thrombozyten untereinander und

mit anderen Zellen quantitativ untersucht werden. Auch können die Effekte spezifischer Thrombozyteninhibitoren untersucht werden. Dabei können Thrombozyten im Ruhezustand und nach Stimulation durch verschiedene Agonisten untersucht werden (MCKENZIE et al., 1999; LINDEN et al., 2004).

### **2.3.6. Platelet Function Analyzer-100**

Der Platelet Function Analyzer-100 (PFA-100) ist ein point-of-care-Instrument zur Untersuchung der globalen primären Hämostase und Thrombozytenfunktion (MAMMEN et al., 1995; MAMMEN et al., 1998). Das Messprinzip des PFA-100 wurde erstmals 1995 beschrieben (KUNDU et al., 1995). Es werden die Verhältnisse in einem verletzten Gefäß simuliert. Eine Zitratblutprobe (800 - 1000 µl) wird unter konstantem Vakuum aus einem Reservoirbehälter durch eine Kapillare und eine mikroskopische Öffnung (150 µm), die mit Kollagen und Epinephrin oder ADP überzogen ist, aspiriert (Abb. 11). Durch die biochemische Stimulation der Agonisten und die hohen Scherkräfte werden die Thrombozyten aktiviert. Es kommt zur Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten und schließlich zur Bildung eines stabilen Pfropfes im Bereich der mikroskopischen Öffnung. Die Zeit in Sekunden, die benötigt wird, um die Öffnung durch den Thrombozytenpfropf vollständig zu verschließen, ist die Closure Time (CT) und ein Maß für die Thrombozytenfunktion. Sie ist sehr sensitiv für Defekte der Thrombozytenrezeptoren GPIb/V/IX und GPVI (Adhäsion) und GPIIb/IIIa (Aggregation). Je länger die CT, desto eingeschränkter die Thrombozytenfunktion (JANDREY, 2012).

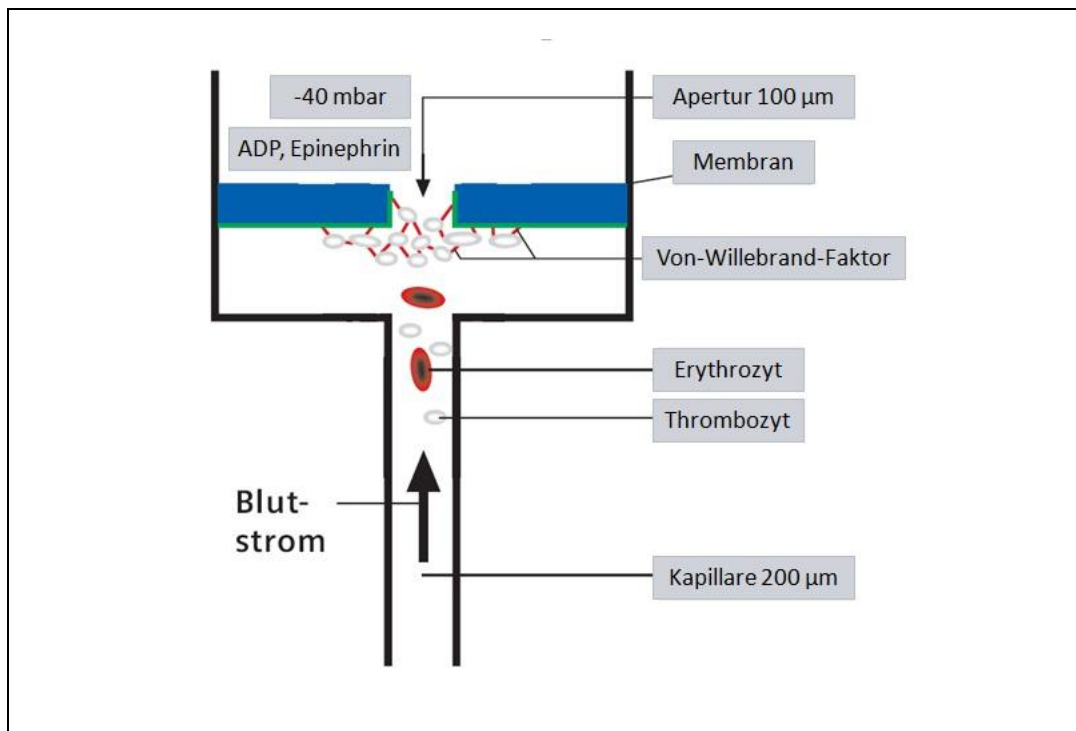


Abb. 11: Querschnitt durch eine Messzelle und Messprinzip des PFA-100. Zitratblut wird durch eine Kapillare und eine Öffnung, die von einer mit Kollagen und Epinephrin oder ADP beschichteten Membran umgeben ist. Die Thrombozyten werden aktiviert und bilden einen Pfropf. Die Zeit von Beginn der Aspiration bis zum vollständigen Verschluss der Öffnung durch den Thrombozytenpfropf ist die Closure Time (CT). ADP: Adenosindiphosphat.

Es sind zwei unterschiedliche Messzellen für den PFA-100 erhältlich, zum einen mit Kollagen und Epinephrin beschichtet, und zum anderen mit Kollagen und ADP beschichtet. In der Humanmedizin werden beide Messzellen zur Diagnostik verwendet. Da Epinephrin beim Hund kein effektiver Thrombozytenagonist ist, sind die Messzellen mit Kollagen und ADP für die Messung der CT beim Hund aussagekräftiger als die mit Kollagen und Epinephrin (CLEMMONS & MEYERS, 1984; FEINGOLD et al., 1986; KEIDEL & MISCHKE, 1998a; CALLAN & GIGER, 2001). Die Sensitivität und Spezifität für die Erkennung von Störungen der primären Hämostase beim Hund liegen bei 95,7% und 100% bei Verwendung von Messzellen mit Kollagen und ADP (CALLAN & GIGER, 2001).

Nachteilig am PFA-100 ist, dass er nicht spezifisch für einzelne Defekte ist, da der PFA-100 ein globales Testsystem der primären Hämostase darstellt (FAVALORO, 2001, 2008). Außerdem kann die CT durch Anämie,

Thrombozytopenie und Medikamente, die die primäre Hämostase beeinflussen (z. B. Acetylsalicylsäure, NSAIDs, Propofol) verlängert werden (CALLAN & GIGER, 2001; MISCHKE & KEIDEL, 2003; REINHART & FELIX, 2003). Der Hersteller des PFA-100 garantiert für die Richtigkeit der Ergebnisse, wenn der Hämatokrit  $\geq 35\%$  und die Thrombozytenanzahl  $\geq 150,000/\mu\text{l}$  beträgt. Beim Menschen ist bekannt, dass viele Faktoren, wie Alter, Geschlecht, Ernährung, Unterschiede in den Messzellen, unterschiedliche Konzentrationen des Zitratpuffers in den Proberöhrchen sowie regionale und tägliche Variationen, einen Einfluss auf die CT haben können (HEILMANN et al., 1997; JILMA, 2001; LUTZE & S.KROPF, 2004; FAVALORO, 2008). Vorteile dieser Messmethode sind, dass der PFA-100 eine relativ kleine Zitratblutprobe (800-1000  $\mu\text{l}$ ) benötigt, die Messung einfach durchführbar ist und maximal drei Minuten dauert (FAVALORO, 2001).

In der Humanmedizin wird der PFA-100 vor allem zur Überprüfung antithrombozytärer Therapien (Aspirin, Aspirin-like effects) verwendet. Weiterhin wird er als Screeningtest für das von-Willebrand-Syndrom und unterschiedliche Thrombozytendysfunktionen verwendet (FAVALORO, 2008).

In der Veterinärmedizin wurde der PFA-100 bisher eingesetzt um, Koagulopathien, Effekte von Kolloiden und die Wirkung von Acetylsalicylsäure zu untersuchen (CALLAN & GIGER, 2002; MISCHKE & KEIDEL, 2003; WIERENGA et al., 2007; BROOKS et al., 2009; SMART et al., 2009). Es wurden Referenzbereiche für Katzen, Pferde, Hunde und Schweine ermittelt (KEIDEL & MISCHKE, 1998b; ESCUDERO et al., 2001; SEGURA et al., 2005; JANDREY et al., 2008).

### **3. Störungen der Thrombozytenfunktion**

Störungen der Thrombozytenfunktion können in eine verminderte Thrombozytenfunktion und eine erhöhte Thrombozytenreaktivität eingeteilt werden.

#### **3.1. Verminderte Thrombozytenfunktion**

Eine verminderte Thrombozytenfunktion kann angeboren oder erworben sein.

##### **3.1.1. Hereditäre Thrombozytopathien**

Hereditäre Thrombozytopathien sind selten. Sie können eingeteilt werden in Defekte der Membranglykoproteine, Defekte der Signaltransduktion, Defekte der



Granulaspeicherung und Störungen der prokoagulanten Aktivität (CATALFAMO & DODDS, 2000; STOKOL, 2005). Bei Hunden sind verschiedene rassespezifische hereditäre Thrombozytopathien bekannt (Tab. 3). Die von-Willebrand-Erkrankung des Hundes ist ebenfalls angeboren und wird autosomal vererbt. Allerdings wird die von-Willebrand-Erkrankung nicht zu den Thrombozytenfunktionsstörungen im engeren Sinn, sondern zu den Störungen der primären Hämostase gezählt. Der vWF wird hauptsächlich von den Endothelzellen synthetisiert und gespeichert. Die caninen Thrombozyten enthalten nur wenig vWF (MCCARROLL et al., 1988). Die von-Willebrand-Erkrankung ist die häufigste angeborene Erkrankung der primären Hämostase des Hundes (BROOKS & CATALFAMO, 2010).

Tab. 3: Rassespezifische hereditäre Thrombozytopathien des Hundes (BROOKS & CATALFAMO, 2010)

Rasse	Defekt	Veränderungen
Otter Hound, Pyrenäenhund	Thrombasthenie	GPIIb/IIIa-Komplex-Mangel, GPIIb-Mutation, Störung Adhäsion und Gerinnselfreisetzung, keine/sehr reduzierte Aggregation
Basset, Landseer	Signaltransduktion	gestörter cAMP-Metabolismus, defekte GPIIb/IIIa-Aktivierung, gestörte Adhäsion
Spitz		CalDAG-GEF1-Mutation, Störung in der Adhäsion und Aggregation
Collie	Signaltransduktion und Speicherung	Störung in Freisetzung von Serotonin und ADP
Boxer	undefiniert	gestörte Aggregation durch ADP und Kollagen
Deutscher Schäferhund	Prokoagulantienmangel	Scott-Syndrom, gestörte Exposition von Phosphatidylserin und Prothrombinaseaktivität
Cocker Spaniel	Speicherung	Störung in Speicherung und Sekretion von ADP

ADP: Adenosindiphosphat, cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, CalDAG-GEF1: Calcium and Diacylglycerol Guanine Nucleotide Exchange Factor 1, GP: Glykoprotein.

### 3.1.2. Erworbene Thrombozytopathien

Erworbene Thrombozytenfunktionsstörungen können durch verschiedene

Ursachen, wie Medikamente, Infektionen, Organdysfunktionen oder Neoplasien, hervorgerufen werden. Bei einer erworbenen verminderten Thrombozytenfunktion müssen die Tiere nicht immer Spontanblutungen zeigen. Nach einem Trauma oder nach einer Operation treten dann aber oft schwere Blutungen auf (BOUDREAUX, 2006).

#### **3.1.2.1. Hydroxyethylstärke**

Hydroxyethylstärke-Präparate (HES) führen, wie auch andere Plasmaexpander, wie z. B. Gelantine und Dextrane, *in vivo* und *in vitro* zu einer Thrombozytendysfunktion (EGLI et al., 1997; VAN DER LINDEN & ICKX, 2006). Durch die Infusion von HES kommt es zu einer Hämodilution und dadurch zu einer relativen Thrombozytopenie. Zudem beeinträchtigt HES die Thrombozytenfunktion durch spezielle HES-abhängige Effekte auf zellulärer Ebene (DEUSCH et al., 2004; SCHARBERT et al., 2004; NIEMI & KUITUNEN, 2005).

Die physikochemischen Eigenschaften der HES-Präparate haben einen Einfluss auf das Ausmaß der Effekte. Ältere, langsam abbaubare HES-Lösungen (Hetastarch, Hexstarch, Pentastarch) zeigen deutlichere Effekte als neuere schnell abbaubare HES-Lösungen (Tetrastarch), welche nur sehr geringe oder auch keine Effekte auf die Thrombozytenfunktion haben (JAMNICKI et al., 1998a; OMAR et al., 1999; HUTTNER et al., 2000; JAMNICKI et al., 2000; STOGERMULLER et al., 2000; FRANZ et al., 2001).

HES führt zu einer verringerten agonisteninduzierten Expression und Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche (STOGERMULLER et al., 2000; FRANZ et al., 2001). Da GPIIb/IIIa bei einer Thrombozytenaktivierung wichtig für die Thrombozytenaggregation und irreversible Adhäsion an das Gefäßendothel ist, führt eine verminderte Expression und Aktivierung des GPIIb/IIIa zu einer verminderten Thrombozytenaggregation und -aktivierung. Intrazelluläre Signaltransduktionswege scheinen durch HES nicht beeinflusst zu werden. Der agonisteninduzierte Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration ist eine Schlüsselreaktion für die Thrombozytensekretion und wird in Anwesenheit von HES nicht oder nur geringgradig verändert (FRANZ et al., 2001; GAMSJAGER et al., 2002; HUTTNER et al., 2004). *In-vitro*-Experimente zeigten, dass HES-Moleküle in der Lage sind, unspezifisch an die Thrombozytenoberfläche zu binden (coating effect) (DEUSCH et al., 2003).

HES kann also die Reaktivität der Thrombozyten verringern, indem es den Zugang für Liganden zu Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche blockiert oder zytoplasmatische Membranstrukturen unspezifisch modifiziert. Dies könnte eine Verhinderung der Konformationsänderung des GPIIb/IIIa-Komplexes erklären. Die unterschiedlichen Mechanismen der Beeinflussung der Thrombozytenfunktion durch HES sind in Abbildung 12 zusammenfassend dargestellt.

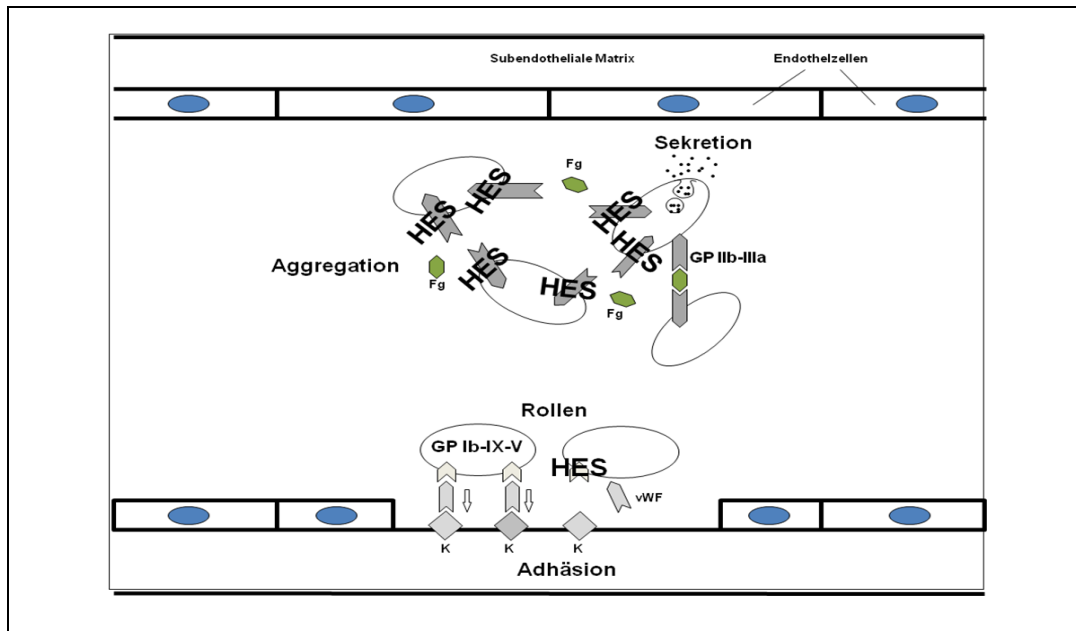


Abb. 12: Schematische Darstellung der Beeinflussung der Thrombozytenfunktion durch Hydroxyethylstärke. Fg: Fibrinogen, GP: Glykoprotein, HES: Hydroxyethylstärke, K: Kollagen.

