

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

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

„Klinische Untersuchung und Thrombozytenfunktionsdiagnostik
mittels Multiplate® bei Rindern mit Blutungsneigung der Rasse
Deutsches Fleckvieh mit Verdacht auf eine erblich bedingte
Gerinnungsstörung und Ermittlung von Referenzwerten in der
Multiplate®-Impedanzaggregometrie für Bullen, Kühe und
Jungrinder der Rasse Deutsches Fleckvieh“

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Lisa Lüchtenborg
aus Flörsheim am Main

München 2014

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Tag der Promotion: 08. Februar 2014

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|---|-----------|
| I. | EINLEITUNG | 1 |
| II. | LITERATURÜBERSICHT | 3 |
| 1. | Thrombozyten..... | 3 |
| 1.1. | Entstehung | 3 |
| 1.2. | Thrombozytenstruktur | 3 |
| 2. | Hämostase | 6 |
| 2.1. | Physiologischer Ablauf der Hämostase..... | 6 |
| 2.1.1. | Primäre Hämostase..... | 6 |
| 2.1.2. | Sekundäre Hämostase | 8 |
| 2.1.3. | Physiologische Inhibition der Blutgerinnung..... | 10 |
| 2.2. | Störungen der Hämostase..... | 10 |
| 3. | Thrombozytopathien..... | 11 |
| 3.1. | Rezeptorglykoproteindefekte | 12 |
| 3.1.1. | Bernard-Soulier-Syndrom (BSS) beim Menschen..... | 12 |
| 3.1.2. | Glanzmann-Thrombasthenie (GT) bei Mensch, Hund und Pferd..... | 12 |
| 3.1.3. | Plättchentyp des von-Willebrand-Syndroms (Pseudo-vWS) beim Menschen | 14 |
| 3.2. | Speicherdefekte | 15 |
| 3.2.1. | Hereditäre Storage-Pool-Disease | 15 |
| 3.2.1.1. | α -Granula-Defekte..... | 15 |
| 3.2.1.1.1. | Grey-platelet-Syndrom beim Menschen | 15 |
| 3.2.1.1.2. | Quebec-Thrombozytenstörung beim Menschen | 16 |
| 3.2.1.2. | δ -Granula-Defekte..... | 17 |
| 3.2.1.2.1. | Isolierter δ -Granuladefekt beim Menschen..... | 17 |
| 3.2.1.2.2. | Hermansky-Pudlak Syndrom (HPS) beim Menschen..... | 17 |
| 3.2.1.2.3. | Chediak-Higashi Syndrom (CHS) bei Mensch, Rind und anderen Spezies .. | 18 |
| 3.3. | Defekte anderer Strukturen innerhalb der Thrombozyten..... | 19 |
| 3.3.1. | Scott Syndrom (SS) bei Mensch und Hund | 19 |
| 3.3.2. | Hereditäre Thrombozytopathie Simmentaler Rinder | 20 |
| 4. | Multiplate®-System | 23 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 4.1. | Geräteaufbau | 23 |
| 4.1.1. | Messkanäle | 24 |
| 4.1.2. | Messzellen | 24 |
| 4.2. | Messprinzip | 24 |
| 4.2.1. | Parameter | 25 |
| 4.3. | Multiplate®-Reagenzien | 26 |
| 4.4. | Blutentnahmesystem | 28 |
| 4.5. | Blutproben | 28 |
| III. | MATERIAL UND METHODEN | 29 |
| 1. | Untersuchung von Tieren mit Verdacht auf eine Thrombozytopathie... .. | 29 |
| 1.1. | Tiere | 29 |
| 1.1.1. | Im Rahmen der Studie durchgeführte Erstuntersuchung | 29 |
| 1.1.2. | Klinikeigene Tiere mit Thrombozytopathie | 29 |
| 1.1.3. | Zweituntersuchung nach Fragebogendurchführung | 30 |
| 1.1.4. | Kontrolltiere | 30 |
| 1.2. | Verwendete Materialien | 31 |
| 1.2.1. | Blutproben | 31 |
| 1.2.2. | Thrombozytenfunktionsmessung | 31 |
| 1.3. | Methoden | 32 |
| 1.3.1. | Klinische Untersuchung | 32 |
| 1.3.2. | Blutentnahme | 33 |
| 1.3.3. | Blutprobenauswertung | 33 |
| 1.3.4. | Thrombozytenfunktionsmessung | 33 |
| 1.3.4.1. | Vorbereitung der Impedanzmessung | 33 |
| 1.3.4.2. | Impedanzmessung | 34 |
| 1.3.4.3. | Beurteilung der Messergebnisse | 35 |
| 1.3.5. | Genetische Untersuchung | 35 |
| 2. | Ermittlung von Referenzwerten für das Multiplate®-Gerät | 36 |
| 2.1. | Tiere | 36 |
| 2.2. | Verwendete Materialien | 36 |
| 2.2.1. | Blutproben | 36 |
| 2.2.2. | Thrombozytenfunktionsmessung | 36 |
| 2.3. | Methoden | 37 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.3.1. | Blutentnahme | 37 |
| 2.3.2. | Blutprobenauswertung | 37 |
| 2.3.3. | Statistische Auswertung | 37 |
| IV. | ERGEBNISSE | 39 |
| 1. | Untersuchung von Tieren mit Verdacht auf Thrombozytopathie..... | 39 |
| 1.1. | Verdachtsfälle..... | 39 |
| 1.2. | Thrombozytopathie-Tiere..... | 39 |
| 1.2.1. | Klinische Anzeichen | 39 |
| 1.2.2. | Geschlechterverteilung..... | 42 |
| 1.2.3. | Altersverteilung..... | 42 |
| 1.2.4. | Thrombozytenkonzentration | 43 |
| 1.2.5. | Thrombozytenfunktionsmessung | 45 |
| 1.2.5.1. | AUC-Werte nach Stimulation mit Collagen-Reagenz | 46 |
| 1.2.5.2. | AUC-Werte nach Stimulation mit ADP-Reagenz..... | 46 |
| 1.2.6. | Klinischer Verlauf der klinikeigenen Tiere mit Thrombozytopathie..... | 47 |
| 1.2.6.1. | Kliniktier 2012/1017 | 47 |
| 1.2.6.2. | Kliniktier 2013/0344 | 47 |
| 1.2.7. | Fragebogenauswertung..... | 50 |
| 2. | Ermittlung von Referenzwerten für das Multiplate®- Impedanzaggregometer | 51 |
| 2.1. | Bullen | 51 |
| 2.1.1. | Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und den AUC- Werten (Units) der Thrombozytenfunktion..... | 53 |
| 2.2. | Kühe | 55 |
| 2.2.1. | Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und den AUC- Werten (Units) der Thrombozytenfunktion..... | 57 |
| 2.3. | Jungrinder..... | 58 |
| 2.3.1. | Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und den AUC- Werten (Units) der Thrombozytenfunktion..... | 60 |
| 2.4. | Vergleich der AUC-Werte der Thrombozytenfunktion (Units) von Bullen, Kühen und Jungrindern miteinander | 61 |
| 2.5. | Vergleich der Referenzbereiche für das Multiplate®- Impedanzaggregometer bei Bullen, Kühen und Jungrindern in Abhängigkeit der Aktivierungsreagenzien Col (5 µg/ml) und | |

| | | |
|--------------|---|------------|
| | ADP (18 μ mol/l) | 63 |
| 2.6. | Vergleich der Thrombozytenkonzentrationen von Bullen, K \ddot{u} hen und Jungrindern miteinander..... | 64 |
| V. | DISKUSSION | 66 |
| 1. | Tierauswahl..... | 66 |
| 2. | Multiplate[®]-Untersuchungen | 66 |
| 3. | Genetische Untersuchung..... | 69 |
| 4. | Ph\ddot{a}notyp | 71 |
| 4.1. | Klinische Symptome | 71 |
| 4.1.1. | Hautblutungen | 71 |
| 4.1.2. | Blutbeimengungen im Kot | 72 |
| 4.1.3. | Nasenbluten..... | 72 |
| 4.1.4. | H \ddot{a} matome | 73 |
| 4.1.5. | Weitere Symptome..... | 74 |
| 4.2. | Labordiagnostik..... | 74 |
| 4.3. | Multiplate [®] -Ergebnisse | 75 |
| 4.4. | M \ddot{o} gliche Kofaktoren | 76 |
| 4.5. | Altersverteilung..... | 77 |
| 5. | Prophylaxe und symptomatische Therapie | 78 |
| 6. | HTS aus Sicht der Landwirte (Fragebogenauswertung)..... | 79 |
| 7. | Ermittelte Referenzwerte | 80 |
| VI. | ZUSAMMENFASSUNG | 84 |
| VII. | SUMMARY..... | 86 |
| VIII. | LITERATURVERZEICHNIS | 87 |
| IX. | ANHANG | 106 |
| X. | DANKSAGUNG | 113 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Im Text verwendete Abkürzungen:

| | | |
|------------------|---|--|
| α | = | alpha |
| ADP | = | Adenosindiphosphat |
| Aqua dest. | = | destilliertes Wasser |
| ASPI | = | Arachidonsäure |
| ATP | = | Adenosintriphosphat |
| AU | = | Aggregation Unit |
| AUC | = | Area Under the Curve |
| AU*Min | = | Aggregation Units pro Minute (Einheit für AUC) |
| BNP | = | Bovine Neonatale Panzytopenie |
| BSS | = | Bernard-Soulier Syndrom |
| bzw. | = | beziehungsweise |
| C | = | Cytosin |
| °C | = | Grad Celsius |
| Ca ²⁺ | = | ionisiertes Kalzium |
| Cal | = | Kalzium |
| Cal/DAG-GEFI | = | Calcium Diacylglycerol Guanine Nucleotide Exchange Factor I |
| CHS | = | Chediak-Higashi Syndrom |
| Col | = | Kollagen |
| COX | = | Cyclooxygenase |
| CSS | = | Canines Scott Syndrom |
| δ | = | delta |
| d | = | days |