In der Veterinärmedizin sind bis heute nur sehr wenige Studien veröffentlicht, die den Effekt von HES auf die Thrombozyten untersuchen. In einer *in-vitro*-Studie wurde bei zehn gesunden adulten Hunden der Effekt von HES 670/0,75, HES 600/0,7 und 0,9% NaCl auf die Thrombozytenfunktion mit dem PFA-100 in zwei Verdünnungen untersucht und verglichen (WIERENGA et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass beide HES-Lösungen in der höheren Verdünnung die Closure Time (CT) deutlicher verlängerten als NaCl. Die CT ist die Zeit in Sekunden, bis die Thrombozyten einen stabilen Pfropf bilden, und ist somit ein Maß für die Thrombozytenfunktion. In einer *in-vivo*-Studie bekamen sieben gesunde adulte Hunde 20 ml/kg HES 670/0,75 über eine Stunde intravenös verabreicht (SMART et al., 2009). Die CT war bis fünf Stunden nach Infusionsende signifikant verlängert und kehrte nach 24 Stunden wieder in den Referenzbereich zurück. In beiden Studien wurde geschlussfolgert, dass HES zu einer Thrombozytendysfunktion führt, die über den Effekt einer Hämodilution

hinausgeht. Eine Blutungsneigung oder Blutungsanzeichen, wie Petechien oder Ekchymosen, wurden bei keinem der Hunde während des Experiments festgestellt. In einer weiteren *in-vivo*-Studie, die den Effekt von 10 ml/kg HES 600/0,75 und Ringerlösung auf verschiedene hämostatische Parameter und die Blutungsneigung bei Hunden während orthopädischer Operationen verglich, konnten weder signifikante Veränderungen der Thrombozytenaggregation, noch eine erhöhte Blutungsneigung während der Operation festgestellt werden (CHOHAN et al., 2011). In einer neuen Studie wurde der Effekt von Hetastarch, HES 130/0,4 und 0,9% NaCl in drei verschiedenen Verdünnungen (18 ml/kg, 36 ml/kg, 54 ml/kg) auf die Hämostase mittels Thrombelastografie untersucht (BACEK et al., 2011). Diese Studie zeigte, dass Hetastarch und HES 130/0,4 die Hämostase bei einer Dosis von 54 ml/kg beeinträchtigen, wobei Hetastarch einen signifikant größeren Effekt hatte als HES 130/0,4. Da beide HES-Präparate auch signifikant unterschiedlich zu 0,9% NaCl waren, wurde geschlossen, dass diese Effekte nicht nur durch eine dilutionsbedingte Koagulopathie hervorgerufen wurden (BACEK et al., 2011).

#### **3.1.2.2. Urämie**

Eine Urämie führt beim Hund durch die Akkumulation von Harnstoff und anderen toxischen harnpflichtigen Substanzen zu einer verminderten Thrombozytenadhäsion. Beim Menschen wird zudem eine Beeinflussung der Funktion und Struktur des vWF durch Urämie angenommen. Dies wurde beim Hund bisher nicht beschrieben (BRASSARD & MEYERS, 1994). Weitere Mechanismen, die beim Menschen zu einer Thrombozytendysfunktion durch Urämie führen, sind die erhöhte Sekretion von Prostazyklinen und Stickstoffoxiden, welche die Thrombozytenreaktivität vermindern, und das Vorkommen von niedrig molekularen Abbauprodukten von adhäsiven Proteinen, die an GPIIb/IIIa binden und so die Bindung von Fibrinogen verhindern (KYRLE et al., 1988; NORIS et al., 1993; WALKOWIAK et al., 1994). Auch wird das Endothel durch erhöhte Konzentrationen an Thrombomodulin geschädigt (MEZZANO et al., 1997).

#### **3.1.2.3. Hyperviskositätssyndrom**

Bei einem Hyperviskositätssyndrom ist der Gehalt an Paraproteinen im Blut erhöht, sodass die Serumviskosität gesteigert ist. Durch die hohe Blutviskosität kann es zu einer Verstopfung der kleinen Gefäße im Endstromgebiet,

Sauerstoffunterversorgung im Gewebe und Hämostasestörungen kommen. Ein Hyperviskositätssyndrom kann z. B. bei einem multiplen Myelom, Ehrlichiose, Polyzythämie oder Leukämie auftreten. Es wurde gezeigt, dass die Erhöhung der Paraproteine zu einer verminderten Thrombozytenaggregation und -adhäsion durch unspezifische Bindung der Paraproteine an die Thrombozytenoberfläche führt (PERKINS et al., 1970; PENNY et al., 1971; LACKNER, 1973). Eine Fallstudie an einem Menschen mit einem multiplen Myelom und starken Blutungsneigungen zeigte allerdings auch eine spezifische Interaktion der monoklonalen Paraproteine mit dem Thrombozytenrezeptor GPIIIa (DIMINNO et al., 1986).

#### **3.1.2.4. Medikamente**

Thrombozytenaggregationshemmer verhindern die Aggregation von Thrombozyten und führen so zu einer (therapeutisch gewollten) Thrombozytendysfunktion. Zu ihnen zählen unterschiedliche Medikamente, die an verschiedenen Stellen des komplexen Prozesses der Thrombozytenaggregation eingreifen und einen unterschiedlichen Wirkungsmechanismus besitzen (Abb. 13). Der in der Veterinärmedizin gebräuchlichste Thrombozytenaggregationshemmer und das Mittel der ersten Wahl ist Acetylsalicylsäure (GERNERT, 2010).

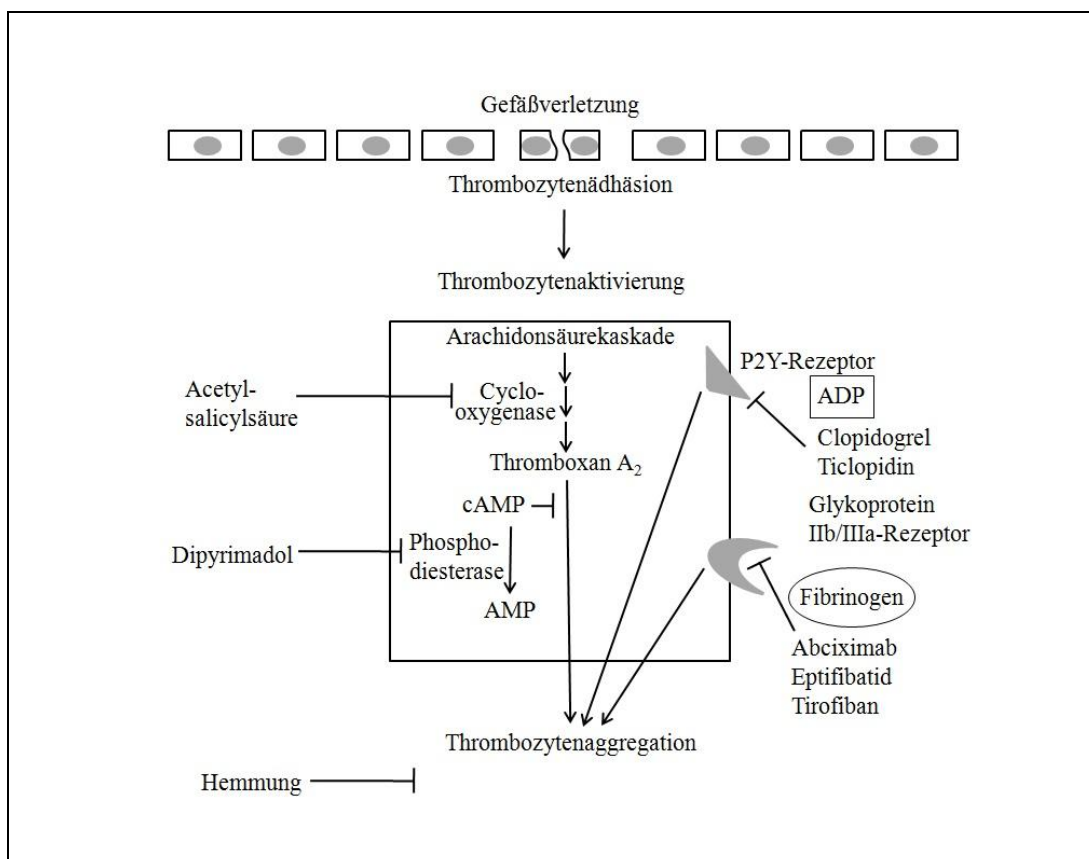


Abb. 13.: Wirkmechanismen von Thrombozytenaggregationshemmern. ADP: Adenosindiphosphat, AMP: Adenosinmonophosphat, cAMP: cykliches Adenosinmonophosphat (FREY & LÖSCHER, 2010).

Acetylsalicylsäure führt zu einer irreversiblen Hemmung der Cyclooxygenasen (COX) und somit auch zu einer Hemmung der Thromboxan-A<sub>2</sub>-Synthese (SCHAFER, 1999). Der Effekt der Acetylsalicylsäure bleibt über die gesamte Lebensdauer eines Thrombozyten (fünf bis sieben Tage) bestehen (SCHAFER, 1995; GERNERT, 2010). Bei Hunden hemmt Acetylsalicylsäure die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation, die ADP- und Thombin-induzierte Aggregation jedoch nur geringfügig oder gar nicht (BOUDREAUX et al., 1991).

Andere NSAIDs führen zu einer reversiblen COX-Hemmung, so dass die hervorgerufene Thrombozytendysfunktion nur transient und von der jeweiligen Halbwertszeit des Medikaments abhängig ist (SCHAFER, 1995). Da Thrombozyten nur COX-1 enthalten, führen selektive COX-2 Hemmer zu keiner Thrombozytendysfunktion (KAWAI et al., 1998).

Auch Clopidogrel wird in der Veterinärmedizin als Thrombozytenaggregationshemmer eingesetzt. Clopidogrel ist ein ADP-Rezeptor-Antagonist und führt durch seinen nicht kompetitiven P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-

Antagonismus zur Hemmung der Bindung von ADP an die Thrombozyten (GERNERT, 2010).

β-Laktamantibiotika können zu einer reversiblen Hemmung der Thrombozytenrezeptoren und zu einer irreversiblen Störung des agonisten-induzierten Kalziuminfluxes führen (BOUDREAUX, 2006). So verursacht z. B. Cephalothin beim Hund eine Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation (SCHERMERHORN et al., 1994).

Auch Kalziumkanalblocker und Barbiturate können die Thrombozytenreaktivität vermindern. Sie verhindern die Kalziumströme durch die Thrombozytenmembran (ROSTAGNO et al., 1991; BOUDREAUX, 2006).

### **3.1.2.5. Weitere Ursachen**

Die Thrombozytenfunktion kann auch im Rahmen von bestimmten Infektionen herabgesetzt sein. Beispiele hierfür sind Infektionen mit *Ehrlichia canis* oder dem feline Leucosevirus (KUEHN & GAUNT, 1985; BLUE et al., 1988; VARELA et al., 1997).

Einige Schlangengifte enthalten Peptide, die zu einer Thrombozytendysfunktion führen können. Z. B. bindet das Disintegrin-like Protein, welches Bestandteil vieler Schlangengifte ist, an GPIIb/IIIa der Thrombozyten und verhindert so kompetitiv die Bindung von Fibrinogen (RAHMAN et al., 1995). Das Gift der *Bothrops jararaca* führt zu einem Verlust der Kollagenrezeptoren und einem Abbau des vWF (KAMIGUTI et al., 1996).

Bei Menschen mit Leberzirrhose ist bekannt, dass die Hemmung der Thrombozytenaggregation bei diesen Patienten durch eine Störung in der Signaltransduktion hervorgerufen wird (LAFFI et al., 1988). Die Thrombozytenaggregation kann beim Hund durch Hepathopathien herabgesetzt sein (WILLIS et al., 1989).

## **3.2. Erhöhte Thrombozytenreaktivität**

Erworbene erhöhte Thrombozytenreaktivitäten tragen zu einem prothrombotischen Status bei (BOUDREAUX, 2006).

### **3.2.1. Nephrotisches Syndrom**

Bei Hunden und Menschen mit einem Nephrotischen Syndrom ist die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation verstärkt. Es wird angenommen, dass die

Hyperreaktivität der Thrombozyten mit der Hypoalbuminämie zusammenhängt (GREEN et al., 1985; GOUBRAN & MAKLADY, 1988; MACHLEIDT et al., 1989).

### **3.2.2. Therapie mit Erythropoetin**

Die Gabe von Erythropoietin führt zu einer Erhöhung der Anzahl der retikulierten Thrombozyten und einer Hyperreaktivität der Thrombozyten (WOLF et al., 1997). Bei Hunden mit einer autoimmun-medierten Anämie könnten die physiologischen erhöhten Konzentrationen an Erythropoietin zu dem bei dieser Krankheit häufigen prothrombotischem Status beitragen (BOUDREAUX, 2006).

### **3.2.3. Infektionen**

Hunde mit einer Herzwurm-Erkrankung können eine verstärkte ADP-induzierte Thrombozytenaggregation und eine erhöhte Serotoninfreisetzung zeigen. Gründe für die erhöhte Thrombozytenreaktivität könnten Exkrete der Parasiten, Hämolyse oder Veränderungen des Endothels sein (BOUDREAUX et al., 1989).

### **3.2.4. Neoplasien**

Studien an Hunden mit verschiedenen malignen Tumoren zeigten eine erhöhte Bereitschaft der Thrombozyten zur Aggregation (MCNIEL et al., 1997; THOMAS & ROGERS, 1999). Vermutete Mechanismen sind eine Erhöhung von Serumfaktoren, die zur Thrombozytenaggregation führen, ein verändertes Lipidmuster der Plasmamembran und eine erhöhte Anzahl an jungen, aktiveren Thrombozyten. Im Laufe der Erkrankung kann sich die Art der Thrombozytenfunktionsstörung ändern (BAKER & MANOHARAN, 1988). In einer Studie mit 49 Hunden mit Tumoren wurde die hämostatische Funktion mittels tissue factor-activated thrombelastography evaluiert. Bei 57 % der Hunde wurde eine hämostatische Dysfunktion gezeigt. Dabei hatten davon 50 % einen hyperreaktiven und 17 % einen hyporeaktiven Status (KRISTENSEN et al., 2008).