| | | |
|--------|---|--|
| DAG | = | Diacylglycerol |
| DARE | = | Delay in Activated - GPIIb/IIIa - Receptor Expression |
| DFV | = | Deutsches Fleckvieh |
| DIC | = | Disseminated Intravascular Coagulation |
| DNA | = | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | = | Ethylendiamintetraacetat |
| et al. | = | et alii |
| F | = | Plasma-Faktor |
| FIII | = | Tissue Factor |
| fl | = | femtoliter |
| 5-HT2A | = | 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) |
| G | = | Giga |
| GP | = | Glykoprotein |
| GT | = | Glanzmann-Thrombasthenie |
| h | = | Stunden |
| Hkt | = | Hämatokrit |
| HPS | = | Hermansky-Pudlak Syndrom |
| HTS | = | Hereditäre Thrombozytopathie Simmentaler Rinder |
| IGA2B | = | integrin alpha 2 beta |
| KST | = | Kolmogorov-Smirnov Test |
| LMU | = | Ludwig-Maximilians-Universität |
| µg | = | Mikrogramm |
| µl | = | Mikroliter |

| | | |
|-----------------|---|-------------------------------------|
| µm | = | Mikrometer |
| µm ² | = | Quadratmikrometer |
| µmol | = | Mikromol |
| M. | = | Musculus |
| Max. | = | Maximum |
| Min | = | Minuten |
| Min. | = | Minimum |
| ml | = | Milliliter |
| mRNA | = | messenger Ribonukleinsäure |
| Multiplate® | = | multiple platelet function analyzer |
| NaCl | = | Natriumchlorid |
| NBEAL2 | = | Neurobeachin like 2 |
| NO | = | Stickstoffmonoxid |
| p | = | Wahrscheinlichkeit |
| P2 | = | Purinerges Rezeptor (Purinozeptor) |
| PAF | = | platelet activating factor |
| PAR | = | proteinase-activated receptor |
| PC | = | Phosphatidylcholin |
| PE | = | Phosphatidylethanolamin |
| PG E1 | = | Prostaglandin E1 |
| PG I2 | = | Prostacyclin |
| PLAU | = | Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Gen |
| PS | = | Phosphatidylserin |
| Pseudo vWS | = | Pseudo-von-Willebrand Syndrom |
| PTFE | = | Polytetrafluorethylen |

| | | |
|------------------|---|--------------------------------------|
| r | = | Korrelationskoeffizient |
| Rap1b | = | Ras family Small GTP binding protein |
| Ras | = | Rat sarcoma |
| RasGRP2 | = | guanyl-releasing protein 2 |
| RUO | = | research use only |
| SD | = | Standardabweichung |
| SM | = | Sphingomyelin |
| SS | = | Scott Syndrom |
| T | = | Thymin |
| TF | = | Tissue Factor, Thromboplastin |
| TI | = | Thrombin-Inhibitor |
| TMEM16F | = | transmembran Protein 16 |
| TRAP | = | Thrombin Receptor Activating Peptide |
| TUM | = | Technische Universität München |
| TXA ₂ | = | Thromboxan A ₂ |
| U | = | Units (1 U = 10 AU*Min) |
| uPA | = | Urokinasen Typ-Plasminogen-Aktivator |
| vWF | = | von Willebrand Faktor |
| \bar{x} | = | Mittelwert |
| % | = | Prozent |

I. EINLEITUNG

Seit 2007 wurde an der Klinik für Wiederkäuer in Oberschleißheim ein vermehrtes Aufkommen von Kälbern mit Blutungsneigung festgestellt (FRIEDRICH et al., 2011). Im Vergleich zum Zeitraum von 1989 bis 2007, in welchem insgesamt 89 Klinikpatienten unterschiedlichsten Alters mit hämorrhagischer Diathese unterschiedlicher Ursachen auftraten (RACZYNSKI, 2011), wurden von 2007 bis 2010 dagegen allein 137 Kälber mit Blutungsneigung erfasst, die nachweislich an dem Krankheitsbild der Bovinen Neonatalen Panzytopenie (BNP) litten (CARLIN, 2011). Im Rahmen mehrerer Dissertationen über die epidemiologische Untersuchung zur BNP mit besonderer Berücksichtigung des Betriebs- und Kolostrummanagements (CARLIN, 2011; STOLL, 2013) wurden in den Jahren 2011 und 2012 Tierärzte gebeten, Blutproben von Kälbern mit Blutungsneigung an die Klinik für Wiederkäuer einzusenden. Neben den Tieren, denen aufgrund ihrer Blutwerte (erniedrigte Thrombozyten- und Leukozytenwerte) und einer anschließenden Sektion - oder ausschließlich durch diese - das Krankheitsbild der BNP zugeordnet werden konnte, gab es auch solche mit physiologischen oder nach bisher anerkannten Referenzwerten erhöhten Thrombozyten- und Leukozytenwerten. Diese Tiere wurden den zu BNP differentialdiagnostischen Fällen zugeordnet. In Anlehnung an nordamerikanische Studien, die von Simmentaler Rindern (Fleckvieh) mit Blutungsneigung, trotz physiologischer Thrombozytenkonzentration, berichteten, wurden ausschließlich Rinder der Rasse Deutsches Fleckvieh auf eine Thrombozytopathie untersucht und beprobt.

Schwerpunkt dieser Arbeit war die Abklärung differentialdiagnostischer Fälle, die im Rahmen der oben beschriebenen BNP-Abklärung auftraten und das Erfassen „neuer Fälle“ mit dem Krankheitsbild der Hereditären Thrombozytopathie Simmentaler Rinder (HTS). Zur Identifizierung dieser Thrombozytenfunktionsstörung führten wir Thrombozytenfunktionstests am Impedanzaggregometer Multiplate® durch. Aus der Summe der damit erfassten Falltiere wurden die klinischen Symptome erhoben und beschrieben, um den Phänotyp der HTS zu charakterisieren. LEIPOLD und MOORE berichteten 1977 erstmals von Simmentaler Rindern mit Blutungsneigung (zitiert in (WEISSER et al., 2010)). In anschließenden Fallbeschreibungen aus Nordamerika wird davon

ausgegangen, dass es sich bei dieser Art der Blutungsneigung um einen genetischen Defekt bei Simmentaler Rindern handelt, der eine solche hämorrhagische Diathese auslösen kann. Das Krankheitsbild bekam den Namen „Hereditäre Thrombozytopathie Simmentaler Rinder“ (HTS) zugewiesen (WEISSER et al., 2010). Genetische Untersuchungen des Blutes betroffener Tiere durch den Lehrstuhl für Tierzucht der Technischen Universität München (TUM) in Freising bestätigen das Vorliegen eines Gendefektes. An welcher Stelle der Hämostase sich der Gendefekt auswirkt, war zu diesem Zeitpunkt noch ungeklärt.

Ziele dieser Arbeit waren neben der Identifizierung der HTS bei DFV-Rindern mittels der Impedanzaggregometrie am Multiplate®, die Erhebung und Beschreibung der Symptome, die - bedingt durch diese erbliche Gerinnungsstörung - bei betroffenen Rindern auftreten können.

Referenzwerte in der Multiplate®-Impedanzaggregometrie wurden beim Rind bisher nur für Kälber der Rasse Deutsches Fleckvieh (DFV) ermittelt (HUBER, 2012). Im Rahmen dieser Dissertation sollen oben genannte Referenzwerte auch für Bullen, Kühe und Jungrinder der Rasse DFV erfasst werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Thrombozyten

Die größte Bedeutung der Thrombozyten liegt im Bereich der Hämostase. Ihre Hauptaufgabe besteht aus dem initialen Verschluss defekter Blutgefäße (BROOS et al., 2011). Die Funktion der Blutplättchen wird deutlich, wenn es durch Thrombozytopenie oder genetische Defekte an Thrombozytenrezeptoren zu Blutungen kommt (KIRCHMAIER und PILLITTERI, 2010).

1.1. Entstehung

Thrombozyten entstehen durch Abschnürung aus Megakaryozyten. Die Thrombozytenbildung besteht aus zwei Phasen: Im ersten Schritt proliferieren die Zellkerne der Megakaryozyten (Endomitose) und die Zytoplasmamasse nimmt zu. Proteine für das Zytoskelett und spezifische Blutplättchengranula, einschließlich ihrer Inhalte werden gebildet und in Membransysteme eingelagert. Ausgelöst wird dieser einige Tage dauernde Prozess durch spezifische Wachstumsfaktoren, wie z.B. Thrombopoetin. Der zweite Schritt umfasst die Bildung dünner, verzweigter Vorsprünge der Megakaryozyten, der sogenannten Pseudopodien. Über Mikrotubuli wandern dort synthetisierte Granula und Organellen aus dem Zellkörper ein. Am Ende dieser mehrstündigen Phase kommt es zur Abschnürung der so entstandenen Prothrombozyten. Dennoch kann es vorkommen, dass Blutplättchen noch mit anderen über eine Demarkationsmembran verbunden sind, wenn sie den Blutstrom erreichen. Diese werden aber endgültig in den Kapillaren von Lunge und Milz getrennt (KEHREL, 2008). Täglich werden etwa 10^3 Blutplättchen pro Megakaryozyt regeneriert. Da zudem pro Tag etwa 10^8 Megakaryozyten im Knochenmark neu gebildet werden, gelangen jeden Tag ca. 10^{11} Thrombozyten in die Blutbahn (HARTWIG und ITALIANO, 2003). Dort leben sie durchschnittlich 7-10 Tage, bevor sie über das retikuloendotheliale System in Milz, Leber und Lunge abgebaut werden.

1.2. Thrombozytenstruktur

Die Blutplättchen von Rindern sind mit einem Volumen von 3,2 - 5,4 fl etwa halb so groß wie die des Menschen (JAIN, 1993). Sie sind kernlos und haben ein scheibenförmig bis elliptisches Erscheinungsbild. Der lange Durchmesser eines

elliptischen Thrombozyten vom Rind misst etwa $6,08 \pm 1,03 \mu\text{m}$, der kurze $1,78 \pm 0,34 \mu\text{m}$ (MEYERS et al., 1982). Unter der Zelloberfläche spiralig angeordnete Mikrotubuli sorgen für die Aufrechterhaltung der Form (GADER et al., 2008). Die Mikrotubuli setzen sich aus Tubulin zusammen und spielen neben der Formgebung der Blutplättchen auch bei der Abschnürung der Prothrombozyten von den Megakaryozyten eine Rolle. Des Weiteren dienen Aktinpolymere der Formstabilität, die über Filamin und α -Aktinin sowohl untereinander, als auch über Glykoprotein Ib (GPIb) mit der Plasmamembran des Thrombozyten verbunden sind (HARTWIG und ITALIANO, 2003; KEHREL, 2008). Abgesehen vom Zellkern besteht der Thrombozyt wie andere Körperzellen aus einer Zellmembran, dem Zytoplasma und den darin eingelagerten Organellen (Abbildung 1). Die Thrombozytenmembran besteht aus Lipiden und Proteinen. Den Hauptanteil machen verschiedene Phospholipide aus, die inhomogen in der Membrandoppelschicht verteilt sind. Außen befinden sich in ruhenden Plättchen hauptsächlich Sphingomyelin und Phosphatidylcholin, während die innere Schicht Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Phosphatidylethanolamin trägt (KEHREL, 2008). Bei Aktivierung der Thrombozyten ändert sich die Phospholipidverteilung so, dass vermehrt saure Phospholipide (v.a. Phosphatidylserin) an die Oberfläche gelangen und aus einer zuvor neutral geladenen Thrombozytenmembran eine negative Oberfläche entsteht (Flip-Flop-Mechanismus) (HEMKER et al., 1983; KEHREL, 2008). Die Plasmamembran ist von einer Glykokalix umhüllt, die verschiedene Rezeptoren trägt, die für die Signalübertragung durch Agonisten und Inhibitoren in die Thrombozyten hinein verantwortlich sind (KEHREL, 2008). Im Gegensatz zu den Thrombozyten beim Menschen gibt es beim Rind kein offenes kanalikuläres System, das mit der Plasmamembran in Verbindung steht (WHITE, 1987). Demnach spielt das Kanalsystem bei der Blutplättchenfunktion beim Rind eine untergeordnete Rolle (ZUCKER-FRANKLIN et al., 1985). Lediglich das dichte tubuläre System, das aus dem endoplasmatischen Retikulum der Megakaryozyten hervorgeht, ist teilweise entwickelt. Es ist ein nach innen abgeschlossenes, elektronendichtes System, welches als wichtigster Speicherort für Kalzium und Ort der Prostaglandinsynthese fungiert (BERGMANN, 2006). Im Zytoplasma der Thrombozyten sind neben den Mikrofilamenten auch Glykogen, Lysosomen Mitochondrien und Speichergranula eingelagert (KEHREL, 2008). Die Speichergranula unterteilen sich in α -Granula und δ -Granula. Die α -Granula

boviner Thrombozyten sind zwar zahlenmäßig geringer, dafür aber doppelt so groß wie die des Menschen und nehmen den größten Raum im Zytoplasma ein. Sie sind in ruhenden Blutplättchen vor allem peripher lokalisiert und stehen oft mit der Plasmamembran in Kontakt. WHITE et al. (1987) beschreiben zwei Sekretionsmechanismen der Granula. Bei einer Variante fusionieren die oberflächlich liegenden Granula mit der Plasmamembran und sezernieren den Inhalt über diesen Weg in das äußere Medium. Im anderen Fall wird der Granulainhalt durch interne Kontraktion aktiv nach draußen befördert. Die α -Granula stellen sich unter dem Elektronenmikroskop homogen und mäßig elektronendicht dar. Sie haben hauptsächlich eine runde Form, können aber auch eine ovale oder trommelschlägelartige Gestalt annehmen. Sie beinhalten Adhäsionsproteine (Fibrinogen, von Willebrand Faktor (vWF), Thrombospondin, Multimerin, Fibronectin), Gerinnungsfaktoren (Plasmafaktor V (FV), FVIII), Faktoren der Fibrinolyse (Plasminogen, Plasminogen Activator Inhibitor (PAI) - 1), Zytokine und Wachstumsfaktoren (KEHREL, 2008; DUERSCHMIED und BODE, 2009). Die δ -Granula fallen durch einen stark elektronendichten Körper auf, der meist am Rand lokalisiert ist. Der restliche Inhalt erscheint weniger elektronendicht. Die δ -Granula von Thrombozyten sind Speicherorte für Kalzium, Serotonin, Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinriphosphat (ATP) und Polyphosphate (PUJOL-MOIX et al., 2000; NURDEN und NURDEN, 2008).

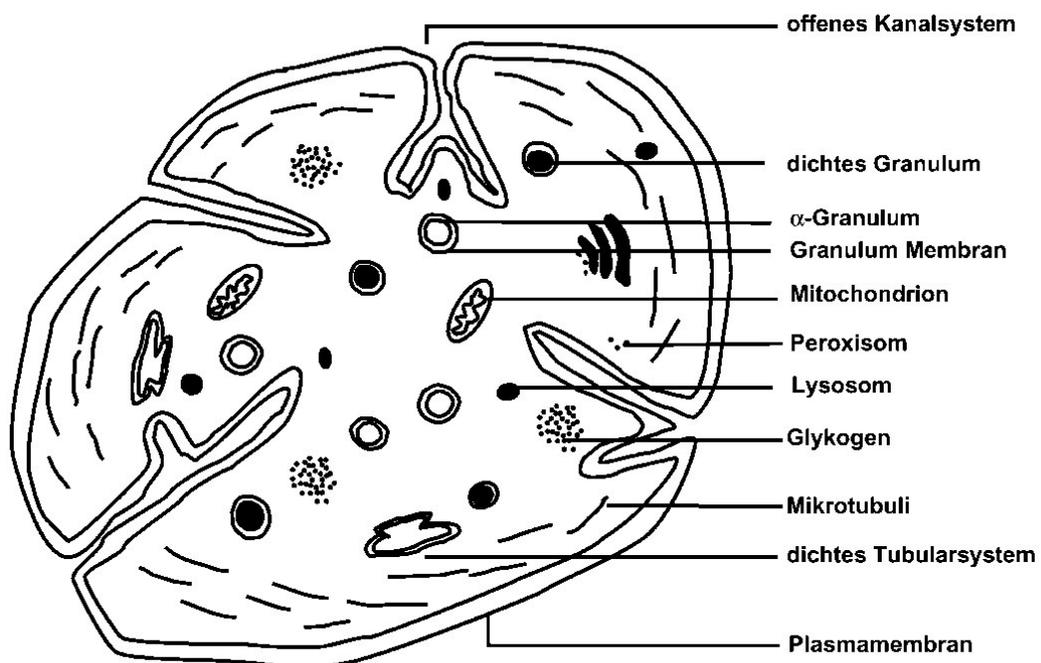


Abbildung 1: Morphologie eines ruhenden Thrombozyten beim Menschen (KEHREL, 2008).

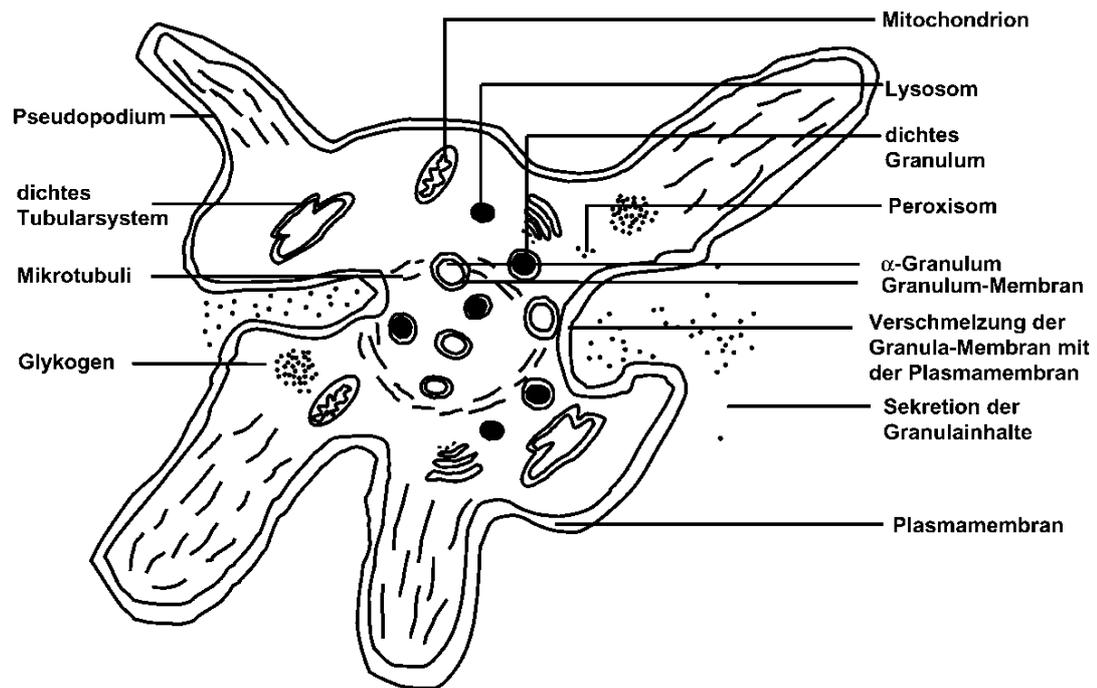


Abbildung 2: Morphologie eines aktivierten Thrombozyten beim Menschen (KEHREL, 2008).