### **3.2.5. Diabetes mellitus**

Bei Menschen mit insulinabhängigem und insulinunabhängigem Diabetes mellitus kann eine Steigerung der Thrombozytenreaktivität vorkommen. Bei diesen Patienten wurden große aktivierte Thrombozyten mit einer erhöhten Anzahl von Rezeptoren (GPIb, GPIIb/IIIa) und einer gesteigerten Fähigkeit zur Thromboxanbildung gefunden. Dies könnten Gründe für den mit Diabetes



mellitus einhergehenden prothrombotischen Status und die diabetische Vaskulopathie sein (TSCHOEPE et al., 1993).

### **3.2.6. Asthma**

Bei Menschen mit bronchialem Asthma setzten die Thrombozyten vermehrt Kalzium aus ihren Speichern frei. Während eines Asthmaanfalls werden Plättchenfaktor 4 und  $\beta$ -Thromboglobulin freigesetzt. Dies deutet auf eine Thrombozytenaktivierung und ein Mitwirken an der Entzündungsreaktion hin (MORITANI et al., 1998).

### III. PUBLIKATION

#### 1. In vitro effect of hydroxyethyl starch 130/0.42 on canine platelet function

### In vitro effect of hydroxyethyl starch 130/0.42 on canine platelet function

Janine Classen, DVM; Katja N. Adamik, DVM, Dr med vet; Karin Weber, DVM, Dr med vet; Stephanie Rubenbauer; Katrin Hartmann, DVM, Dr med vet, Dr habil

**Objective**—To evaluate the effect of 6% hydroxyethyl starch (HES) solution, with a molecular weight of 130 kDa and a degree of substitution of 0.42, on canine platelet function in vitro.

**Samples**—Blood samples from 31 healthy adult dogs.

**Procedures**—Citrat blood was diluted with saline (0.9% NaCl) solution or HES 130/0.42 in ratios of 1:9 (ie, 1 part saline solution or HES 130/0.42 and 9 parts blood) and 1:3. Platelet plug formation time (closure time [Ct]) was measured with a platelet function analyzer and cartridges coated with collagen and ADP.

**Results**—Median baseline Ct with citrated blood was 84.0 seconds (interquartile range, 74.5 to 99.5 seconds). Results obtained with 1:9 dilutions with saline solution and HES 130/0.42 were not significantly different from baseline results. The 1:3 dilutions with saline solution and HES 130/0.42 resulted in median Cts of 96.0 seconds (interquartile range, 85.5 to 110.8 seconds) and 112.0 seconds (92.0 to 126.0 seconds), respectively. Results obtained with both 1:3 dilutions were significantly different from baseline results. The Ct obtained with the HES dilution was also significantly different from that of the 1:3 dilution with saline solution.

**Conclusions and Clinical Relevance**—Saline solution and HES 130/0.42 in a 1:3 dilution affected canine platelet function by prolonging Cts. The HES 130/0.42 had a significantly greater effect on canine platelets than did saline solution. (*Am J Vet Res* 2012;73:1908–1912)

Hydroxyethyl starch products are artificial non-protein colloids. They are used in veterinary medicine for intravascular volume expansion. They consist of polymers of natural amylopectin, which are chemically modified by hydroxyethylation at the glucose subunit carbon atoms C2, C3, or C6. Hydroxyethyl starch can be classified according to mean Mw, Ms, concentrations, ratio of the C2:C6 hydroxyethylation, the origin of raw material, and the solvent.<sup>1,2</sup> These structural aspects modulate the effect on blood coagulation.<sup>3</sup> The greater the Mw, the higher the C2:C6 ratio, and especially the higher the Ms, the more an HES product will affect coagulation, and this may lead to an increased risk for hemorrhage.<sup>3–8</sup> Hydroxyethyl starch molecules have a specific antiplatelet effect. Among other effects, they can attenuate the availability of the GPIIb/IIIa receptor on the platelet surface, which alters platelet aggregation and clot formation.<sup>9</sup>

Received December 5, 2011.

Accepted February 13, 2012.

From the Clinic of Small Animal Medicine (Classen, Weber, Hartmann) and the Institute of Statistics (Rubenbauer), Ludwig Maximilian University, Veterinaerstrasse 13, 80539 Munich, Germany; and the Clinic of Small Animals, Department of Clinical Veterinary Medicine, Vetsuisse University Bern, Laenggassstrasse 128, 3012 Bern, Switzerland (Adamik).

Address correspondence to Dr. Adamik (katja.adamik@vetsuisse.unibe.ch).

#### ABBREVIATIONS

COL-ADP	Collagen and adenosine diphosphate
Ct	Closure time
HES	Hydroxyethyl starch
Ms	Molar substitution
Mw	Molecular weight
PFA	Platelet function analyzer

A third-generation, potato-based plasma volume expander solution with an Mw of 130 kDa, an Ms of 0.42, and a C2:C6 ratio of 6:1 (HES 130/0.42) was used in this study and is thought to have less influence on platelet function and coagulation than the older high-Mw and high-Ms HES products.<sup>1,10–12</sup> The previous HES products routinely used in dogs, HES 670/0.75 and HES 670/0.7, lead to platelet dysfunction in dogs in vitro and in vivo.<sup>13,14</sup> However, currently there are few reports of studies investigating the effect of newer HES products on canine platelet function. A recent in vitro study<sup>9</sup> revealed that hetastarch 130/0.4 has less effect on coagulation, compared with hetastarch, in healthy dogs, as measured by thrombelastography.

Thrombelastography enables a global assessment of hemostatic function, beginning at the interaction of platelets with the protein coagulation cascade to the initial platelet-fibrin interaction via platelet aggregation and clot strengthening to fibrin cross-linkage and clot lysis.<sup>15</sup> The PFA is a commercially available point-



of-care instrument for investigation of primary hemostasis and platelet function in vitro.<sup>16,17</sup> In contrast to thrombelastography, the PFA measures platelet-related primary hemostasis and therefore platelet adhesion, aggregation, and primary platelet plug formation.<sup>17</sup> The PFA has high sensitivity in the assessment of human and canine platelet function disorders and is a less expensive, easier, and faster alternative to platelet aggregometry.<sup>16-19</sup> The cartridge coated with COL-ADP yields more reproducible results in determination of Ct in dogs, compared with a cartridge coated with collagen and epinephrine, because epinephrine is not an effective agonist to platelet activation in dogs.<sup>18-21</sup> When a COL-ADP cartridge is used, the clinical sensitivity and specificity to identify canine primary hemostasis disorders are 95.7% and 100%, respectively.<sup>18</sup> Anemia and thrombocytopenia, as well as drugs that affect primary hemostasis like acetylsalicylic acid, nonsteroidal anti-inflammatories, and propofol, result in increased Cts.<sup>18,19,22-24</sup> The manufacturer of the PFA guarantees the accuracy of the results when Hct is  $\geq 35\%$  and the platelet count is  $\geq 150,000$  platelets/ $\mu\text{L}$ . The objective of the study reported here was to investigate the effect of HES 130/0.42<sup>b</sup> on in vitro platelet function in canine blood by use of the PFA as compared with saline (0.9% NaCl) solution, in 2 dilutions. We hypothesized that HES 130/0.42 would have a more pronounced effect on in vitro platelet function, compared with saline solution.

### Materials and Methods

**Animals**—The study protocol was approved by the Department of Animal Welfare of the German federal government. Thirty-one healthy adult dogs owned by hospital staff and by consenting clients of the Clinic of Small Animals of the Ludwig Maximilian University were studied. The 31 dogs ranged in age from 1 to 11 years (mean  $\pm$  SD,  $6.23 \pm 2.88$  years). Mean  $\pm$  SD weight was  $26.55 \pm 10.46$  kg. Eighteen dogs were females (8 sexually intact; 10 spayed) and 13 were males (4 sexually intact; 9 castrated); there were 12 mixed-breed dogs, 4 Flat-Coated Retrievers, 3 Golden Retrievers, 2 Labrador Retrievers, 2 Beagles, 2 Australian Cattle Dogs, 1 Vizsla, 1 Boxer, 1 Leonberger, 1 Basset Hound, 1 Dalmatian, and 1 Collie. Dogs were considered to be healthy on the basis of history, physical examination, and laboratory findings (CBC, serum biochemical analyses, and urinalysis). Exclusion criteria included history of nonphysiologic bleeding, any chronic or recent illness, and administration of medication known to alter platelet function during the 4 weeks prior to the study. Food was withheld from all dogs for at least 12 hours prior to blood sample collection. Dogs were only included if they had an Hct of  $\geq 35\%$ , a platelet count of  $\geq 150,000$  platelets/ $\mu\text{L}$ , a leukogram within reference range, and no pathological findings in serum creatinine concentration, urine dip stick tests, and urine specific gravity.

**Blood samples**—For determination of platelet function, the PFA<sup>c</sup> was used. The PFA system has been described in detail elsewhere.<sup>25</sup> Briefly, the conditions of vessel wall damage are simulated in this instrument. A citrated blood sample (800 to 1,000  $\mu\text{L}$ ) is aspirated

under constant vacuum from a reservoir through a capillary microscopic aperture cut into a membrane, which is coated with collagen and epinephrine or ADP.<sup>4</sup> These biochemical stimuli and the high shear flow result in platelet attachment, activation, and aggregation and finally in a stable platelet plug. The time in seconds needed for occluding the aperture by plug formation is called Ct and is indicative of platelet function. Fifteen milliliters of venous blood were obtained with minimal vein trauma from each dog via cephalic, lateral saphenous, or jugular venipuncture (20-gauge needle). After the first drops of blood were discarded, the samples were distributed under continuous blood flow directly into 3.8-mL tubes<sup>e</sup> containing 3.8% buffered sodium citrate solution (1 part anticoagulant to 9 parts blood). In addition, a tube containing K-EDTA for the CBC and a plain tube for serum biochemical analysis were used. According to the manufacturer's recommendations, the citrated blood samples for platelet function analysis were incubated for 30 minutes (stabilization) at room temperature (approx 24°C) prior to analysis. All measurements were completed within 4 hours after blood sample collection. Closure time was measured in duplicate by use of a PFA and COL-ADP. The cartridges were stored at 4°C and warmed to room temperature for 15 minutes before use. Baseline Ct was measured by use of undiluted blood samples (800  $\mu\text{L}$ ). Citrated blood was divided into aliquots and diluted with saline solution or HES 130/0.42 at a ratio of 1:9 (1 part saline solution or HES and 9 parts blood; 80  $\mu\text{L}$  of saline solution or HES and 720  $\mu\text{L}$  of blood) and 1:3 (1 part saline solution or HES and 3 parts whole blood; 200  $\mu\text{L}$  of saline solution or HES and 600  $\mu\text{L}$  of blood). After incubation at room temperature for 10 minutes, Cts were measured. Samples with error indication were discarded and repeated.

**Statistical analysis**—Because repeated duplicated measurements were available, an ordinary least squares linear regression analysis with mixed effects was conducted. That model included a random intercept to handle the unobserved heterogeneity. The random intercept is assumed to be normally distributed. Normality of the residuals was ensured by logarithmic transformation of the dependent variable (Ct). For an identified significant effect, all pairwise multiple comparisons were performed via the Bonferroni adjustment. A *P* value  $< 0.05$  was considered to be significant. Statistical analysis was performed with software.<sup>f</sup> Data are expressed as median and interquartile range values.

### Results

Median Hct was 46% (43% to 50%), and the platelet count was 261,000 platelets/ $\mu\text{L}$  (199,000 to 280,000 platelets/ $\mu\text{L}$ ). Median Ct (Figure 1) for undiluted blood was 84.0 seconds (74.5 to 99.9 seconds). Median Cts for the 1:9 dilution with saline solution and HES 130/0.42 were 84.5 seconds (75.0 to 99.8 seconds) and 88.0 seconds (81.0 to 102.8 seconds), respectively. The 1:3 dilution of blood with saline solution and HES 130/0.42 resulted in Cts of 96.0 seconds (85.5 to 110.8 seconds) and 112.0 seconds (92.0 to 126.0 seconds), respectively.

The Cts from the 1:9 dilution of blood with saline solution (*P* = 1.000) and HES 130/0.42 (*P* = 0.982) were



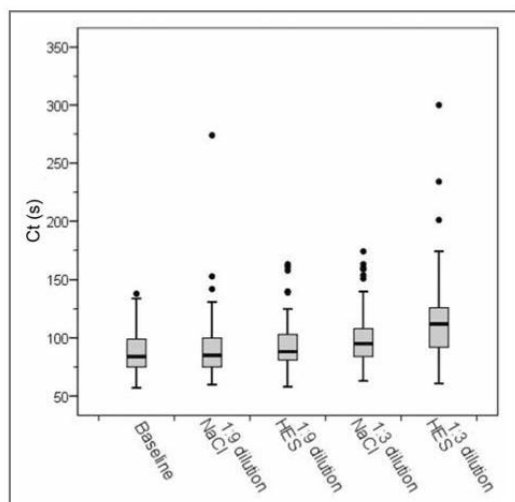


Figure 1—Box-and-whisker plots of Cts (duplicate measurements) for undiluted citrated blood samples from 31 healthy dogs and for samples diluted with saline (0.9% NaCl) solution and HES 130/0.42. The box indicates interquartile range, the thick line in the box indicates median value, whiskers indicate range, and circles indicate outliers. NaCl = Saline solution.

not significantly different from the undiluted blood (baseline). The Cts from the 1:3 dilution of blood with saline solution and HES 130/0.42 were significantly ( $P < 0.001$ ) longer, compared with baseline. The Ct resulting from a 1:3 dilution of blood with HES 130/0.42 was significantly ( $P = 0.023$ ) longer than the Ct of the 1:3 dilution of blood with saline solution and the 1:9 dilutions of blood with saline solution ( $P < 0.001$ ) and HES 130/0.42 ( $P < 0.001$ ). The 1:3 dilution of blood with saline solution resulted in a Ct that was significantly ( $P = 0.003$ ) longer than that of the 1:9 dilutions of blood with saline solution and significantly ( $P = 0.031$ ) shorter than that of the 1:3 dilution with HES 130/0.42.

### Discussion

In this study, the *in vitro* effect of HES 130/0.42 and saline solution in 2 dilutions on canine platelet function was evaluated by use of the PFA. To improve safety and pharmacological properties while maintaining the volume efficacy of previous HES generations, newer third-generation starch-based plasma volume expanders have been developed. Currently, there are 2 third-generation HES solutions on the market: waxy maize-derived HES 130/0.4 and potato-derived HES 130/0.42; these have known physicochemical differences.<sup>1</sup> A study<sup>26</sup> comparing the effect on coagulation of 3 HES products with differing Mw but the same Ms (HES 130/0.42, 500/0.42, and 900/0.42) suggests that the Mw has less effect than Ms regarding coagulation.