2. Hämostase

2.1. Physiologischer Ablauf der Hämostase

Die Hämostase ist eine physiologische Antwort des Körpers auf eine Gefäßverletzung (MACKMAN et al., 2007). Das Blutgerinnungssystem muss schnell reagieren, um Blutverlust an der Verletzungsstelle des Gefäßes zu begrenzen (RENNE et al., 2006). Ziel der Hämostase ist die Bildung eines dichten Pfropfens aus Thrombozyten und Fibrin im Bereich der Gefäßverletzung (HOFFMAN, 2003) bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung des Blutflusses im intakten Gefäßbereich (RENNE et al., 2006). Die Blutkoagulation ist ein hochregulierter Prozess aus primärer (Plättchenaktivierung) und sekundärer Hämostase (Fibrinproduktion) (MULLER und RENNE, 2011), der sich zwischen Thrombozyten, Plasmafaktoren und verletzter Gefäßwand abspielt (RENNE et al., 2006).

2.1.1. Primäre Hämostase

Die Thrombozyten nehmen die Schlüsselrolle in der primären Hämostase ein. Die initiale Phase der primären Hämostase nennt sich Adhäsion und besteht aus der

Interaktion zwischen Thrombozyten und subendothelialer Matrix (KEHREL, 2008). Sie beginnt, sobald die kontinuierliche innere Schicht des Gefäßendothels unterbrochen ist. Die Blutplättchen gehen mit dem daraufhin freigelegten Subendothel eine Verbindung ein. Kollagen ist die bedeutendste Gefäßwandkomponente bei der Initiation der Thrombozytenadhäsion (BROOS et al., 2011). Von Willebrand Faktor, ein Plasmaprotein, dient bei der Adhäsion als Bindeglied zwischen dem membranständigen GPIb der Thrombozyten und dem Subendothel. GPIb bildet zusammen mit GPV und GPIX den GPIb/V/IX-Komplex, der den wichtigen vWF-Rezeptor darstellt (BEARDSLEY, 1990; KEHREL, 2008). Die Bindung von GPIb und vWF besteht nur von kurzer Dauer, reicht aber aus, um die Thrombozyten mit der Verletzungsstelle in engen Kontakt zu bringen. Weiterhin trägt GPIb zur Modulation und Verstärkung der Plättchenantwort auf Thrombin bei. Prothrombin (FII) wird als Vorstufe von Thrombin in der Leber synthetisiert und stetig ins Blut abgegeben. Erst bei Ablauf der Gerinnungskaskade wird es durch die Prothrombinase, einem Enzymkomplex aus FXa, Kalzium (Ca^{2+}), Phospholipide und FVa, zu Thrombin gespalten (NESHEIM et al., 1979; DAVIE und KULMAN, 2006). Die Bindungsstelle für Thrombin am GPIb-Rezeptor nimmt eine Schlüsselrolle in der Enthüllung einer negativ geladenen Thrombozytenoberfläche und der weiteren Thrombinbildung ein (DORMANN et al., 2000). Während der lockeren Verbindung bindet der Kollagenrezeptor GPVI des Thrombozyten direkt an Kollagen und löst dadurch eine Konformationsänderung des GPIa/IIa-Komplexes ($\alpha 2\beta 1$ -Integrin) aus (NIESWANDT und WATSON, 2003). Erst dadurch erlangt der GPIa/IIa-Komplex eine hohe Affinität zu Kollagen und demzufolge die Fähigkeit eine feste Verbindung mit Kollagen einzugehen. Weiterhin löst er in dieser Form eine Freisetzung von Thromboxan A_2 (TXA_2) und ADP aus (JUNG und MOROI, 2000; COSEMANS et al., 2008). Besteht eine feste Adhäsion zwischen Subendothel und Thrombozyten, kontrahieren sich die Thrombozyten, bilden Pseudopodien aus und werden aktiviert (Abbildung 2). Die Aktivierungsphase löst, vermittelt über Tyrosinkinase und G-Protein gekoppelte Rezeptoren, eine Signalkaskade aus (BROOS et al., 2011). Diese führt innerhalb der Thrombozyten zur Bildung von Arachidonsäure, die wiederum zu TXA_2 metabolisiert wird (BROOS et al., 2011), zur Produktion von Prostaglandinen und zur Freisetzung von Granulinhalt (ADP, Ca^{2+} , Serotonin) in das externe Milieu. TXA_2 trägt wiederum zur Plättchenaktivierung und -aggregation bei (HOURANI und

CUSACK, 1991). ADP spielt innerhalb der Plättchenaktivierung eine große Rolle und vermittelt seine aggregatorische Wirkung über purinerge Rezeptoren (P2) P2X1-, P2Y1- und P2Y12-Rezeptoren der Thrombozyten (GACHET, 2001b; MURUGAPPA und KUNAPULI, 2006). Serotonin löst eine Vasokonstriktion aus und aktiviert neben ADP die Thrombozyten über den Serotonin- oder 5-Hydroxytryptamin (5-HT_{2A})-Rezeptor (KEHREL, 2008). Unabdingbar für eine Plättchenaggregation sind die GPIIb/IIIa-Komplexe auf der Thrombozytenmembran. In Anwesenheit von Kalzium durchlaufen sie eine Konformationsänderung, durch die sie die Fähigkeit erlangen Fibrinogen zu binden (BEARDSLEY, 1990). Über diese Thrombozyten-Fibrinogen-Thrombozyten-Verknüpfung entsteht ein instabiler primärer Blutplättchenpfropf über der Verletzungsstelle, der durch Fibrinbildung während der sekundären Hämostase zu einem gefestigten Pfropfen umstrukturiert wird.

2.1.2. Sekundäre Hämostase

Die Fibrinbildung kann entweder über den extrinsischen oder den intrinsischen Weg ablaufen. Plasmakoagulationsfaktoren reagieren dabei in einer komplexen Kaskade, um Fibrin zu bilden, welches für die Festigkeit des Thrombozytenpfropfes verantwortlich ist (MULLER und RENNE, 2011). Die Hauptrolle bei der Einleitung des extrinsischen Weges übernimmt der Tissue Factor (TF, Thromboplastin, FIII) (CAMERER et al., 1996). Physiologisch kommt TF nur in geringer Konzentration im Blut vor und ist wesentlich auf Adventitiazellen von Gefäßen exprimiert (MACKMAN et al., 2007). Erst bei Verletzung des Gefäßendothels tritt der TF mit dem Blut in Kontakt (GAILANI und RENNE, 2007b). Sobald das geschehen ist, bildet er als Kofaktor von Plasmafaktor VII (ZHU, 2007), der neben dem TF einen spezifischen Bestandteil des extrinsischen Gerinnungssystems ausmacht, den TF/FVIIa-Komplex (RENNE et al., 2006). Der TF/FVIIa-Komplex gilt als primärer Aktivator der Kaskade der Plasmagerinnungsfaktoren in vivo (MACKMAN et al., 2007) und aktiviert die Plasmafaktoren FIX und FX, die seine Hauptsubstrate darstellen (RENNE et al., 2006). Der aktivierte FIX (FIXa) bildet mit FVIIIa einen Komplex, der in Anwesenheit von Phospholipiden und Kalzium die Umwandlung von FX zu FXa katalysiert (SCHENONE et al., 2004). Der aktivierte Plasmafaktor FX (FXa) verbindet sich mit durch ihn aktivierten Kofaktor FVa, Kalzium und einer negativ geladenen Phospholipidmembran zum Prothrombinasekomplex und kann darüber

Prothrombin zu Thrombin spalten (MONROE et al., 1996; SCHENONE et al., 2004). Thrombin induziert schließlich die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen (DAVIE und KULMAN, 2006). Daneben führt Thrombin zur starken Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Thrombozytenrezeptoren PAR1 (proteinase-activated receptors) und PAR4 (HIRANO, 2007). Alternativ kann die Koagulation auch durch den intrinsischen Weg eingeleitet werden (GAILANI und RENNE, 2007b). Er setzt sich aus den Plasmafaktoren FXI, FXII und FVIII zusammen (MACKMAN et al., 2007). Der klassische intrinsische Weg wird durch Kontaktaktivierung ausgelöst. Wenn Blut mit negativ geladenen Oberflächen (z.B. Kollagen) in Kontakt kommt, werden eine Reihe proteolytischer Reaktionen eingeleitet (GAILANI und RENNE, 2007a). Die negativ geladene Oberfläche führt zur Aktivierung von FXII zu FXIIa (GAILANI und RENNE, 2007b). FXIIa induziert neben der Aktivierung von FXI zu FXIa die Konvertierung von Prekallikrein zu Kallikrein. Kallikrein spaltet hochmolekulares Kininogen zu Bradykinin, ein stark vasoaktives Peptid (GAILANI und RENNE, 2007a). SUGO et al. (1982) zeigten, dass FXII beim Rind zuerst Prekallikrein zu Kallikrein konvertiert, was umgekehrt die Aktivierung von FXII bedingt. Plasmafaktor FXIa dient der Aktivierung von FIX. Aktivierter FIXa bindet auf der Thrombozytenoberfläche an FVIIIa und fördert in dieser Verbindung als Tenase-Komplex die Aktivierung von FX zu FXa und damit die Rate der Thrombinbildung (HOFFMAN, 2003). An der Stelle der Aktivierung von FX laufen der extrinsische und intrinsische Gerinnungsweg zusammen (ZHU, 2007). Nach der Bildung eines stabilen Fibrinpfpfropfes folgt die Retraktion. Dabei kontrahieren sich die Fibrinfäden. Die Wundränder nähern sich aneinander, was zu einem besseren Wundverschluss führt (SPORNITZ, 2004). Durch zentripetale Kontraktion des Aktomyosins der Thrombozyten wird die Retraktion des Gerinnungspfpfropfes unterstützt (MISCHKE, 2003; ENGELHARDT und BREVES, 2005). Bei starker Aktivierung der Plättchen (z.B. durch Kollagen plus Thrombin) oder durch hohen Scherstress kann es auch zu einer Mikropartikelbildung aus den Thrombozyten kommen. Dabei schnüren sich kleine Teile von Thrombozyten ab, die über vWF am Endothel anhaften und entweder schlauchförmige oder runde Partikel bilden, deren Oberfläche ebenfalls adhäsive Glykoproteine (GPIb α , Integrin α IIb β III) tragen und somit prokoagulatorische Fähigkeiten besitzen (REININGER et al., 2006).

2.1.3. Physiologische Inhibition der Blutgerinnung

Jeder Blutgerinnungsprozess darf nur im Bereich der Verletzungsstelle im Gefäß ablaufen, um Thrombenbildung zu vermeiden (HOFFMAN, 2003). Spontane oder durch vorhergehende Verletzung ausgelöste Thrombozytenaggregation muss jederzeit begrenzt bleiben, um pathologische Gefäßverschlüsse mit daraus resultierender Ischämie vorzubeugen (BROOS et al., 2011). Das wird dadurch gewährleistet, dass Gerinnungsfaktoren nur auf spezifischen Zelloberflächen arbeiten. Verschiedene Zellen spielen im Koagulationsprozess unterschiedliche Rollen. Die Thrombozyten unterstützen vor allem die prokoagulatorischen Reaktionen, wie z.B. durch Freisetzung von TXA₂, die Gefäßendothelzellen spielen dagegen eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der antikoagulatorischen Eigenschaften des Gefäßsystems (HOFFMAN, 2003). Sobald sich ein Fibrin-Plättchen-Gerinnsel im Bereich der Gefäßverletzung gebildet hat, muss der Gerinnungsprozess begrenzt werden, um Thromben im gesunden Gefäßbereich zu vermeiden. Das Protein C/Protein S/Thrombomodulin-System stellt sicher, dass die Produktion von Prokoagulantien auf die verletzte Stelle im Gefäß beschränkt bleibt. Wenn Thrombin mit einer Endothelzelle in Kontakt kommt, bindet es auf der Endotheloberfläche an oben genannten Komplex und aktiviert Protein C, welches daraufhin an seinen Kofaktor Protein S bindet und die Faktoren Va und VIIIa deaktiviert. Weitere Proteasehemmer mit antikoagulatorischen Eigenschaften sind Antithrombin und Gewebefaktorproteasehemmer (TFPI) (HOFFMAN, 2003). Starke Hemmsignale, die Thrombozyten vor unerwünschter Aktivierung schützen und gleichermaßen die Thrombenbildung auf die Fläche der Gefäßverletzung begrenzen, gehen von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI₂) aus. Sie zählen zu den starken negativen Regulatoren, die fähig sind in die Blutplättchenadhäsion, -aktivierung, -aggregation, -sekretion und deren Formveränderung einzugreifen.

2.2. Störungen der Hämostase

Bei den Hämostasestörungen werden Störungen der primären und der sekundären Hämostase unterschieden. Die primäre Hämostase ist thrombozytenabhängig, weshalb Störungen innerhalb dieser von den Thrombozyten selbst ausgehen. Auf der einen Seite kann die Anzahl der Blutplättchen durch unzureichende Bildung, erhöhten Umsatz oder vermehrte Zerstörung vermindert (Thrombozytopenie, z.B. bei BNP), auf der anderen Seite die Funktion gestört sein (Thrombozytopathie).

Sowohl bei der Thrombozytopenie als auch der Thrombozytopathie können erblich bedingte oder erworbene Ursachen dahinter stehen. Störungen der sekundären Hämostase beruhen auf Defekten innerhalb der Plasmafaktoren. Ursachen können angeborene (Hämophilie A und B) oder erworbene Mängel (Lebererkrankung, Vitamin K-Mangel, Neoplasien) sein, die einen negativen Einfluss auf die Gerinnungsfaktoren nehmen (SCHARF, 2003). Bei der disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC) sind sowohl die primäre als auch die sekundäre Hämostase betroffen. Durch eine Thrombose als primäre Erkrankung werden Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren verbraucht und eine unkontrollierte Fibrinolyse eingeleitet. Sekundär kann es dadurch zu massiven Blutungen kommen.

3. Thrombozytopathien

Thrombozytopathien sind durch reduzierte oder fehlende Plättchenfunktion charakterisiert. Da die Thrombozyten an verschiedenen Stellen der Hämostase mitwirken, äußern sich Thrombozytopathien, abhängig von der Lokalisation des Plättchendefektes, in Störungen der Adhäsion, Aggregation, Sekretion und/oder prokoagulatorischen Aktivität (SCHARF, 2003). Ursachen dafür können Rezeptoren-, Stoffwechsel- oder molekulare Defekte wichtiger Membranglykoproteine der Blutplättchen sein (SCHARF, 2003). Thrombozytopathien lassen sich in angeborene und erworbene Plättchendefekte einteilen. Der Literaturteil dieser Dissertation beschränkt sich auf die angeborenen Thrombozytenfunktionsstörungen. Abhängig vom Autor werden sie bezüglich der Lokalisation der Veränderungen (Rezeptorglykoproteindefekte, Speichergranuladefekte, Enzymdefekte und Riesenplättchenthrombozytopathien) (KIRCHMAIER und PILLITTERI, 2010; NURDEN et al., 2012) oder ihrer dadurch bedingten Funktionsstörungen (Störungen der Adhäsion, Aggregation, Plättchensekretion oder abnorme prokoagulatorische Aktivität) eingeteilt (SCHARF, 2003). Einige der im Folgenden aufgeführten Thrombozytopathien sind bisher nur beim Menschen beschrieben worden. Sie sollen einen Überblick möglicher Auswirkungen verschiedener Gendefekte auf die Thrombozyten und deren Funktion verschaffen. Die Einteilung erfolgt hier in Rezeptorglykoproteindefekte, Speicherdefekte und Defekte anderer Strukturen innerhalb der Thrombozyten.

3.1. Rezeptorglykoproteindefekte

3.1.1. Bernard-Soulier-Syndrom (BSS) beim Menschen

Dem BSS liegt ein autosomal-rezessiv vererbter Gendefekt zu Grunde, der zu einem Defekt der GPIb α , GPIb β , und GPIX führt (LANZA, 2006). Eine Ursache dafür findet sich in einer homozygoten Deletion von 11 Nukleotiden im GPIX-Gen (SANDROCK et al., 2010). Weitere Ursachen sind sinnverändernde und sinnentstellende Mutationen, die zu unfertigen Stopcodons führen (LANZA, 2006). Daraus resultiert letztendlich eine Störung des für die Blutgerinnung notwendigen Glykoprotein-Ib/IX/V-Komplexes. Betroffene Thrombozyten verlieren die Fähigkeit über den GPIb α -Rezeptor mit dem vWF und Thrombin eine Verbindung einzugehen (RAND et al., 2010) und bei Gefäßverletzungen an das freiwerdende Subendothel zu adhären (SCHARF, 2003). Klinisch äussert sich das BSS durch Epistaxis, Gaumen- und Hautblutungen und bei Frauen auch Menorrhagien. Vergrößerte Thrombozyten und Thrombozytopenie sind weitere Befunde des Krankheitsbildes (BERNDT und ANDREWS, 2011). SAVOIA et al. (2011) zeigten in einem Versuch, dass sich bei betroffenen Thrombozyten unter Einsatz von ADP und Kollagen als Aktivierungsreagentien in vitro eine Gerinnung auslösen lässt, diese unter Ristocetin jedoch unvollständig bis gar nicht ausfällt. Ristocetin ist ein Antibiotikum, das mit vWF Komplexe bildet. In dieser Formation erlangt vWF die Fähigkeit über GPIb α der Thrombozyten eine Verbindung einzugehen. Folge ist eine Aggregation und Aktivierung der Thrombozyten. Bei Mangel und Abwesenheit von GPIb α oder vWF unterbleibt eine Aggregationsreaktion der Thrombozyten (CALATZIS et al., 2006).