The 1:9 and 1:3 dilutions result in doses of 10 and 30 mL/kg for IV fluid substitution, which are common doses of HES during resuscitation of hypovolemic patients and patients in hemorrhagic shock. In situations of refractory shock, even higher amounts of HES are used, in an attempt to restore effective circulating vol-

ume.<sup>27,28</sup> The recommended dose of high-Mw HES is 20 mL/kg/d.<sup>28</sup> The newer low-Mw HES may be used at doses up to 50 mL/kg/d.<sup>1,29</sup>

In the present study, the 1:3 dilutions with either saline solution or HES 130/0.42 significantly prolonged Cts, whereas the 1:9 dilutions did not. The prolongation of Ct with saline solution can be explained by the effect of dilution. Crystalloids cause alterations because of simple dilution of clotting factors. The Ct of the 1:3 dilution with HES 130/0.42 was significantly prolonged, compared with the 1:3 dilution with saline solution. This indicates that the HES 130/0.42 in a 1:3 dilution exaggerates the dilutional effect on platelet function and that HES 130/0.42 has a more pronounced effect on platelet function *in vitro* than saline solution. Because a significant effect of HES 130/0.42 was only detected in a 1:3 dilution, the effect appears to be dose dependent. Hydroxyethyl starch products compromise hemostasis and platelet function via either nonspecific dilutional effects, specific effects, or both.<sup>30</sup> They are known to induce acquired von Willebrand disease, favor fibrinolysis through the incorporation of HES molecules in the clot, and alter platelet aggregation by modification of the platelet membrane and inhibition of conformational activation of the GPIIb/IIIa complex.<sup>12,31–33</sup> Another recent study<sup>9</sup> revealed that HES macromolecules are able to bind to platelets and thus impair the access of ligands to the platelet fibrinogen receptor (GPIIb/IIIa). These mechanisms provide a plausible explanation for the observed prolongation of Ct.

In the present study, the Cts for citrated blood of 31 healthy dogs ranged from 57 to 138 seconds with a mean  $\pm$  SD of  $87.7 \pm 18.9$  seconds and a median of 84.0 seconds (interquartile range, 74.5 to 99.5 seconds). Measurements in other studies using PFA-100 and COL-ADP resulted in mean  $\pm$  SD Cts of  $67 \pm 7.8$  seconds with a range of 52 to 86 seconds ( $n = 29$ ) in one study<sup>18</sup> and  $57.6 \pm 5.9$  seconds with a range of 48 to 77 seconds (58) in another.<sup>34</sup> A median Ct of 73 seconds with a 2.5% to 97.5% quantile range of 53 to 98 seconds ( $n = 136$ ) is also reported.<sup>22</sup> These values are not exactly identical to the results of the present study. It is known that many factors like age, sex, nutrition, differences of the test cartridge, different citrate concentrations in the sample tubes, regional variations, and daily variations may have an effect on Cts in humans, which is probably also the case in dogs.<sup>35–38</sup> It is also known that the PFA should be considered a semiquantitative method.<sup>37</sup> Although the manufacturer of the PFA only validated Cts to be accurate for a platelet count of  $> 150,000$  platelets/ $\mu$ L and Hct of  $> 35\%$ , a veterinary study<sup>18</sup> found the PFA to be accurate even for Hct  $\geq 25\%$  and for platelet count  $\geq 100,000$  platelets/ $\mu$ L. In the present study, Hct and platelet count in 1:3 dilution had been calculated. The median Hct would be 35% with a range of 29% to 47%, and the range of platelet counts would be 113,250 to 271,500 platelets/ $\mu$ L with a median of 195,750 platelets/ $\mu$ L. Therefore, Cts measured with these 1:3 diluted samples can be considered an accurate evaluation of platelet function. In line with our results, various *in vitro* studies<sup>39,40</sup> have found that HES 130/0.4 has a greater effect on platelet function and hemostasis than crystalloids. These findings are similar to the find-



ings of Liu et al.<sup>40</sup> who studied the influence of HES 130/0.4, HES 200/0.5, and saline solution on human platelet function in vitro in different dilutions by using a PFA, platelet aggregometry, and erythrocyte sedimentation rate. They found that both HES solutions significantly prolonged Cts in a dose-dependent manner and to a significantly greater extent than saline solution. An in vivo study<sup>41</sup> compared the influence of HES 130/0.4, HES 200/0.5, and lactated Ringer's solution on platelet function and hemodynamics in 40 adult humans. That study found a significant prolongation of Cts after an infusion of only 10 mL/kg with both HES solutions, whereas lactated Ringer's solution in the same dose did not result in prolongation of Cts. In contrast, another study<sup>12</sup> found no significant effect on Ct after IV infusion (10 mL/kg) of HES 130/0.38 to 0.45 in healthy human patients. This discrepancy may be due to different patient populations. In the present in vitro study, there was also no effect with a simulated dose of 10 mL/kg.

In a European prospective multicenter observational postauthorization safety study in 316 children receiving HES 130/0.42 (mean  $\pm$  SD, 11  $\pm$  4.8 mL/kg) perioperatively, no serious adverse drug reactions directly related to HES were reported. The probability of serious adverse drugs reactions like bleeding was < 1%.<sup>42</sup>

In veterinary medicine, only a few reports regarding the effect of HES on canine platelet function and coagulation are published to date. In a recent study,<sup>a</sup> the in vitro effects of HES 130/0.4, hetastarch, and saline solution in healthy dogs were compared by use of thrombelastography. This revealed that HES 130/0.4 causes less effects on coagulation than hetastarch in a high dilution, and it was concluded that a dilutional coagulopathy does not seem to be the only cause of the HES 130/0.4-induced effect on coagulation. In another study,<sup>13</sup> the in vitro effect of HES 670/0.75 and HES 600/0.7 on platelet function in dogs measuring Cts with a PFA in 2 dilutions was compared. Those investigators found a significant effect only in the highest dilution (1:3), and the Ct at 1:3 dilution for HES 670/0.75 was significantly higher than for dilution with saline solution. Further canine in vitro studies with different HES preparations are necessary to determine whether the current findings in human medicine, which indicate that HES products with lower Mw and Ms have a significantly reduced effect on coagulation compared with older products, are also true for dogs. An in vivo study<sup>14</sup> revealed that a 20 mL/kg dose of HES 600/0.75/kg prolongs canine Ct, as measured by PFA, for up to 5 hours after injection, although Ct returned to baseline within 24 hours. No clinical signs of bleeding, such as petechiae or ecchymoses, were observed during the experimental period. In addition, no significant change in platelet aggregation (measured with an electronic aggregometer) and no clinical bleeding during surgery were observed in a recent study<sup>43</sup> that compared the effect of a 10 mL/kg dose of HES 600/0.75/kg or the same volume of lactated Ringer's solution on hemostatic variables and bleeding in dogs anesthetized for orthopedic surgery. Because of these results, the more important question is how clinically relevant these in vitro impairments of platelet function really are. Although there was a significant difference between the Cts in the 1:9

and 1:3 dilutions and especially between the 1:3 dilution with saline solution and HES 130/0.42, there was a substantial overlap in measured values in the present study. Despite the reported high clinical sensitivity and specificity in the identification of primary hemostatic disorders in dogs,<sup>18</sup> it can be concluded that the clinical relevance of these in vitro findings is not obvious.

The present study had the limitations of in vitro models. Compensatory mechanisms like buffering, pH control, and electrolyte environment are not the same as in vivo. Also, the metabolic degradation of HES molecules by plasma  $\alpha$ -amylase and the contribution of endothelial and vascular factors are restricted. Even if the PFA simulates the conditions of a damaged vessel under high shear flow, it can only mimic the in vivo conditions. Consequently, the results could not be directly translated to the clinical setting. It can be concluded that HES 130/0.42 in a high concentration (30 mL/kg) prolonged Ct in vitro more than a dilutional effect with saline solution in the same concentration. These findings indicate that, despite the lower Mw and the lower Ms, HES 130/0.42 has a more pronounced effect regarding in vitro platelet function than saline solution. Therefore, possible adverse effects, in particular impairment of hemostasis, should be kept in mind, especially in patients with already compromised hemostasis.

- a. Bacek LM, Martin LG, Spangler EA, et al. Determination of the in vitro effects of two forms of hydroxyethyl starch solutions on thromboelastography and coagulation parameters in the healthy dogs (abstr). *J Vet Emerg Crit Care* 2011;21(suppl 1):S26–S27.
- b. Venofundin, B Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany.
- c. Platelet Function Analyzer-100, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Germany.
- d. Dade PFA Collagen/ADP Test Cartridge, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany.
- e. 3.8-mL S-Monovette for PFA-100, SARSTEDT, Nürnberg, Germany.
- f. SPSS Advanced Statistics, version 21.0, IBM Germany GmbH, Ehningen, Germany.

## References

1. Westphal M, James MF, Kozek-Langenecker S, et al. Hydroxyethyl starches: different products—different effects. *Anesthesiology* 2009;111:187–202.
2. Jungheinrich C, Neff TA. Pharmacokinetics of hydroxyethyl starch. *Clin Pharmacokinet* 2005;44:681–699.
3. Treib J, Haass A, Pindur G. Coagulation disorders caused by hydroxyethyl starch. *Thromb Haemost* 1997;78:974–983.
4. Treib J, Haass A, Pindur G, et al. Influence of intravascular molecular weight of hydroxyethyl starch on platelets. *Eur J Haematol* 1996;56:168–172.
5. Treib J, Haass A, Pindur G, et al. HES 200/0.5 is not HES 200/0.5. Influence of the C2/C6 hydroxyethylation ratio of hydroxyethyl starch (HES) on hemorheology, coagulation and elimination kinetics. *Thromb Haemost* 1995;74:1452–1456.
6. von Roten I, Madjdpour C, Frascarolo P, et al. Molar substitution and C2/C6 ratio of hydroxyethyl starch: influence on blood coagulation. *Br J Anaesth* 2006;96:455–463.
7. Treib J, Haass A, Pindur G, et al. All medium starches are not the same: influence of the degree of hydroxyethyl substitution of hydroxyethyl starch on plasma volume, hemorrheologic conditions, and coagulation. *Transfusion* 1996;36:450–455.
8. Treib J, Haass A, Pindur G, et al. Increased haemorrhagic risk after repeated infusion of highly substituted medium molecular weight hydroxyethyl starch. *Arzneimittelforschung* 1997;47:18–22.
9. Deusch E, Gamsjager T, Kress HG, et al. Binding of hydroxyethyl starch molecules to the platelet surface. *Anesth Analg* 2003;97:680–683.



10. Konrad CJ, Markl TJ, Schuepfer GK, et al. In vitro effects of different medium molecular hydroxyethyl starch solutions and lactated Ringer's solution on coagulation using SONOCLOT. *Anesth Analg* 2000;90:274–279.
11. Kozek-Langenecker SA. Effects of hydroxyethyl starch solutions on hemostasis. *Anesthesiology* 2005;103:654–660.
12. Franz A, Braunlich P, Gamsjäger T, et al. The effects of hydroxyethyl starches of varying molecular weights on platelet function. *Anesth Analg* 2001;92:1402–1407.
13. Wierenga JR, Jandrey KE, Haskins SC, et al. In vitro comparison of the effects of two forms of hydroxyethyl starch solutions on platelet function in dogs. *Am J Vet Res* 2007;68:605–609.
14. Smart L, Jandrey KE, Kass PH, et al. The effect of hetastarch (670/0.75) in vivo on platelet closure time in the dog. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2009;19:444–449.
15. Mallett SV, Cox DJ. Thrombelastography. *Br J Anaesth* 1992;69:307–313.
16. Mammen EF, Alshameeri RS, Comp PC. Preliminary data from a field trial of the PFA-100 system. *Semin Thromb Hemost* 1995;21(suppl 2):113–121.
17. Mammen EF, Comp PC, Gosselin R, et al. PFA-100 system: a new method for assessment of platelet dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 1998;24:195–202.
18. Callan MB, Giger U. Assessment of a point-of-care instrument for identification of primary hemostatic disorders in dogs. *Am J Vet Res* 2001;62:652–658.
19. Keidel A, Mischke R. Clinical evaluation of platelet function analyzer PFA-100 in dogs [in German]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1998;111:452–456.
20. Clemmons RM, Meyers KM. Acquisition and aggregation of canine blood platelets: basic mechanisms of function and differences because of breed origin. *Am J Vet Res* 1984;45:137–144.
21. Feingold HM, Pivacek LE, Melaragno AJ, et al. Coagulation assays and platelet aggregation patterns in human, baboon, and canine blood. *Am J Vet Res* 1986;47:2197–2199.
22. Mischke R, Keidel A. Influence of platelet count, acetylsalicylic acid, von Willebrand's disease, coagulopathies, and haematocrit on results obtained using a platelet function analyser in dogs. *Vet J* 2003;165:43–52.
23. Reinhart WH, Felix C. Influence of propofol on erythrocyte morphology, blood viscosity and platelet function. *Clin Hemorheol Microcirc* 2003;29:33–40.
24. Clancey N, Burton S, Horney B, et al. Effects of in vitro hemodilution of canine blood on platelet function analysis using the PFA-100. *Vet Clin Pathol* 2009;38:467–470.
25. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, et al. Description of an in vitro platelet function analyzer-PFA-100. *Semin Thromb Hemost* 1995;21(suppl 2):106–112.
26. Madjdpour C, Dettori N, Frascarolo P, et al. Molecular weight of hydroxyethyl starch: is there an effect on blood coagulation and pharmacokinetics? *Br J Anaesth* 2005;94:569–576.
27. Driessen B, Brainard B. Fluid therapy for the traumatized patient. *J Vet Emerg Crit Care* 2006;16:276–299.
28. DiBartola SP. *Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice*. St Louis: Elsevier, 2011.
29. Kozek-Langenecker SA, Jungheinrich C, Sauermann W, et al. The effects of hydroxyethyl starch 130/0.4 (6%) on blood loss and use of blood products in major surgery: a pooled analysis of randomized clinical trials. *Anesth Analg* 2008;107:382–390.
30. Van der Linden P, Ickx BE. The effects of colloid solutions on hemostasis. *Can J Anaesth* 2006;53:S30–S39.
31. Stöger Müller B, Stark J, Willschke H, et al. The effect of hydroxyethyl starch 200 kD on platelet function. *Anesth Analg* 2000;91:823–827.
32. Treib J, Baron JF. Hydroxyethyl starch: effects on hemostasis [in French]. *Ann Fr Anesth Reanim* 1998;17:72–81.
33. Strauss RG, Pennell BJ, Stump DC. A randomized, blinded trial comparing the hemostatic effects of pentastarch versus hetastarch. *Transfusion* 2002;42:27–36.
34. Clancey N, Burton S, Horney B, et al. Evaluation of platelet function in dogs with cardiac disease using the PFA-100 platelet function analyzer. *Vet Clin Pathol* 2009;38:299–305.
35. Jilma B. Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction. *J Lab Clin Med* 2001;138:152–163.
36. Favalaro EJ. Clinical utility of the PFA-100. *Semin Thromb Hemost* 2008;34:709–733.
37. Lutze G, Kropf S. Bleeding time in vitro measured by the PFA-100 system: pre-analytical conditions for blood collection [in German]. *J Lab Med* 2004;28:463–469.
38. Heilmann EJ, Kundu SK, Sio R, et al. Comparison of four commercial citrate blood collection systems for platelet function analysis by the PFA-100 system. *Thromb Res* 1997;87:159–164.
39. Godier A, Durand M, Smadja D, et al. Maize- or potato-derived hydroxyethyl starches: is there any thromboelastometric difference? *Acta Anaesthesiol Scand* 2010;54:1241–1247.
40. Liu FC, Liao CH, Chang YW, et al. Hydroxyethyl starch interferes with human blood ex vivo coagulation, platelet function and sedimentation. *Acta Anaesthesiol Taiwan* 2009;47:71–78.
41. Scharbert G, Deusch E, Kress HG, et al. Inhibition of platelet function by hydroxyethyl starch solutions in chronic pain patients undergoing peridural anesthesia. *Anesth Analg* 2004;99:823–827.
42. Sumpelmann R, Kretz FJ, Gähler R, et al. Hydroxyethyl starch 130/0.42/6:1 for perioperative plasma volume replacement in children: preliminary results of a European prospective multicenter observational postauthorization safety study (PASS). *Paediatr Anaesth* 2008;18:929–933.
43. Chohan AS, Greene SA, Grubb TL, et al. Effects of 6% hetastarch (600/0.75) or lactated Ringer's solution on hemostatic variables and clinical bleeding in healthy dogs anesthetized for orthopedic surgery. *Vet Anaesth Analg* 2011;38:94–105.