3.1.2. Glanzmann-Thrombasthenie (GT) bei Mensch, Hund und Pferd

Diese Art der autosomal-rezessiv vererbten Thrombozytopathie beruht auf einem quantitativen oder qualitativen Defekt des GPIIb/IIIa-Komplexes (Integrin α IIb β 3). Dadurch kommt es zu einer verminderten oder fehlenden Expression des Rezeptors auf der Plättchenmembran oder einer Funktionsstörung des Rezeptorkomplexes (SCHARF, 2003). Die Plättchen verlieren damit die Fähigkeit eine Verbindung mit Fibrinogen einzugehen und Aggregate zu bilden (NURDEN et al., 2012). Phänotypisch stellt sich das Krankheitsbild beim Menschen als Purpura, Epistaxis, Schleimhautbluten und bei Frauen auch Menorrhagien dar. (SCHARF, 2003). Eine Stimulation der Thrombozyten mittels Ristocetin löst eine

Plättchenaggregation aus. Bei Einsatz von ADP, Kollagen oder Thrombin ist diese jedoch stark herabgesetzt oder fehlt gänzlich (SCHARF, 2003). GT lässt sich in Abhängigkeit von dem Grad der Ausprägung des GPIIb/IIIa-Komplexes auf der Plättchenmembran und dem Gehalt an Fibrinogen in den α -Granula in die Typen I-III einteilen (SCHARF, 2003). BOUDREAUX et al. (1996) beschrieben das erste Mal eine mit der humanen GT Typ I vergleichbare Erkrankung bei einem Pyrenäen Berghund. Plättchenzahl und -morphologie waren normal, die Antwort auf Plättchenstimulation nach ADP-, Kollagen-, PAF- oder Thrombingabe und die Plättchenretraktion waren deutlich herabgesetzt. Der Anteil an GPIIb/IIIa-Komplexen auf der Plättchenmembran und der Fibrinogengehalt waren ebenfalls deutlich reduziert. Klinisch zeigte das Tier starkes Zahnfleischbluten und unkontrollierbare Epistaxis. Genetisch betrachtet existiert eine vierzehn Basen lange Insertion im Exon 13 und ein Spleißdefekt auf Intron 13 auf dem *aIIb*-Gen (LIPSCOMB et al., 2000).

Im Jahr 1989 wurde die GT beim Pferd erwähnt (SUTHERLAND et al., 1989). Die Autoren beschrieben einen 4-jährigen Standardbred Wallach der seit dreieinhalb Jahren an spontanem Nasenbluten und phasenweise auftretenden Petechien und Ekkchymosen auf Nasen- und Maulschleimhaut litt. Durchgeführte Untersuchungen ließen den Verdacht aufkommen, dass das Pferd von einer Art der Thrombozytopathie betroffen war, welche mit der GT Typ II des Menschen vergleichbar war. Einige Jahre später beschrieben LIVESEY et al. (2005) die GT bei einem 7-jährigen Thoroughbred-Cross Wallach und einer 4-jährigen Quarter-Horse Stute. Beide Tiere zeigten lang anhaltende beidseitige Epistaxis. Der Besitzer des Wallaches gab an, dass die Blutungen unabhängig vom Training auftraten. Durchgeführte Gerinnungstests (aktivierte Koagulationszeit, partielle Thromboplastinzeit, Prothrombinzeit, Thrombinzeit, Konzentration der Fibrinabbauprodukte und des vWF) waren unauffällig. Die Thrombozytenkonzentration lag im Referenzbereich. Die Blutungszeiten waren verlängert und die Plättchenretraktionen vermindert. Die Aggregation der Thrombozyten in vitro unter Einsatz von PAF, ADP und Col war bei allen Aktivatoren deutlich beeinträchtigt. Über eine Durchflusszytometrie wurde eine reduzierte Konzentration an Fibrinogenrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche nachgewiesen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten keine morphologischen Unterschiede der Thrombozyten

betroffener und gesunder Pferde. MACIEIRA et al. (2007) beschrieben ähnliches bei einem 18 Monate alten Oldenburger Stutfohlen. Klinisch zeigte das Tier eine verlängerte Schleimhautblutungszeit, deutlich verlängerte Verschlusszeiten des Blutes bei Aktivierung mit ADP und Kollagen und das Ausbleiben einer Plättchenretraktion nach 60 Minuten. Über eine Durchflusszytometrie konnte auch hier eine Reduktion von GPIIb auf den Thrombozyten festgestellt werden. Der genetische Defekt basiert nach MACIEIRA et al. (2011) beim Pferd auf einer homozygoten Punktmutation. Ein anderes Team beschrieb die Glanzmann Thrombasthenie bei einer 17 Jahre alten Peruvian Paso Stute. Diese litt seit mindestens drei Jahren an beidseitiger Epistaxis. Mittels einer Endoskopie konnten Petechien auf der Nasenschleimhaut beobachtet werden. Genetische Untersuchungen deckten eine Deletion im Exon und Intron 11 des Gens auf, das für GPIIb codiert (SANZ et al., 2011).

3.1.3. Plättchentyp des von-Willebrand-Syndroms (Pseudo-vWS) beim Menschen

Das Pseudo-vWS ist ein seltener, autosomal dominanter Plättchendefekt, der mit Blutungsneigung einhergeht. Betroffen ist das GPIIb α , das im GPIIb/IX/V-Komplex integriert ist und als Rezeptor für den vWF fungiert. Das Zusammenspiel dieser beiden Proteine ist für den Ablauf der primären Hämostase essentiell (OTHMAN et al., 2011). Pathogenetisch liegt dem Pseudo-vWS eine unphysiologisch erhöhte Interaktion der Thrombozyten mit dem vWF zugrunde (SCHARF, 2003). Aufgrund dessen kommt es auch ohne initialen Stimulus zur Aggregatbildung von Thrombozyten und vWF-Multimeren (MILLER et al., 1983). Sinkende vWF-Konzentrationen und eine leichte Thrombozytopenie sind die Folgen, die schließlich eine hämorrhagische Diathese bedingen (MILLER et al., 1983; MILLER, 1996). Punktmutationen an verschiedenen Positionen im GPIIb α -Gen sind für das Pseudo-vWS verantwortlich (MILLER et al., 1991; MURATA et al., 1993; RUSSELL und ROTH, 1993; MORIKI et al., 1997). Neben den beschriebenen Punktmutationen im GPIIb α -Gen wurde auch eine Mutation im GPIIb α -Rezeptor außerhalb der vWF-Bindungsstelle entdeckt (OTHMAN et al., 2005).

3.2. Speicherdefekte

3.2.1. Hereditäre Storage-Pool-Disease

Bei dieser Erkrankung sind Störungen der Plättchensekretion Auslöser der Blutungsneigung. In den Thrombozyten befinden sich Organellen, die unter physiologischen Umständen wichtige Inhaltsstoffe für die primäre Hämostase speichern, die sie nach Aktivierung der Thrombozyten nach außen abgeben. Abhängig davon, welche Organellen einen Defekt aufweisen, lässt sich die Storage-Pool-Disease in α -Granula-, δ -Granula-Defekt oder in einen kombinierten Defekt beider Granulatypen einteilen (SCHARF, 2003).

3.2.1.1. α -Granula-Defekte

3.2.1.1.1. Grey-platelet-Syndrom beim Menschen

Diese seltene, vornehmlich rezessiv vererbte Erkrankung (ALBERS et al., 2011), die mit milder Blutungsneigung einhergeht, wurde erstmals von RACCUGLI (1971) unter dem Namen „gray platelet disease“ beschrieben. Die Thrombozyten sind ziemlich groß, vakuolisiert und nahezu ohne zytoplasmatische Granula. Mitochondrien, Dense Bodies, Peroxisomen und Lysosomen sind in physiologischer Anzahl vorhanden, α -Granula fehlen oder sind reduziert (WHITE, 1979). Im Wright's-stain Blutausschlag erscheinen betroffene Thrombozyten grau, was dieser Krankheit ihren Namen verliehen hat (WHITE, 1979). Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigen, dass die Übertragung endogen synthetisierter sekretorischer Proteine aus den Megakaryozyten in die α -Granula der Thrombozyten bei betroffenen Patienten beeinträchtigt ist (ROSA et al., 1987). Dadurch sind die in den α -Granula gespeicherten Polypeptide und Proteine in der Konzentration erniedrigt oder fehlen vollständig (BRETON-GORIUS et al., 1981). Die Granulamembran selbst und die Synthese der α -Granula-Proteine durch die Megakaryozyten sind nicht betroffen (ROSA et al., 1987; SCHARF, 2003). Bei Einsatz von ADP als Aktivierungsreagenz wird bei den Thrombozyten eine normale Aggregation ausgelöst (FALIK-ZACCAI et al., 2001). Auf Kollagenreagenz unterbleibt eine Reaktion oder fällt gering aus, da GPVI als Kollagenrezeptor nur in geringer Anzahl vorliegt (NURDEN et al., 2004). Die Thrombozytenkonzentration ist geringgradig reduziert (KIRCHMAIER und PILLITTERI, 2010). Genetisch gesehen basiert diese Erkrankung auf einer Mutation des *NBEAL2* (*Neurobeachin-like 2*)-Gens auf Chromosom 3 (ALBERS

et al., 2011; KAHR et al., 2011). Das NBEAL2-Protein ist vermutlich an der Vesikelübertragung in Megakaryozyten beteiligt und entscheidend für die Ausbildung der α -Granula (MICHELSON, 2013).