## IV. DISKUSSION

In dieser Studie wurde der *in-vitro*-Effekt von HES 130/0,42 und physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) auf die canine Thrombozytenfunktion in zwei verschiedenen Verdünnungen mit dem PFA-100 untersucht. Die Hypothese war, dass HES 130/0,42 einen deutlicheren Effekt auf die canine Thrombozytenfunktion *in vitro* hat als 0,9% NaCl.

Im Laufe der letzten 40 Jahre wurden immer wieder neue „Generationen“ von HES-Präparaten mit verbesserter Pharmakokinetik, aber vergleichbarem Volumeneffekt entwickelt (JUNGHEINRICH & NEFF, 2005). Das in dieser Studie untersuchte HES 130/0,42 (Venofundin®) ist ein Präparat der neuen „dritten Generation“ und gehört somit zu den mittelmolekularen und niedrig substituierten HES-Produkten. Neben dem HES 130/0,42, welches auf Kartoffelstärke basiert, zählt HES 130/0,4, welches auf Maisstärke basiert, zur „dritten Generation“. Beide HES-Präparate sind auf dem Markt erhältlich. Es ist allerdings bekannt, dass diese beiden HES-Lösungen physikochemische Unterschiede aufweisen und nicht bioäquivalent sind (WESTPHAL et al., 2009). Eine Studie an Schweinen untersuchte den Effekt von drei HES-Produkten mit unterschiedlichem molarem Gewicht (MW) aber gleicher molarer Substitution (MS) (HES 130/0,42, 500/0,42 und 900/0,42) auf die Hämostase und zeigte, dass das MW einen geringeren Einfluss auf die Hämostase zu haben scheint als die MS (MADJDPOUR et al., 2005).

In dieser Studie wurden Zitratblutproben von 31 adulten, gesunden Hunden jeweils nativ und in zwei unterschiedlichen Verdünnungen mit dem PFA-100 untersucht, wobei die Blutproben jeweils im Verhältnis 1:9 und 1:3 mit HES 6% 130/0,42 und 0,9% NaCl verdünnt wurden. Die 1:9- und 1:3-Verdünnungen mit HES 130/0,42 und 0,9% NaCl simulieren eine intravenöse Flüssigkeitssubstitution von 10 ml/kg und 30 ml/kg, bei einem angenommenen caninen Blutvolumen von 90 ml/kg. Dies entspricht einer üblichen Dosierung zur Behandlung eines hypovolämischen Schockgeschehens (DRIESSEN & BRAINARD, 2006; HOPPER et al., 2012). Die empfohlene Dosis für ältere hochmolekulare HES beträgt 20 ml/kg/Tag, während für neue HES-Produkte der dritten Generation eine Dosis von bis sogar 50 ml/kg/Tag empfohlen wird (KOZEK-LANGENECKER et

al., 2008; WESTPHAL et al., 2009).

In dieser Studie führten die 1:3-Verdünnungen mit 0,9% NaCl und HES 130/0,42 zu einer signifikanten Verlängerung der CT, wohingegen die 1:9-Verdünnungen zu keiner Verlängerung führten. Die Verlängerung der CT durch Zugabe von 0,9% NaCl kann durch den Effekt der passiven Hämodilution erklärt werden. Hierbei kommt es durch die Gabe von Kristalloiden zu einer Verdünnung der Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten, sodass entsprechende Veränderungen in der Hämostase hervorrufen werden. Die CT der 1:3-Verdünnung mit HES 130/0,42 war im Vergleich zu der 1:3-Verdünnung mit 0,9% NaCl jedoch signifikant verlängert. Dies lässt auf einen Effekt von HES 130/0,42 in einer 1:3-Verdünnung schließen, der über einen Hämodilutionseffekt hinausgeht. Außerdem zeigt dieses Ergebnis, dass HES 130/0,42 in der 1:3-Verdünnung einen ausgeprägteren Einfluss auf die *in-vitro*-Thrombozytenfunktion als 0,9% NaCl hat. Zudem scheint dieser Effekt dosisabhängig zu sein, da es nur in der 1:3-Verdünnung von HES 130/0,42 und nicht in der 1:9-Verdünnung zu signifikanten Unterschieden kam.

HES kann die Hämostase und die Thrombozytenfunktion durch unspezifische Hämodilution und durch spezifische Effekte auf zellulärer Ebene beeinträchtigen (VAN DER LINDEN & ICKX, 2006). Dabei haben die physikochemischen Eigenschaften der HES-Präparate, wie das MW und die MS, einen Einfluss auf das Ausmaß dieser Effekte. Ältere, langsam abbaubare HES-Lösungen (Hetastarch, Hexstarch, Pentastarch) zeigen deutlichere Effekte als neuere, schnell abbaubare HES-Lösungen (Tetrastarch), welche nur sehr geringe oder gar keine Effekte auf die Thrombozytenfunktion haben (JAMNICKI et al., 1998a; OMAR et al., 1999; HUTTNER et al., 2000; JAMNICKI et al., 2000; STOGERMULLER et al., 2000; FRANZ et al., 2001).

Es ist außerdem bekannt, dass HES zu einem erworbenen von-Willebrand-Syndrom und durch Einlagerung von HES-Molekülen in das Blutgerinnsel zu einer beschleunigten Fibrinolyse führen kann (STRAUSS et al., 1988; TREIB et al., 1995; JAMNICKI et al., 1998b). Es wurde weiterhin gezeigt, dass HES eine verringerte Expression und Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche verursacht (STOGERMULLER et al., 2000; FRANZ et al., 2001). Da GPIIb/IIIa im Zuge der Thrombozytenaktivierung wichtig für die Thrombozytenaggregation und irreversible Adhäsion an das Gefäßendothel ist,



führt eine verminderte Expression und Aktivierung des GPIIb/IIIa zu einer verminderten Thrombozytenaggregation und -aktivierung. Intrazelluläre Signaltransduktionswege scheinen durch HES nicht beeinflusst zu werden. Der agonisteninduzierte Anstieg der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration ist eine Schlüsselreaktion für die Thrombozytensekretion und wird in Anwesenheit von HES nicht oder nur geringgradig verändert (FRANZ et al., 2001; GAMSJAGER et al., 2002; JUTTNER et al., 2004). Eine neue Studie zeigte, dass HES-Moleküle in der Lage sind, unspezifisch an Thrombozytenrezeptoren zu binden (coating effect) (DEUSCH et al., 2003). Somit blockiert HES durch den coating effect den Zugang der entsprechenden Liganden zu den Membranrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche. Die Reaktivität der Thrombozyten ist dadurch herabgesetzt (DEUSCH et al., 2003). All diese aufgeführten Mechanismen bieten mögliche Erklärungen für die in dieser Studie festgestellte Verlängerung der CT bei einer 1:3-Verdünnung mit HES 130/0,42.

In dieser Studie wurden neben den 1:9- und 1:3-Verdünnungen mit HES 130/0,42 und 0,9% NaCl auch die Nativblutproben mit dem PFA-100 untersucht. Die CT für Nativblut reichten von 57,0 bis 138,0 Sekunden mit einem Mittelwert von 87,7  $\pm$  18,9 Sekunden und einem Median von 84,0 Sekunden (unteres und oberes Quartil 74,5 bis 99,5 Sekunden). Messungen von anderen Studien bei Hunden mit dem PFA-100 und COL/ADP ergaben CT von 67  $\pm$  7,8 Sekunden mit einer Spannweite von 52 bis 86 Sekunden (n = 29) (CALLAN & GIGER, 2001) und 57,6  $\pm$  5,9 Sekunden mit einer Spannweite von 48 bis 77 Sekunden (n = 58) (CLANCEY et al., 2009a). In einer weiteren Studie wurde eine mediane CT von 73 s (2,5-97,5% Quantil) mit einer Spannweite von 53 bis 98 Sekunden (n = 136 Sekunden) gemessen (MISCHKE & KEIDEL, 2003). Die Werte dieser früheren Studien weichen von den Werten der vorliegenden Studie ab. In der Humanmedizin ist bekannt, dass viele Faktoren, wie Alter, Geschlecht, Ernährung, unterschiedliche Messzellen und Zitratkonzentrationen der Blutröhrchen, regionale und tägliche Abweichungen, die CT beeinflussen können (HEILMANN et al., 1997; JILMA, 2001; LUTZE & S.KROPF, 2004; FAVALORO, 2008). Diese könnten auch bei Hunden einen Einfluss auf die CT haben.

Die *in-vitro*-Thrombozytenfunktion kann mit verschiedenen Methoden, wie Durchflusszytometrie, Impedanzaggregometrie, TEG, Cone and Plate Analyzern

und PFA-100, gemessen werden. Jede dieser Methoden hat Vor- und Nachteile. Die Durchflusszytometrie und die Impedanzaggregometrie sind sehr zeitintensiv und benötigen spezialisiertes Personal zur Durchführung (MICHELSON, 2009; JANDREY, 2012). Cone and Plate Analyzer brauchen zwar nur eine geringe Blutprobenmenge und simulieren durch hohe Scherkräfte *in-vivo*-Verhältnisse, wurden aber bis jetzt nur für den Menschen validiert (VARON et al., 1997; SAVION & VARON, 2006). Die TEG gibt Auskunft über die gesamte Hämostase, sodass eine spezielle Erfassung der Thrombozytenfunktion nur bedingt möglich ist. Auch arbeitet die TEG mit niedrigen Scherkräften, sodass die Untersuchungsverhältnisse nicht den Verhältnissen *in vivo* entsprechen (JANDREY, 2012). Der PFA-100 ist ein point-of-care-Instrument. Die Messung der CT ist vollautomatisch, die Vorbereitung der Blutproben und die Bedienung des Geräts sind einfach durchführbar, sodass Messfehler oder Artefakte durch Bedienungsfehler nur selten auftreten. Auch wird nur ein kleines Probenvolumen (800 - 1000 µl) pro Messung benötigt. Da der PFA-100 mit hohen Scherkräften arbeitet, werden *in-vivo*-Verhältnisse simuliert (MAMMEN et al., 1998; FAVALORO, 2001). Außerdem wurden bereits Studien an Hunden mit dem PFA-100 durchgeführt (CALLAN & GIGER, 2001; MISCHKE & KEIDEL, 2002; CLANCEY et al., 2009b). Der PFA-100 ist nicht spezifisch für einzelne Defekte der Thrombozyten, da die gesamte primäre Hämostase untersucht wird (FAVALORO, 2001, 2008). Allerdings war es auch nicht das Ziel dieser Studie einen speziellen Thrombozytendefekt, sondern nur die Beeinflussung der Thrombozytenfunktion durch HES 130/0,42 zu untersuchen. Aus diesen Gründen wurde für die vorliegende Studie der PFA-100 als Messmethode gewählt.

Der PFA-100 gilt als eine semiquantitative Messmethode (LUTZE & S.KROPF, 2004). Der Hersteller des PFA garantiert für die Messgenauigkeit der CT nur, wenn in der entsprechenden Zitratblutprobe die Thrombozytenanzahl  $>150,000/\mu\text{l}$  und der Hämatokrit  $>35\%$  beträgt. Allerdings zeigte eine veterinärmedizinische Studie, dass der PFA-100 auch korrekte CT bei einem Hämatokrit von  $\geq 25\%$  und einer Thrombozytenanzahl von  $\geq 100,000/\mu\text{l}$  misst (CALLAN & GIGER, 2001). Der Hämatokrit und die Thrombozytenanzahl der 31 Zitratblutproben für die 1:3-Verdünnungen dieser Studie wurden berechnet. Der mediane Hämatokrit war  $35\%$  ( $29\% - 47\%$ ) und die mediane Thrombozytenanzahl  $195,750/\mu\text{l}$  ( $113,250 - 271,500/\mu\text{l}$ ). Folglich können die CT-Werte, die in dieser Studie mit den

verdünnten Blutproben gemessen wurden, als richtige Beurteilung der Thrombozytenfunktion angesehen werden.

Die Ergebnisse vieler Studien in der Humanmedizin decken sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie. All diese Studien zeigen, dass HES 130/0,4 einen größeren Einfluss auf die Thrombozytenfunktion und die Hämostase hat als Kristalloide (LIU et al., 2009; GODIER et al., 2010).

In einer Studie wurde der Einfluss von HES 130/0,4, HES 200/0,5 und 0,9% NaCl in verschiedenen Verdünnungen auf die *in-vitro*-Thrombozytenfunktion beim Menschen mittels PFA, Aggregometrie und Erythrozytensedimentationsrate untersucht (LIU et al., 2009). Es wurde festgestellt, dass beide HES-Lösungen zu einer signifikanten und dosisabhängigen Verlängerung der CT führten. Außerdem waren die CT unter Einfluss von HES-Lösungen signifikant höher als die CT bei 0,9% NaCl (LIU et al., 2009). Eine *in-vivo*-Studie verglich den Einfluss von HES 130/0,4, HES 200/0,5 und Laktat-Ringerlösung auf die Thrombozytenfunktion und die Hämodynamik bei 40 Erwachsenen (SCHARBERT et al., 2004). Nach Infusion beider HES-Lösungen mit einer Dosis von 10 ml/kg konnte eine signifikante Verlängerung der CT festgestellt werden, während die Gabe von Laktat-Ringerlösung in der gleichen Dosierung zu keiner Verlängerung der CT führte. Im Gegensatz dazu konnte in einer anderen Studie kein signifikanter Effekt auf die CT nach einer intravenösen Gabe (10 ml/kg) von HES 130/0,38-0,45 bei gesunden Patienten festgestellt werden (FRANZ et al., 2001). Diese Unterschiede könnten durch unterschiedliche Patientenpopulationen bedingt sein. In der vorliegenden Studie konnte ebenfalls kein Effekt mit einer simulierten Dosis von 10 ml/kg HES 130/0,42 festgestellt werden. In einer europäischen multizentrischen Post-Authorisation Safety Studie bekamen 1104 Kinder HES 130/0,42 ( $10,6 \pm 5,8$  ml/kg) perioperativ infundiert. Es wurden keine ernsthaften durch HES bedingten Nebenwirkungen festgestellt. Die Wahrscheinlichkeit schwerer Nebenwirkungen, wie Blutungen, war kleiner als 0,3% (SUMPELMANN et al., 2012).

In der Veterinärmedizin wurden bis jetzt nur wenige Studien veröffentlicht, die den Effekt von HES auf die canine Thrombozytenfunktion und auf die Hämostase untersuchten. In einer neuen Studie wurde der *in-vitro*-Effekt von HES 130/0,4, Hetastarch und 0,9% NaCl bei gesunden Hunden mittels Thrombelastografie verglichen (BACEK et al., 2011). Es wurde gezeigt, dass HES 130/0,4 in einer

hohen Verdünnung einen geringeren Effekt auf die Hämostase hat als Hetastarch. Gefolgert wurde hieraus, dass der Effekt von HES 130/0,4 auf die Hämostase nicht nur durch Hämodilutionseffekte hervorgerufen zu sein scheint. Dies deckt sich mit der Schlussfolgerung der vorliegenden Studie. In einer weiteren *in-vitro*-Studie bei Hunden wurde der Effekt von HES 670/0,75 und HES 600/0,7 auf die Thrombozytenfunktion mit dem PFA-100 in zwei verschiedenen Verdünnungen verglichen (WIERENGA et al., 2007). Die Autoren fanden, wie auch bei der vorliegenden Studie, nur in der höheren Verdünnung (1:3) einen signifikanten Effekt, denn die CT der 1:3-Verdünnung mit HES 670/0,75 war signifikant größer als die CT der Verdünnungen mit 0,9% NaCl. So wurde auch in dieser Studie gefolgert, dass HES die CT deutlicher beeinflusst als 0,9% NaCl und dass der Einfluss von HES nicht alleine durch eine Hämodilution erklärt werden kann.

Da es in der Veterinärmedizin bis jetzt nur wenige *in-vitro*-Studien gibt, die den Effekt von HES auf die Hämostase und die Thrombozytenfunktion, aber auch die Effekte verschiedener HES-Präparate im Vergleich untersuchten, sind weitere *in-vitro*-Studien mit verschiedenen Generationen von HES-Präparaten beim Hund nötig. Damit könnten die aktuellen Kenntnisse aus der Humanmedizin in der Tiermedizin nachvollzogen werden.

Eine *in-vivo*-Studie an Hunden zeigte, dass 20 ml/kg HES 670/0,75 die CT bis zu fünf Stunden nach Infusion verlängerte. Die CT kehrte aber innerhalb von 24 Stunden wieder in den Referenzwerte zurück (SMART et al., 2009). Dabei wurden während der Versuchsphase keine klinischen Symptome einer gesteigerten Blutungsneigung, wie Petechien oder Ekchymosen, beobachtet. Diese Ergebnisse werden durch eine Studie an narkotisierten Hunden während orthopädischer Operationen unterstützt (CHOHAN et al., 2011). Dabei wurde der Effekt von 10 ml/kg HES 600/0,75 und Laktat-Ringerlösung auf die Hämostase und die Blutungsneigung verglichen, und es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Thrombozytenaggregation (gemessen mit elektronischer Aggregometrie) und keine Blutungen während der Operation festgestellt.

Die Ergebnisse der vorliegenden und anderer Studien berücksichtigend, stellt sich die Frage, ob und in wie weit die Verlängerung der CT und die damit verbundene Beeinträchtigung der *in-vitro*-Thrombozytenfunktion klinisch relevant ist. Obwohl in der vorliegenden Studie ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den CT der 1:9- und 1:3-Verdünnung, und dabei besonders zwischen

der 1:3-Verdünnung mit 0,9% NaCl und HES 130/0,42 bestand, ist auch eine erhebliche Überschneidung der gemessenen Werte zu beobachten. Obwohl für den PFA-100 eine hohe klinische Sensitivität und Spezifität in der Identifikation von Störungen der primären Hämostase bei Hunden berichtet wurde, ist die klinische Relevanz der Ergebnisse dieser Studie nicht eindeutig belegbar (CALLAN & GIGER, 2001).

Diese Studie besitzt die Limitationen eines *in-vitro*-Models. Kompensatorische Mechanismen, wie Puffersysteme, Kontrolle des pH-Wertes und Elektrolytverhältnisse, sind *in vitro* nicht die gleichen wie *in vivo*. Ebenso ist der Abbau von HES-Molekülen durch die  $\alpha$ -Amylase und die Beteiligung des Gefäßendothels und der Gefäßfaktoren limitiert oder fehlt in einer *in-vitro*-Studie. Auch wenn der PFA-100 in seinem Messsystem die Verhältnisse in einem verletzten Gefäß unter hohen Scherkräften simuliert, werden die *in-vivo*-Verhältnisse nur nachgeahmt. Deswegen können die Ergebnisse dieser Studie nicht direkt für die klinische Situation übernommen werden.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass HES 130/0,42 in einer hohen simulierten Dosierung (30 ml/kg) die CT im Vergleich zu 0,9% NaCl in derselben Dosierung *in vitro* signifikant verlängert. Diese Verlängerung kann nicht nur durch einen passiven Dilutionseffekt erklärt werden, sondern lässt auf einen spezifischen Effekt von HES 130/0,42 auf zellulärer Ebene schließen. Diese Ergebnisse zeigen, dass HES 130/0,42 trotz niedrigem MW und niedriger MS einen deutlicheren Effekt auf die *in-vitro*-Thrombozytenfunktion hat als 0,9% NaCl. Daher sollte an mögliche Nebenwirkungen, im Besonderen an die Beeinträchtigung der Hämostase bei Patienten mit bereits gestörter Hämostase, beim Einsatz von HES 130/0,42 gedacht werden.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Hydroxyethylstärke (HES) gehört zu den synthetischen kolloiden Volumenexpandern und wird perioperativ und bei kritisch kranken Patienten zur Aufrechterhaltung der Gewebepерfusion eingesetzt. Es ist bekannt, dass HES, in Abhängigkeit der pharmakochemischen Eigenschaften, die Hämostase und die Thrombozytenfunktion *in vivo* und *in vitro* durch unspezifische Hämodilution und durch spezifische Effekte auf zellulärer Ebene beeinträchtigen und so das Risiko für Blutungen erhöhen kann. Hierbei zeigen ältere, langsam abbaubare HES-Präparate (Hetastarch, Hexastarch, Pentastarch) deutlichere Effekte als neuere, schneller abbaubare HES-Präparate der „dritten Generation“ (Tetrastarch).

Ziel dieser Studie war es, den *in-vitro*-Effekt von HES 6% 130/0,42 (Venofundin®) auf die canine Thrombozytenfunktion mit dem Platelet Function Analyzer-100 (PFA-100) zu untersuchen. Die Hypothese der Studie war, dass HES 130/0,42 einen deutlicheren Effekt auf die canine Thrombozytenfunktion *in vitro* hat als 0,9% NaCl.

Es wurden Zitratblutproben von 31 gesunden adulten Hunden nativ und in zwei verschiedenen Verdünnungen untersucht, wobei die Blutproben jeweils im Verhältnis 1:9 und 1:3 mit 0,9% NaCl und HES 6% 130/0,42 verdünnt wurden. Die 1:9-Verdünnung simulierte eine Dosis von 10 ml/kg und die 1:3-Verdünnung eine Dosis von 30 ml/kg, bei einem angenommenen caninen Blutvolumen von 90 ml/kg. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Closure Time (CT) als Maß für die Thrombozytenfunktion mit dem PFA-100 gemessen. Die mediane CT für natives Zitratblut war 84,0 Sekunden (unteres und oberes Quartil; 74,5 - 99,5 s). Die CT der 1:9-Verdünnungen mit NaCl und HES 130/0,42 waren nicht signifikant unterschiedlich zu der CT des Nativblutes. Die medianen CTs der 1:3-Verdünnungen mit NaCl und HES 130/0,42 betrugen 96,0 Sekunden (85,8 - 110,8 Sekunden) und 112,0 Sekunden (92,0 - 126,0 Sekunden) und waren beide signifikant unterschiedlich zur Nativblutprobe. Die CT der 1:3-Verdünnung mit HES 130/0,42 war außerdem signifikant unterschiedlich zur CT der 1:3-Verdünnung mit NaCl.

Es kann gefolgert werden, dass 0,9% NaCl und HES 6% 130/0,42 die canine Thrombozytenfunktion *in vitro* beeinträchtigen und zu einer verlängerten CT bei

einer Verdünnung von 1:3, welches eine intravenöse Dosis von 30 ml/kg simuliert, führen. In dieser hohen Konzentration führt HES 130/0,42 zu einer Beeinträchtigung der *in-vitro*-Thrombozytenfunktion, die über einen Dilutionseffekt durch 0,9% NaCl in derselben Konzentration hinausgeht. Vermutlich liegen daher spezifische Effekte von HES 130/0,42 auf zellulärer Ebene vor. Deswegen sollte beim Einsatz von HES 6% 130/0,42 die Beeinflussung der Hämostase, besonders bei Patienten mit bereits beeinträchtigter Hämostase, beachtet werden.

## VI. SUMMARY

Hydroxyethyl starch (HES) is an artificial colloidal volume expander and is used perioperative and in critical ill patients to maintain tissue perfusion. It had been shown that HES can compromise hemostasis and platelet function *in vitro* and *in vivo* by unspecific hemodilution and specific effects on a cellular level depending on their pharmacochemical characteristics which may lead to an increased risk for hemorrhage. Older, slow degradable HES solutions (Hetastarch, Hexastarch, Pentastarch) show more distinctly effects than newer rapidly degradable HES solutions of the “third generation” (Tetrastarch).

The objective of this study was to investigate the *in vitro* effect of HES 6% 130/0.42 (Venofundin<sup>®</sup>) on canine platelet function using the platelet function analyzer 100 (PFA-100). It was hypothesized that HES 130/0.42 will have a more pronounced effect on canine *in vitro* platelet function compared to 0.9% NaCl.

Citrated whole blood from 31 healthy adult dogs was analyzed in two different dilutions. Blood samples are diluted both 1:9 and 1:3 with 0.9% NaCl or HES 130/0.42, which mimic a dose of 10 ml/kg and 30 ml/kg intravenous fluids with a supposed canine blood volume of 90 ml/kg. After incubation at room temperature closure time (CT) was measured with the PFA-100 that evaluates platelet function. Median CT with whole blood was 84.0 seconds (lower and upper quartile range, 74.5 - 99.5 seconds). The 1:9 dilutions of 0.9% NaCl and HES 130/0.42 were not significantly different from whole blood. A 1:3 dilution of 0.9% NaCl and HES 130/0.42 resulted in median CTs of 96.0 seconds (85.5 - 110.8 seconds) and 112.0 seconds (92.0 - 126.0 seconds), respectively. Both 1:3 dilutions caused significantly different CT when compared to whole blood. The CT caused of 1:3 dilution of HES 130/0.42 was also significantly different from the 1:3 dilution of 0.9% NaCl.

It can be concluded that 0.9% NaCl and HES 6% 130/0.42 affect canine platelet function *in vitro* by prolonging CT in a dilution of 1:3, which mimics a dose of 30 ml/kg intravenous fluids. In this high concentration, HES 130/0.42 compromises *in vitro* platelet function more than a dilutional effect with 0.9% NaCl in the same concentration. Specific effects of HES 130/0.42 on a cellular level are expected. Therefore, impairment of hemostasis should be kept in mind especially in patients



---

with already compromised hemostasis.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Babski DM, Brainard BM, Ralph AG, Pittman JR, Koenig A. Sonoclot® evaluation of single- and multiple-dose subcutaneous unfractionated heparin therapy in healthy adult dogs. JVIM 2012;

Bacek LM, Martin LG, Spangler EA, Macintire DK (2011) Determination of the in vitro effects of two forms of hydroxyethyl starch solutions on thromboelastography and coagulation parameters in healthy dogs. 17th IVECCS. San Antonio, Texas, USA

Baker RI, Manoharan A. Platelet function in myeloproliferative disorders: characterization and sequential studies show multiple platelet abnormalities, and change with time. Eur J Haematol 1988; 40: 267-72.

Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, Chang MS, Samal B, Nichol JL, Swift S, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. Cell 1994; 77: 1117-24.

Baumgarten A, Wilhelmi M, Kalbantner K, Ganter M, Mischke R. Measurement of platelet aggregation in ovine blood using a new impedance aggregometer. Vet Clin Pathol 2010; 39: 149-56.

Bennett JS, Berger BW, Billings PC. The structure and function of platelet integrins. J Thromb Haemost 2009; 7 Suppl 1: 200-5.

Bentfeld-Barker ME, Bainton DF. Identification of primary lysosomes in human megakaryocytes and platelets. Blood 1982; 59: 472-81.

Berger G, Caen JP, Berndt MC, Cramer EM. Ultrastructural demonstration of CD36 in the alpha-granule membrane of human platelets and megakaryocytes. Blood 1993; 82: 3034-44.

Berger G, Masse JM, Cramer EM. Alpha-granule membrane mirrors the platelet plasma membrane and contains the glycoproteins Ib, IX, and V. *Blood* 1996; 87: 1385-95.

Bischof D, Dalbert S, Zollinger A, Ganter MT, Hofer CK. Thrombelastography in the surgical patient. *Minerva Anesthesiol* 2010; 76: 131-7.

Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009; 23: 177-89.

Blue JT, French TW, Kranz JS. Non-lymphoid hematopoietic neoplasia in cats: a retrospective study of 60 cases. *Cornell Vet* 1988; 78: 21-42.

Bodin S, Soulet C, Tronchere H, Sie P, Gachet C, Plantavid M, Payrastre B. Integrin-dependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets. *J Cell Sci* 2005; 118: 759-69.

Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194: 927-9.

Boudreaux MK, Dillon AR, Spano JS. Enhanced platelet reactivity in heartworm-infected dogs. *Am J Vet Res* 1989; 50: 1544-7.

Boudreaux MK, Dillon AR, Ravis WR, Sartin EA, Spano JS. Effects of treatment with aspirin or aspirin/dipyridamole combination in heartworm-negative, heartworm-infected, and embolized heartworm-infected dogs. *Am J Vet Res* 1991; 52: 1992-9.

Boudreaux MK. Acquired platelet dysfunction. In: Schalm's Veterinary Hematology, 5 edn. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, eds. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins 2006: 496-9.

Brainard BM, Meredith CP, Callan MB, Budsberg SC, Shofer FS, Driessen B,

Otto CM. Changes in platelet function, hemostasis, and prostaglandin expression after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory drugs with various cyclooxygenase selectivities in dogs. *Am J Vet Res* 2007; 68: 251-7.

Brainard BM, Kleine SA, Papich MG, Budsberg SC. Pharmacodynamic and pharmacokinetic evaluation of clopidogrel and the carboxylic acid metabolite SR 26334 in healthy dogs. *Am J Vet Res* 2010; 71: 822-30.

Brainard BM, Abed JM, Koenig A. The effects of cytochalasin D and abciximab on hemostasis in canine whole blood assessed by thromboelastography and the PFA-100(R) platelet function analyzer system. *J Vet Diagn Invest* 2011; 23: 698-703.

Brassard JA, Meyers KM. von Willebrand factor is not altered in azotemic dogs with prolonged bleeding time. *J Lab Clin Med* 1994; 124: 55-62.

Brooks M, Catalfamo J. Buccal mucosa bleeding time is prolonged in canine models of primary hemostatic disorders. *Thromb Haemost* 1993; 70: 777-80.

Brooks MB, Randolph J, Warner K, Center S. Evaluation of platelet function screening tests to detect platelet procoagulant deficiency in dogs with Scott syndrome. *Vet Clin Pathol* 2009; 38: 306-15.

Brooks MB, Catalfamo JL. Immune-Mediated Thrombozytopenia, von Willebrand Disease, and Platelet Disorders. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 7 edn. Ettinger SJ, Feldman EC, eds. Missouri: W.B. Saunders Company 2010: 772-83.

Caen JP, Michel H, Tobelem G, Bodevin E, Levy-Toledano S. Adhesion and aggregation of human platelets to rabbit subendothelium. A new approach for investigation: specific antibodies. *Experientia* 1977; 33: 91-3.

Calatzis A. Analysis of primary hemostasis on whole blood. *J Lab Med* 2007; 31:

239-47.

Callan MB, Giger U. Assessment of a point-of-care instrument for identification of primary hemostatic disorders in dogs. *Am J Vet Res* 2001; 62: 652-8.