3.2.1.1.2. Quebec-Thrombozytenstörung beim Menschen

TRACY et al. (1984) beschrieben erstmal den Zusammenhang zwischen dem erblich bedingten qualitativen Defekt von Faktor V und der damit einhergehenden Blutungsneigung. Die Quebec-Thrombozytenstörung wird autosomal-dominant vererbt und ist neben einer qualitativen und quantitativen Abweichung des FV durch einen verringerten Multimerengehalt gekennzeichnet. Im Gegensatz zur freien Form im Plasma kommt FVa im Thrombozyten nur an Multimerin gebunden vor (HAYWARD, 1997). Durch den erniedrigten Multimerengehalt steht dem Prothrombinasekomplexes (FVa, FXa, Ca^{2+} , Phospholipide) weniger FVa zur Verfügung, weshalb sich die Thrombinbildung enorm reduziert (NESHEIM et al., 1979), was eine verlängerte Blutungszeit bedingt. Die Aggregation bei Einsatz von ADP ist reduziert und bei Einsatz von Kollagen unterschiedlich stark ausgeprägt (HAYWARD et al., 1997). Klinische Anzeichen sind Schleimhautblutungen, moderate bis ernste Blutungen, die verzögert (12 bis 24 Stunden) nach Traumen oder chirurgischen Eingriffen einsetzen, lange Blutungsepisoden nach Verletzungen, spontane Hämarthrosen, Epistaxis und intrakranielle Blutungen (HAYWARD et al., 1996; HAYWARD et al., 1997). Therapeutisch erzielte nur der Einsatz von fibrinolytischen Inhibitoren eine Besserung der Blutungsneigung (HAYWARD et al., 1996; KAHR et al., 2001). HAYWARD et al. (1996) vermuteten hinter dem Krankheitsgeschehen eine abnorme Proteolyse der α -Granula-Proteine. Einige Jahre später wurde herausgefunden, dass Quebec-Thrombozyten große Mengen an fibrinolytischen, plasminogen-aktivierenden Proteasen enthalten. Die Ursache wird mit dem hohen Gehalt des Enzyms Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator (uPA) innerhalb eines sekretorischen Kompartiments begründet (KAHR et al., 2001), der zu einer beschleunigten Fibrinolyse innerhalb des gebildeten Blutkoagels führt. Auf genetischer Ebene basiert die erhöhte Expression von uPA in den Plättchen auf einer Verdoppelung eines 78-kb langen genomischen Segmentes auf Chromosom 10, das das *Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Gen (PLAU)* trägt (PATERSON et al., 2010). Eine vermehrte Transkription der Urokinase-Plasminogen-Aktivator-

mRNA während der Differenzierung der Megakaryozyten konnte festgestellt werden (DIAMANDIS et al., 2009).

3.2.1.2. δ -Granula-Defekte

Verglichen mit anderen erblichen Thrombozytenfunktionsstörungen, die trotz physiologischer Thrombozytenzahl mit Blutungsneigung einhergehen, treten diese Defekte recht häufig auf. Bei isoliertem δ -Granulaspeicherdefekt fallen die Blutungen recht mild aus, in Kombination mit anderen Defekten kann er zu bedrohlichen Blutungen führen (SCHARF, 2003). Die δ -Granula von Thrombozyten sind Speicherorte für Kalzium, Serotonin, ADP, ATP und Polyphosphate (PUJOL-MOIX et al., 2000; NURDEN und NURDEN, 2008). Die Inhaltsstoffe werden während der Plättchensekretion ausgeschleust und spielen bei der Übertragung der primären Plättchenantwort eine große Rolle (PUJOL-MOIX et al., 2000).

3.2.1.2.1. Isolierter δ -Granuladefekt beim Menschen

Die Vererbung des isolierten δ -Granuladefektes findet autosomal dominant statt. In einer Studie von PUJOL-MOIX et al. (2000) wurden die Thrombozyten von Patienten mit klinisch milder bis stärkerer hämorrhagischer Diathese untersucht. Die Blutungen äußerten sich in schnell erworbenen Hämatomen, Schleimhautblutungen, Menorrhagien und starken postoperativen Blutungen. Die Anzahl der Plättchen lag im physiologischen Bereich und die Morphologie war lichtmikroskopisch unauffällig. Ultrastrukturell zeigte sich, dass die Fläche und der maximale Durchmesser betroffener Thrombozyten im Vergleich zu normalen Plättchen deutlich vergrößert war, wohingegen die diskoide oder elliptische Form erhalten blieb. Die Anzahl der δ -Granula pro Plättchen und pro μm^2 war deutlich reduziert. Die Aggregometrie war bei mehr als zwei Dritteln der Patienten nach Einsatz von ADP, Epinephrin und/oder Kollagen als Agonisten beeinträchtigt.

3.2.1.2.2. Hermansky-Pudlak Syndrom (HPS) beim Menschen

Im Jahr 1959 stellten HERMANSKY und PUDLAK erstmals einen Zusammenhang zwischen Albinismus und verlängerter Blutungszeit her. HPS wird autosomal rezessiv vererbt und äußert sich in partiellem okulokutanen Albinismus, Plättchenspeicherkrankheit, die mit Blutungsneigung einhergeht und einem fehlgesteuerten Zeroidstoffwechsel, bei dem Zeroid in Lysosomen eingelagert wird (IANNELLO et al., 2003). Defekte in der Bildung und Funktion

von Lysosom-verwandten Organellen wie Melanosomen in Melanozyten oder δ -Granula in Thrombozyten wurden nachgewiesen. Die Thrombozytenkonzentration liegt im Referenzbereich, allerdings bleibt die Zweite-Phase-Aggregation, die normal durch Sekretion des Inhaltes von α - und δ -Granula ausgelöst wird, bei Aktivierung mit ADP, Epinephrin und Thrombin bei betroffenen Patienten aus. Bei Aktivierung mit Kollagen fehlte eine Aggregation vollständig (HARDISTY und MILLS, 1972). Spezialisierte sekretorische Zellen wie Melanozyten, Thrombozyten, Alveolen vom Typ II und zytotoxische T-Zellen sind bei HPS beeinträchtigt (WEI, 2006). Ursachen sind Defekte im intrazellulären Proteinaustausch, die zur Störung lysosomverwandter Organellen führen. Dementsprechend sind Organellen wie Melanosomen, δ -Granula, Lamellenkörperchen oder lytische Granula betroffen (WEI, 2006). Daraus resultieren die oben genannten klinischen Erscheinungen. Bisher sind Veränderungen in acht verschiedenen Genen identifiziert, die jeweils zu einem anderen Subtypen führen (WEI, 2006).

3.2.1.2.3. Chediak-Higashi Syndrom (CHS) bei Mensch, Rind und anderen Spezies

Das Krankheitsbild des CHSs wird autosomal rezessiv vererbt. Neben verlängerter Blutungszeit sind Hypopigmentierung, Photophobie, abnormale Leukozyten und deutlich erhöhte Anfälligkeit für eitrige bakterielle Infektionen klinische Anzeichen (PADGETT et al., 1964). Zunächst wurde das Chediak-Higashi Syndrom bei Aleuten Nerzen, Hereford Rindern, beigen Mäusen und Menschen beschrieben (PADGETT et al., 1964; LUTZNER et al., 1967; BLUME et al., 1969). Anschließend wurde dieses Krankheitsbild auch bei Killerwalen, Perserkatzen und Füchsen nachgewiesen (TAYLOR und FARRELL, 1973; KRAMER et al., 1977; FAGERLAND et al., 1987). Unter der Spezies Rind tauchte das CHS außer bei Herefords auch bei Brangus und Japanese Black auf (AYERS et al., 1988; OGAWA et al., 1997). Eine Untersuchung zu dem ATP- und ADP-Gehalt in den Thrombozyten von Menschen und Rindern mit CHS weist darauf hin, dass die Ursache der verlängerten Blutungszeit auf einen Defekt der Speicherung von ATP/ADP in den δ -Granula zurückgeführt werden kann (BELL et al., 1976). Ultrastrukturelle Untersuchungen der Thrombozyten von Rindern mit CHS zeigten, dass das Fehlen der δ -Granula eine der Haupteigenschaften dieses Syndromes ist (MEYERS et al., 1982). MENARD und

MEYERS (1988) belegten mit ihrer Studie, dass die δ -Granula Storage Pool Disease in CHS-Rindern mit dem Fehlen von δ -Granula-Vorstufen in reifenden und entwickelten CHS-Megakaryozyten zu finden ist. Später konnte gezeigt werden, dass in den CHS-Thrombozyten von Japanese Black Rindern die durch Kollagen ausgelöste Signalkaskade über den Arachidonsäuremetabolismus supprimiert ist (SUZUKI et al., 1996). Für die reduzierte Kollagenantwort soll der Rhodocytin-sensitive Weg über den Kollagenrezeptor GPIa/IIa verantwortlich sein (SHIRAISHI et al., 2002), der über Aktivierung der GPIa/IIa-assozierten Tyrosinkinasen weitere Signale für eine Aggregation auslöst (SUZUKI-INOUE et al., 2001). Genetische Untersuchungen von KUNIEDA et al. (2000) deuten darauf hin, dass eine Mutation im *CHS1*-Gen auf Chromosom 28 möglicherweise für das CHS in Japanese Black Rindern verantwortlich ist. Eine „missense“-Mutation im *CHS1*-Gen führt hierbei zu einem nicht-synonymen Aminosäureaustausch (Histidin > Arginin) (YAMAKUCHI et al., 2000).