Callan MB, Giger U. Effect of desmopressin acetate administration on primary hemostasis in Doberman Pinschers with type-1 von Willebrand disease as assessed by a point-of-care instrument. *Am J Vet Res* 2002; 63: 1700-6.

Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods* 1980; 3: 135-58.

Catalfamo JL, Dodds WJ. Thrombopathias. In: Schalm's Veterinary Hematology, 5 edn. Feldman BF, Zinkl J, Jain NC, eds. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins 2000: 1042-50.

Chen A, Teruya J. Global hemostasis testing thromboelastography: old technology, new applications. *Clin Lab Med* 2009; 29: 391-407.

Chohan AS, Greene SA, Grubb TL, Keegan RD, Wills TB, Martinez SA. Effects of 6% hetastarch (600/0.75) or lactated Ringer's solution on hemostatic variables and clinical bleeding in healthy dogs anesthetized for orthopedic surgery. *Vet Anaesth Analg* 2011; 38: 94-105.

Clancey N, Burton S, Horney B, Mackenzie A, Nicastro A, Cote E. Evaluation of platelet function in dogs with cardiac disease using the PFA-100 platelet function analyzer. *Vet Clin Pathol* 2009a; 38: 299-305.

Clancey N, Burton S, Horney B, Mackenzie A, Nicastro A, Cote E. Effects of in vitro hemodilution of canine blood on platelet function analysis using the PFA-100. *Vet Clin Pathol* 2009b; 38: 467-70.

Clemmons RM, Meyers KM. Acquisition and aggregation of canine blood

platelets: basic mechanisms of function and differences because of breed origin. Am J Vet Res 1984; 45: 137-44.

Cramer EM, Berger G, Berndt MC. Platelet alpha-granule and plasma membrane share two new components: CD9 and PECAM-1. Blood 1994; 84: 1722-30.

Dalby MC, Dewar A, Davidson SJ, Burman JF, Davies SW. Evaluation of angiographic contrast media and platelet function with impedance aggregometry and the PFA-100 'platelet function analyser'. Platelets 1999; 10: 293-7.

Dallap Schaer BL, Bentz AI, Boston RC, Palmer JE, Wilkins PA. Comparison of viscoelastic coagulation analysis and standard coagulation profiles in critically ill neonatal foals to outcome. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) 2009; 19: 88-95.

Dalrymple-Hay M, Aitchison R, Collins P, Sekhar M, Colvin B. Hydroxyethyl starch induced acquired von Willebrand's disease. Clin Lab Haematol 1992; 14: 209-11.

Detwiler TC, Charo IF, Feinman RD. Evidence that calcium regulates platelet function. Thromb Haemost 1978; 40: 207-11.

Deusch E, Gamsjager T, Kress HG, Kozek-Langenecker SA. Binding of hydroxyethyl starch molecules to the platelet surface. Anesth Analg 2003; 97: 680-3.

Deusch E, Thaler U, Kozek-Langenecker SA. The effects of high molecular weight hydroxyethyl starch solutions on platelets. Anesth Analg 2004; 99: 665-8, table of contents.

DiMinno G, Coraggio F, Cerbone AM, Capitanio AM, Manzo C, Spina M, Scarpato P, Dattoli GM, Mattioli PL, Mancini M. A myeloma paraprotein with specificity for platelet glycoprotein IIIa in a patient with a fatal bleeding disorder. J Clin Invest 1986; 77: 157-64.

Driessen B, Brainard B. Fluid therapy for the traumatized patient. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2006; 16: 276-99.

Duke WW. The relation of blood platelets to hemorrhagic disease. *JAVMA* 1910; 55: 1185-92.

Dyszkiewicz-Korpanty AM, Frenkel EP, Sarode R. Approach to the assessment of platelet function: comparison between optical-based platelet-rich plasma and impedance-based whole blood platelet aggregation methods. *Clin Appl Thromb Hemost* 2005; 11: 25-35.

Egli GA, Zollinger A, Seifert B, Popovic D, Pasch T, Spahn DR. Effect of progressive haemodilution with hydroxyethyl starch, gelatin and albumin on blood coagulation. *Br J Anaesth* 1997; 78: 684-9.

Escobar G, Leistikow E, White JG. The fate of the open canalicular system in surface and suspension-activated platelets. *Blood* 1989; 74: 1983-8.

Escudero C, Santos M, Bujan J, Fuente M, Honduvilla NG, Banas E, San Roman J, Tendillo FJ. Optical aggregometry versus the PFA-100: experimental studies in pigs treated with propofol. *Platelets* 2001; 12: 133-7.

Esmon NL, Carroll RC, Esmon CT. Thrombomodulin blocks the ability of thrombin to activate platelets. *J Biol Chem* 1983; 258: 12238-42.

Favaloro EJ. Utility of the PFA-100 for assessing bleeding disorders and monitoring therapy: a review of analytical variables, benefits and limitations. *Haemophilia* 2001; 7: 170-9.

Favaloro EJ. Clinical utility of the PFA-100. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34: 709-33.

Feingold HM, Pivacek LE, Melaragno AJ, Valeri CR. Coagulation assays and

platelet aggregation patterns in human, baboon, and canine blood. *Am J Vet Res* 1986; 47: 2197-9.

Flaumenhaft R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1152-60.

Franz A, Braunlich P, Gamsjager T, Felfernig M, Gustorff B, Kozek-Langenecker SA. The effects of hydroxyethyl starches of varying molecular weights on platelet function. *Anesth Analg* 2001; 92: 1402-7.

Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 7450-4.

Frey H, Löscher W (2010) *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*, 3 edn. Enke Verlag, Stuttgart

Funk C. Platelet Eicosanoids. In: *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, 4 edn. Colman R, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, eds. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins 2001: 533-9.

Gader AG, Ghumlas AK, Hussain MF, Haidari AA, White JG. The ultrastructure of camel blood platelets: a comparative study with human, bovine, and equine cells. *Platelets* 2008; 19: 51-8.

Gamsjager T, Gustorff B, Kozek-Langenecker SA. The effects of hydroxyethyl starches on intracellular calcium in platelets. *Anesth Analg* 2002; 95: 866-9.

Gentry PA. Platelet Biology. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, 6 edn. Weiss DJ, Wardrop KJ, eds.: Blackwell Publishing 2010:

George JN, Saucerman S. Platelet IgG, IgA, IgM, and albumin: correlation of platelet and plasma concentrations in normal subjects and in patients with ITP or



dysproteinemia. *Blood* 1988; 72: 362-5.

Gernert M. Pharmakologie des Blutes. In: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*, 3 edn. Frey H, Löscher W, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2010: 232-53.

Gerrard JM. Platelet aggregation: cellular regulation and physiologic role. *Hosp Pract (Off Ed)* 1988; 23: 89-98, 103-4, 7-8.

Godier A, Durand M, Smadja D, Jeandel T, Emmerich J, Samama CM. Maize- or potato-derived hydroxyethyl starches: is there any thromboelastometric difference? *Acta Anaesthesiol Scand* 2010; 54: 1241-7.

Goubran F, Maklady F. In vivo platelet activity and serum albumin concentration in nephrotic syndrome. *Blut* 1988; 57: 15-7.

Green RA, Russo EA, Greene RT, Kabel AL. Hypoalbuminemia-related platelet hypersensitivity in two dogs with nephrotic syndrome. *J Am Vet Med Assoc* 1985; 186: 485-8.

Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 1993; 7: 52-62.

Harrison P, Mumford A. Screening tests of platelet function: update on their appropriate uses for diagnostic testing. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35: 150-7.

Heilmann EJ, Kundu SK, Sio R, Garcia C, Gomez R, Christie DJ. Comparison of four commercial citrate blood collection systems for platelet function analysis by the PFA-100 system. *Thromb Res* 1997; 87: 159-64.

Hett DA, Walker D, Pilkington SN, Smith DC. Sonoclot analysis. *Br J Anaesth* 1995; 75: 771-6.

Holmsen H, Weiss HJ. Secretory storage pools in platelets. *Annu Rev Med* 1979;

30: 119-34.

Hopper K, Silverstein D, Bateman S. Shock Syndromes. In: Fluid, Electrolyte, and Acid-Base Disorders in Small animal Practice, 4 edn. DiBartola SP, ed. St. Louis: Elsevier Saunders 2012: 557-79.

Huttner I, Boldt J, Haisch G, Suttner S, Kumle B, Schulz H. Influence of different colloids on molecular markers of haemostasis and platelet function in patients undergoing major abdominal surgery. *Br J Anaesth* 2000; 85: 417-23.

Ivandic BT, Schlick P, Staritz P, Kurz K, Katus HA, Giannitsis E. Determination of clopidogrel resistance by whole blood platelet aggregometry and inhibitors of the P2Y<sub>12</sub> receptor. *Clin Chem* 2006; 52: 383-8.

Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1602-12.

Jamnicki M, Zollinger A, Seifert B, Popovic D, Pasch T, Spahn DR. The effect of potato starch derived and corn starch derived hydroxyethyl starch on in vitro blood coagulation. *Anaesthesia* 1998a; 53: 638-44.

Jamnicki M, Zollinger A, Seifert B, Popovic D, Pasch T, Spahn DR. Compromised blood coagulation: an in vitro comparison of hydroxyethyl starch 130/0.4 and hydroxyethyl starch 200/0.5 using thrombelastography. *Anesth Analg* 1998b; 87: 989-93.

Jamnicki M, Bombeli T, Seifert B, Zollinger A, Camenzind V, Pasch T, Spahn DR. Low- and medium-molecular-weight hydroxyethyl starches: comparison of their effect on blood coagulation. *Anesthesiology* 2000; 93: 1231-7.

Jandrey KE, Norris JW, MacDonald KA, Kittleson MD, Tablin F. Platelet function in clinically healthy cats and cats with hypertrophic cardiomyopathy: analysis using the Platelet Function Analyzer-100. *Vet Clin Pathol* 2008; 37: 385-

8.

Jandrey KE. Assessment of platelet function. JVECC 2012; 22: 81-98.

Jergens AE, Turrentine MA, Kraus KH, Johnson GS. Buccal mucosa bleeding times of healthy dogs and of dogs in various pathologic states, including thrombocytopenia, uremia, and von Willebrand's disease. Am J Vet Res 1987; 48: 1337-42.

Jilma B. Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction. J Lab Clin Med 2001; 138: 152-63.

Jungheinrich C, Neff TA. Pharmacokinetics of hydroxyethyl starch. Clin Pharmacokinet 2005; 44: 681-99.

Jungheinrich C. The starch family: are they all equal? Pharmacokinetics and pharmacodynamics of hydroxyethyl starches. TATM 2007; 9: 152-63.

Juttner B, Kuse ER, Elsner HA, Heine J, Jaeger K, Piepenbrock S, Scheinichen D. Differential platelet receptor expression following hydroxyethyl starch infusion in thrombocytopaenic orthotopic liver transplantation recipients. Eur J Anaesthesiol 2004; 21: 309-13.

Kalbantner K, Baumgarten A, Mischke R. Measurement of platelet function in dogs using a novel impedance aggregometer. Vet J 2010; 185: 144-51.

Kalbantner K, Meyer-Lindenberg A, Mischke R. Platelet function in dogs with congenital portosystemic shunt. Vet J 2011; 188 (2): 189-92.

Kamiguti AS, Hay CR, Theakston RD, Zuzel M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. Toxicon 1996; 34: 627-42.

Kaushansky K. Thrombopoietin. *N Engl J Med* 1998; 339: 746-54.

Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest* 2005; 115: 3339-47.

Kawai S, Nishida S, Kato M, Furumaya Y, Okamoto R, Koshino T, Mizushima Y. Comparison of cyclooxygenase-1 and -2 inhibitory activities of various nonsteroidal anti-inflammatory drugs using human platelets and synovial cells. *Eur J Pharmacol* 1998; 347: 87-94.

Keidel A, Mischke R. [Clinical evaluation of platelet function analyzer PFA-100 in dogs]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1998a; 111: 452-6.

Keidel A, Mischke R. Clinical evaluation of platelet function analyzer PFA-100 in dogs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1998b; 111: 452-6.

Kol A, Borjesson DL. Application of thrombelastography/thromboelastometry to veterinary medicine. *Vet Clin Pathol* 2010; 39: 405-16.

Kovacs T, Berger G, Corvazier E, Paszty K, Brown A, Bobe R, Papp B, Wuytack F, Cramer EM, Enouf J. Immunolocalization of the multi-sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase system in human platelets. *Br J Haematol* 1997; 97: 192-203.

Kozek-Langenecker SA. Effects of hydroxyethyl starch solutions on hemostasis. *Anesthesiology* 2005; 103: 654-60.

Kozek-Langenecker SA, Jungheinrich C, Sauermann W, Van der Linden P. The effects of hydroxyethyl starch 130/0.4 (6%) on blood loss and use of blood products in major surgery: a pooled analysis of randomized clinical trials. *Anesth Analg* 2008; 107: 382-90.

Kristensen AT, Wiinberg B, Jessen LR, Andreasen E, Jensen AL. Evaluation of

human recombinant tissue factor-activated thromboelastography in 49 dogs with neoplasia. J Vet Intern Med 2008; 22: 140-7.

Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. Blood 1996; 88: 1525-41.

Kruse B. Durchflusszytometrie Bochum: Ruhr-Universität Bochum 2012; 23.07.2012: <http://www.ruhr-uni-bochum.de/homeexpneu/forschung/dienstleistungen/facs.html.de>. 08.10.2012.

Kuehn NF, Gaunt SD. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. J Am Vet Med Assoc 1985; 186: 355-8.

Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Davidson RM, Ostgaard RA. Description of an in vitro platelet function analyzer--PFA-100. Semin Thromb Hemost 1995; 21 Suppl 2: 106-12.

Kyrle PA, Stockenhuber F, Brenner B, Gossinger H, Korninger C, Pabinger I, Sunder-Plassmann G, Balcke P, Lechner K. Evidence for an increased generation of prostacyclin in the microvasculature and an impairment of the platelet alpha-granule release in chronic renal failure. Thromb Haemost 1988; 60: 205-8.

Lackner H. Hemostatic abnormalities associated with dysproteinemias. Semin Hematol 1973; 10: 125-33.

Laffi G, Cominelli F, Ruggiero M, Fedi S, Chiarugi VP, La Villa G, Pinzani M, Gentilini P. Altered platelet function in cirrhosis of the liver: impairment of inositol lipid and arachidonic acid metabolism in response to agonists. Hepatology 1988; 8: 1620-6.

Linden MD, Frelinger AL, 3rd, Barnard MR, Przyklenk K, Furman MI, Michelson AD. Application of flow cytometry to platelet disorders. Semin Thromb Hemost 2004; 30: 501-11.

Liu FC, Liao CH, Chang YW, Liou JT, Day YJ. Hydroxyethyl starch interferes with human blood ex vivo coagulation, platelet function and sedimentation. *Acta Anaesthesiol Taiwan* 2009; 47: 71-8.

Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res* 2001; 88: 756-62.

Lutze G, S.Kropf. Bleeding time in vitro measured by the PFA-100 system: Pre-analytical conditions for blood collection. *J Lab Med* 2004; 28: 463-9.

Machleidt C, Mettang T, Starz E, Weber J, Risler T, Kuhlmann U. Multifactorial genesis of enhanced platelet aggregability in patients with nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1989; 36: 1119-24.

Madjdipour C, Dettori N, Frascarolo P, Burki M, Boll M, Fisch A, Bombeli T, Spahn DR. Molecular weight of hydroxyethyl starch: is there an effect on blood coagulation and pharmacokinetics? *Br J Anaesth* 2005; 94: 569-76.

Mallett SV, Cox DJ. Thrombelastography. *Br J Anaesth* 1992; 69: 307-13.

Mammen EF, Alshameeri RS, Comp PC. Preliminary data from a field trial of the PFA-100 system. *Semin Thromb Hemost* 1995; 21 Suppl 2: 113-21.

Mammen EF, Comp PC, Gosselin R, Greenberg C, Hoots WK, Kessler CM, Larkin EC, Liles D, Nugent DJ. PFA-100 system: a new method for assessment of platelet dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24: 195-202.

Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Safier LB, Hajjar KA, Posnett DN, Schoenborn MA, Schooley KA, Gayle RB, Maliszewski CR. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest* 1997; 99: 1351-60.

Marks SL. The buccal mucosal bleeding time. *J Am Anim Hosp Assoc* 2000; 36:

289-90.

Maynard DM, Heijnen HF, Horne MK, White JG, Gahl WA. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1945-55.

McCarroll DR, Waters DC, Steidley KR, Clift R, McDonald TP. Canine platelet von Willebrand factor: quantification and multimeric analysis. *Exp Hematol* 1988; 16: 929-37.

McKenzie ME, Gurbel PA, Levine DJ, Serebruany VL. Clinical utility of available methods for determining platelet function. *Cardiology* 1999; 92: 240-7.

McKenzie S, Reilly M. Platelet clearance. In: *Thrombozytopenia*. McCrae K, ed. New York: Taylor & Francis 2006: 101-14.

McMichael M. Primary hemostasis. *JVECC* 2005; 15: 1-8.

McNicol A, Israels SJ. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res* 1999; 95: 1-18.

McNiel EA, Ogilvie GK, Fettman MJ, Salman MD. Platelet hyperfunction in dogs with malignancies. *J Vet Intern Med* 1997; 11: 178-82.

Meyer D, Pietu G, Fressinaud E, Girma JP. Von Willebrand factor: structure and function. *Mayo Clin Proc* 1991; 66: 516-23.

Mezzano D, Tagle R, Pais E, Panes O, Perez M, Downey P, Munoz B, Aranda E, Barja P, Thambo S, Gonzalez F, Mezzano S, Pereira J. Endothelial cell markers in chronic uremia: relationship with hemostatic defects and severity of renal failure. *Thromb Res* 1997; 88: 465-72.

Michelson AD. How platelets work: platelet function and dysfunction. *J Thromb*

Thrombolysis 2003; 16: 7-12.

Michelson AD. Methods for the measurement of platelet function. *Am J Cardiol* 2009; 103: 20A-6A.

Mischke R, Keidel A. [Preclinical studies for the use of the platelet function analyser PFA-100 with the collagen/ADP cartridge in dogs]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2002; 109: 235-8.

Mischke R, Keidel A. Influence of platelet count, acetylsalicylic acid, von Willebrand's disease, coagulopathies, and haematocrit on results obtained using a platelet function analyser in dogs. *Vet J* 2003; 165: 43-52.

Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, Nolasco L, Hellums JD. Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin. *Blood* 1988; 71: 1366-74.

Moritani C, Ishioka S, Haruta Y, Kambe M, Yamakido M. Activation of platelets in bronchial asthma. *Chest* 1998; 113: 452-8.

Niemi TT, Kuitunen AH. Artificial colloids impair haemostasis. An in vitro study using thromboelastometry coagulation analysis. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005; 49: 373-8.

Noris M, Benigni A, Boccardo P, Aiello S, Gaspari F, Todeschini M, Figliuzzi M, Remuzzi G. Enhanced nitric oxide synthesis in uremia: implications for platelet dysfunction and dialysis hypotension. *Kidney Int* 1993; 44: 445-50.

Nurden AT, Caen JP. Specific roles for platelet surface glycoproteins in platelet function. *Nature* 1975; 255: 720-2.

Nurden AT, Caen JP. Role of surface glycoproteins in human platelet function.



Thromb Haemost 1976; 35: 139-50.

Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia. Orphanet J Rare Dis 2006; 1: 10.

Omar MN, Shouk TA, Khaleq MA. Activity of blood coagulation and fibrinolysis during and after hydroxyethyl starch (HES) colloidal volume replacement. Clin Biochem 1999; 32: 269-74.

Paltrinieri S, Meazza C, Giordano A, Tunesi C. Validation of thromboelastometry in horses. Vet Clin Pathol 2008; 37: 277-85.

Penny R, Castaldi PA, Whitsed HM. Inflammation and haemostasis in paraproteinaemias. Br J Haematol 1971; 20: 35-44.

Perkins HA, MacKenzie MR, Fudenberg HH. Hemostatic defects in dysproteinemias. Blood 1970; 35: 695-707.

Picker SM. In-vitro assessment of platelet function. Transfus Apher Sci 2011; 44: 305-19.

Posan E, McBane RD, Grill DE, Motsko CL, Nichols WL. Comparison of PFA-100 testing and bleeding time for detecting platelet hypofunction and von Willebrand disease in clinical practice. Thromb Haemost 2003; 90: 483-90.

Rahman S, Lu X, Kakkar VV, Authi KS. The integrin alpha IIb beta 3 contains distinct and interacting binding sites for snake-venom RGD (Arg-Gly-Asp) proteins. Evidence that the receptor-binding characteristics of snake-venom RGD proteins are related to the amino acid environment flanking the sequence RGD. Biochem J 1995; 312 ( Pt 1): 223-32.

Reinhart WH, Felix C. Influence of propofol on erythrocyte morphology, blood viscosity and platelet function. Clin Hemorheol Microcirc 2003; 29: 33-40.

Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001; 12: 261-73.

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

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

Rostagno C, Abbate R, Gensini GF, Coppo M, Prisco D, Boddi M, Neri Serneri GG. In vitro effects of two novel calcium antagonists (nitrendipine and nisoldipine) on intraplatelet calcium redistribution, platelet aggregation and thromboxane A<sub>2</sub> formation. Comparison with diltiazem, nifedipine and verapamil. *Thromb Res* 1991; 63: 457-62.

Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1335-42.

Savion N, Varon D. Impact--the cone and plate(let) analyzer: testing platelet function and anti-platelet drug response. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006; 35: 83-8.

Schafer AI. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. *J Clin Pharmacol* 1995; 35: 209-19.

Schafer AI. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory therapy on platelets. *Am J Med* 1999; 106: 25S-36S.

Scharbert G, Deusch E, Kress HG, Greher M, Gustorff B, Kozek-Langenecker SA. Inhibition of platelet function by hydroxyethyl starch solutions in chronic pain patients undergoing peridural anesthesia. *Anesth Analg* 2004; 99: 823-7.

Schermerhorn T, Barr SC, Stoffregen DA, Koren-Roth Y, Erb HN. Whole-blood

platelet aggregation, buccal mucosa bleeding time, and serum cephalothin concentration in dogs receiving a presurgical antibiotic protocol. *Am J Vet Res* 1994; 55: 1602-7.

Schmitt A, Guichard J, Masse JM, Debili N, Cramer EM. Of mice and men: comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets. *Exp Hematol* 2001; 29: 1295-302.

Segura D, Monreal L, Espada Y, Pastor J, Mayos I, Homedes J. Assessment of a platelet function analyser in horses: reference range and influence of a platelet aggregation inhibitor. *Vet J* 2005; 170: 108-12.

Sehgal S, Storrie B. Evidence that differential packaging of the major platelet granule proteins von Willebrand factor and fibrinogen can support their differential release. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2009-16.

Skaer RJ, Peters PD, Emmines JP. The localization of calcium and phosphorus in human platelets. *J Cell Sci* 1974; 15: 679-82.

Smart L, Jandrey KE, Kass PH, Wierenga JR, Tablin F. The effect of Hetastarch (670/0.75) in vivo on platelet closure time in the dog. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2009; 19: 444-9.

Smith SA, McMichael M, Galligan A, Gilor S, Hoh CM. Clot formation in canine whole blood as measured by rotational thromboelastometry is influenced by sample handling and coagulation activator. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010; 21: 692-702.

Stafford NP, Pink AE, White AE, Glenn JR, Heptinstall S. Mechanisms involved in adenosine triphosphate--induced platelet aggregation in whole blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1928-33.

Stogermuller B, Stark J, Willschke H, Felfernig M, Hoerauf K, Kozek-

Langenecker SA. The effect of hydroxyethyl starch 200 kD on platelet function. *Anesth Analg* 2000; 91: 823-7.

Stokol T. Disorders of Haemostasis. In: BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology, 2 edn. Villiers E, Blackwood L, eds. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association 2005: 83-98.

Strauss RG, Stansfield C, Henriksen RA, Villhauer PJ. Pentastarch may cause fewer effects on coagulation than hetastarch. *Transfusion* 1988; 28: 257-60.

Sumpelmann R, Kretz FJ, Luntzer R, de Leeuw TG, Mixa V, Gabler R, Eich C, Hollmann MW, Osthaus WA. Hydroxyethyl starch 130/0.42/6:1 for perioperative plasma volume replacement in 1130 children: results of an European prospective multicenter observational postauthorization safety study (PASS). *Paediatr Anaesth* 2012; 22: 371-8.

Thomas JS, Rogers KS. Platelet aggregation and adenosine triphosphate secretion in dogs with untreated multicentric lymphoma. *J Vet Intern Med* 1999; 13: 319-22.

Thomas S. Platelet membrane glycoproteins in haemostasis. *Clin Lab* 2002; 48: 247-62.

Toth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 2006; 96: 781-8.

Treib J, Haass A, Pindur G, Seyfert UT, Treib W, Grauer MT, Jung F, Wenzel E, Schimrigk K. HES 200/0.5 is not HES 200/0.5. Influence of the C2/C6 hydroxyethylation ratio of hydroxyethyl starch (HES) on hemorheology, coagulation and elimination kinetics. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1452-6.

Treib J, Haass A, Pindur G, Grauer MT, Wenzel E, Schimrigk K. All medium

starches are not the same: influence of the degree of hydroxyethyl substitution of hydroxyethyl starch on plasma volume, hemorrheologic conditions, and coagulation. *Transfusion* 1996; 36: 450-5.

Treib J, Haass A, Pindur G, Grauer MT, Jung F, Wenzel E, Schimrigk K. Increased haemorrhagic risk after repeated infusion of highly substituted medium molecular weight hydroxyethyl starch. *Arzneimittelforschung* 1997a; 47: 18-22.

Treib J, Haass A, Pindur G. Coagulation disorders caused by hydroxyethyl starch. *Thromb Haemost* 1997b; 78: 974-83.

Tschoepe D, Roesen P, Schwippert B, Gries FA. Platelets in diabetes: the role in the hemostatic regulation in atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost* 1993; 19: 122-8.

Van der Linden P, Ickx BE. The effects of colloid solutions on hemostasis. *Can J Anaesth* 2006; 53: S30-9.

Van Werkum JW, Bouman HJ, Breet NJ, ten Berg JM, Hackeng CM. The Cone-and-Plate(let) analyzer is not suitable to monitor clopidogrel therapy: a comparison with the flowcytometric VASP assay and optical aggregometry. *Thromb Res* 2010; 126: 44-9.

Varela F, Font X, Valladares JE, Alberola J. Thrombocytopathia and light-chain proteinuria in a dog naturally infected with *Ehrlichia canis*. *J Vet Intern Med* 1997; 11: 309-11.

Varon D, Dardik R, Shenkman B, Kotev-Emeth S, Farzame N, Tamarin I, Savion N. A new method for quantitative analysis of whole blood platelet interaction with extracellular matrix under flow conditions. *Thromb Res* 1997; 85: 283-94.

Von Kaulla KN, Ostendorf P, von Kaulla E. The impedance machine: a new bedside coagulation recording device. *J Med* 1975; 6: 73-88.

Wagg CR, Boysen SR, Bedard C. Thrombelastography in dogs admitted to an intensive care unit. *Vet Clin Pathol* 2009; 38: 453-61.

Walker D. Peripheral blood smears. In: *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*, Third Edition edn. Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth J, DeNicola D, eds. St. Louis: Mosby Elsevier 2008: 390-421.

Walkowiak B, Michalak E, Borkowska E, Koziolkiewicz W, Cierniewski CS. Concentration of RGDS-containing degradation products in uremic plasma is correlated with progression in renal failure. *Thromb Res* 1994; 76: 133-44.

Watala C, Pluta J, Golanski J, Rozalski M, Czyz M, Trojanowski Z, Drzewoski J. Increased protein glycation in diabetes mellitus is associated with decreased aspirin-mediated protein acetylation and reduced sensitivity of blood platelets to aspirin. *J Mol Med (Berl)* 2005; 83: 148-58.

Westphal M, James MF, Kozek-Langenecker S, Stocker R, Guidet B, Van Aken H. Hydroxyethyl starches: different products--different effects. *Anesthesiology* 2009; 111: 187-202.

White JG, Escolar G. The blood platelet open canalicular system: a two-way street. *Eur J Cell Biol* 1991; 56: 233-42.

White JG. Platelets are coverocytes, not phagocytes: uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system. *Platelets* 2005; 16: 121-31.

Wierenga JR, Jandrey KE, Haskins SC, Tablin F. In vitro comparison of the effects of two forms of hydroxyethyl starch solutions on platelet function in dogs. *Am J Vet Res* 2007; 68: 605-9.

Wiinberg B, Jensen AL, Rojkaer R, Johansson P, Kjølgaard-Hansen M, Kristensen AT. Validation of human recombinant tissue factor-activated thromboelastography on citrated whole blood from clinically healthy dogs. *Vet*

Clin Pathol 2005; 34: 389-93.

Wiinberg B, Jensen AL, Johansson PI, Rozanski E, Tranholm M, Kristensen AT. Thromboelastographic evaluation of hemostatic function in dogs with disseminated intravascular coagulation. J Vet Intern Med 2008; 22: 357-65.

Wiinberg B, Jensen AL, Rozanski E, Johansson PI, Kjelgaard-Hansen M, Tranholm M, Kristensen AT. Tissue factor activated thromboelastography correlates to clinical signs of bleeding in dogs. Vet J 2009; 179: 121-9.

Willis SE, Jackson ML, Meric SM, Rousseaux CG. Whole blood platelet aggregation in dogs with liver disease. Am J Vet Res 1989; 50: 1893-7.

Wolf RF, Peng J, Friese P, Gilmore LS, Burstein SA, Dale GL. Erythropoietin administration increases production and reactivity of platelets in dogs. Thromb Haemost 1997; 78: 1505-9.

## VIII. DANKSAGUNG

Besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. med. vet. Katrin Hartmann für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung aller notwendigen Materialien.

Ebenfalls möchte ich ganz herzlich Dr. med. vet. Katja Adamik, welche die Idee für diese Studie hatte, für ihre persönliche und engagierte Betreuung bei dieser Arbeit danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. med. vet. Karin Weber für die Unterstützung bei der Labortätigkeit während des experimentellen Teils dieser Arbeit und der Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei Stephanie Rubenbauer für die statistische Auswertung dieser Arbeit und der Beteiligung am Paper danken.

Großem Dank gilt auch Steve Sattler für die stetige und zuverlässige Hilfe bei aufgetretenen Computerproblemen.

Auch danke ich all den Studienpatienten und Besitzern für die Teilnahme an meiner Studie.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meiner Schwester für den immerwährenden Rückhalt und die stetige Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.