3.3. Defekte anderer Strukturen innerhalb der Thrombozyten

3.3.1. Scott Syndrom (SS) bei Mensch und Hund

Das Scott Syndrom beruht auf einem genetischen Defekt, der die Wanderung von Phosphatidylserin (PS) von der inneren zur äußeren Membran beeinflusst (TOTI et al., 1996). Im inaktiven Zustand der Thrombozyten sorgen die Aminophospholipid-Translokase und die Phospholipid-Scramblase dafür, dass Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM) vornehmlich im äußeren und PS und Phosphatidylethanolamin (PE) im inneren Blatt lokalisiert sind (ZWAAL et al., 1993; BEVERS et al., 1999). Werden die Thrombozyten mit Thrombin oder Kollagen aktiviert, wird PS an der Oberfläche exponiert (BEVERS et al., 1982). Durch die sich wechselnde Anordnung der Aminophospholipide (PS und PC) innerhalb der Lipiddoppelschicht erlangen die Thrombozyten eine negativ geladene und somit gerinnungsfördernde Oberfläche. Im Beisein von Gerinnungsfaktoren (FIXa bzw. FVa), die sich im Normalfall an bestimmte Stellen der negativ geladenen Membran heften und somit an der Tenase- und Prothrombinasereaktion beteiligt sind, wird die Thrombinbildung erheblich gesteigert (HEEMSKERK et al., 2002). Eine Störung der Translokation von Phosphatidylserin an die Plättchenoberfläche, die zu einer reduzierten Prothrombinase- und Tenaseaktivität führt, bedingt Gerinnungstörungen mit

einhergehender Blutungsneigung (ROSING et al., 1985; HEEMSKERK et al., 2002). Eine reduzierte Prothrombinaseaktivität wurde neben Blutplättchen auch in Erythrozyten und Epstein-Barr-Virus-transformierten B-Zellen beschrieben (TOTI et al., 1996). SUZUKI et al. (2010) entdeckten das Transmembran Protein 16 (TMEM16F), das kalziumabhängig für die Beförderung von PS in die äußere Membran zuständig sein soll. Eine Punktmutation im *TMEM16F*-Gen wird als Ursache des Scott-Syndroms genannt (LHERMUSIER et al., 2011). Bisher bleibt es ungeklärt, ob TMEM16F das für den Austausch verantwortliche Protein ist oder nur eine regulierende Funktion einnimmt (LHERMUSIER et al., 2011).

Im Jahr 2002 konnte beim Deutschen Schäferhund ein dem SS vergleichbares Krankheitsgeschehen nachgewiesen werden (BROOKS et al., 2002). Klinisch fielen betroffene Tiere durch Nasenbluten, Hyphäma, intramuskulären Hämatomen und verstärkten Blutungen nach Operationen auf. Thrombozytenzahl, Plättchenmorphologie, Blutungszeit, Plättchenretraktion, -aggregation und -sekretion nach Aktivierung mit Thrombin, Kollagen und ADP zeigten keine Abweichungen. Demgegenüber waren die Prothrombinaseaktivität, die Phosphatidylserinexponierung auf der Thrombozytenoberfläche und die Mikropartikelbildung nach Stimulation mit Thrombin und Kollagen reduziert. Auch in dieser Studie wurde auf einen autosomal rezessiven Vererbungsgang geschlossen. Weitere molekulargenetische Untersuchungen bestätigten den autosomal rezessiven Erbgang des SS und konnten beim Hund einen Einzelgendefekt auf dem Chromosom 27 identifizieren. Er führt zu dem so genannten Caninen Scott Syndrom (CSS) und ist mit dem Defekt beim Menschen vergleichbar (BROOKS et al., 2010).

3.3.2. Hereditäre Thrombozytopathie Simmentaler Rinder

LEIPOLD und MOORE (1977), zitiert in WEISSER et al. (2010), beschrieben zum ersten Mal eine Blutungsneigung bei Simmentaler Rindern, die auf eine gestörte Thrombozytenfunktion zurückzuführen ist. Aus Nordamerika folgten weitere Veröffentlichungen zu dieser Form der hämorrhagischen Diathese, die auffallend häufig bei Simmentaler Rindern auftritt (SEARCY und PETRIE, 1990; STEFICEK et al., 1993a). Klinische Anzeichen dieser Hämostasestörung sind vor allem rezidivierend auftretende, spontane Hautblutungen, die teilweise mehrere Stunden andauern, aber auch Epistaxis, subkonjunktivale Blutungen, blutiger Kot und Hämaturie (SEARCY und PETRIE, 1990; SEARCY et al., 1990).

NAVARRE et al. (1995) beobachteten, dass die Hautblutungen mitunter durch Stiche der Pferdebremsen ausgelöst werden. Auch WEISSER et al. (2010) beschrieben durch stechende Insekten ausgelöste Hautblutungen. Abgesehen von oben genannten Symptomen sind die Vitalfunktionen betroffener Tiere ungestört (SEARCY und PETRIE, 1990). Mit dem Verdacht, dass es sich bei diesem Krankheitsbild um einen genetischen Defekt handelt, wurde im Jahr 2000 mit Hilfe der Embryotransfertechnologie eine Studie zur Erfassung des Vererbungsmusters der Thrombozytenfunktionsstörung bei Simmentaler Rindern durchgeführt (MAPLETOFT et al., 2000). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen schließen sowohl eine Vererbung über die Geschlechtschromosomen, als auch einen dominanten Erbgang aus. Vielmehr spricht das Ergebnis dieser Studie dafür, dass das Merkmal über zwei miteinander agierenden Gene vererbt wird und nur dann klinische Auswirkung hat, wenn beide Gene homozygot rezessiv vorliegen. Im Rahmen ihrer Veröffentlichung im Jahr 2010 zeigen WEISSER et al., dass die eigentliche Ursache der Hereditären Thrombozytopathie Simmentaler Rinder auf einer qualitativen Thrombozytopathie begründet liegt. Neben der Thrombozytenzahl liegen auch Prothrombinzeit, aktivierte partielle Thromboplastinzeit und die Konzentrationen der Fibrinabbauprodukte und des Fibrinogens betroffener Tiere im Referenzbereich (STEFICEK et al., 1993a; WEISSER et al., 2010). Somit können eine Thrombozytopenie und Störungen im plasmatischen Gerinnungssystem ausgeschlossen werden. Auffällig ist die abnorme Plättchenaggregation betroffener Tiere in vitro (SEARCY und PETRIE, 1990). Mit Hilfe speziell ausgewählter Agonisten, die auf spezifische Rezeptoren auf der Thrombozytenmembran wirken, wird die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten überprüft (SEARCY et al., 1994). Die Thrombozyten betroffener Tiere durchlaufen nach Stimulation zwar eine normale Formveränderung, aber keiner der ausgewählten Agonisten (ADP, Calcium Ionophor A23187 und Kollagen) führt zu einer Aggregation der Blutplättchen (STEFICEK et al., 1993a; STEFICEK et al., 1993b). In der Arbeit von WEISSER et al. (2010) wurde die Thrombozytenfunktion der Patientin „mit dem PFA-100TM nach der von KUNDU et al. (1995) beschriebenen Methode“ ermittelt. ADP und Kollagen dienten als Aktivierungsreagenzien. Die nicht messbaren Verschlusszeiten bekräftigten den Verdacht einer Funktionsstörung der Thrombozyten. Da der PFA-100TM nach Aussage der Autoren nur „eine erste Verdachtsdiagnose auf HTS“ zulässt, führten sie eine weitere Untersuchung mittels einer photometrischen Aggregations- und

Sekretionsprüfung nach der Methode von Born (1962) durch ADP und Kollagen dienten als Thrombozytenaktivatoren. Bei der Patientin blieben sowohl eine Aggregations- als auch eine Sekretionsreaktion aus. Letztgenannte Methode lässt zwar eine sichere Diagnosestellung zu, stellt aber hohe Anforderung an Probenbearbeitung und Ergebnisinterpretation (SEARCY et al., 1990; WEISSER et al., 2010). Untersuchungen unter dem Licht- und Transmissions-Elektronen-Mikroskop zeigten keine ultrastrukturellen Unterschiede in der Morphologie zwischen ruhenden Thrombozyten gesunder und betroffener Rinder (STEFICEK et al., 1993b; SEARCY et al., 1994; WEISSER et al., 2010). Eine Abweichung in der Anzahl der GPIIb/IIIa-Komplexe oder derer Bindekapazität zu Fibrinogenmolekülen konnte beim Vergleich betroffener und gesunder Tiere nicht ermittelt werden (SEARCY et al., 1994). Die Sekretion von ATP aus den δ -Granula schien, zumindest bei Einsatz von PAF als Plättchenaktivator, nicht beeinträchtigt zu sein (STEFICEK et al., 1993b). Eine darauffolgende Studie schloss den Zusammenhang der Thrombozytopathie mit einer gestörten Funktion der δ -Granula ebenfalls aus (SEARCY et al., 1994). Die Untersuchungen von WEISSER et al. (2010) an einem von Blutungsneigung betroffenen Fleckviehkalb deckten eine ATP-Sekretionsstörung aus intrathrombozytären Granula auf. In Hinblick auf den Zeitpunkt der „Bildung erster Blutgerinnsel“, „die Geschwindigkeit der Fibrinbildung und Fibrinvernetzung“ und der „Stabilität des gebildeten Gerinnsels“ waren hingegen keine Abweichungen zu gesunden Tieren festzustellen. Die ungestörte Fibrinvernetzung widerspricht den Untersuchungsergebnissen von FROJMOVIC et al. (1996), die das DARE-Syndrom (Delay-in-Activated-GPIIb/IIIa-Receptor-Expression-Syndrome) als Ursache der Aggregationsstörung beschrieben. SEARCY et al. zeigten 1994, dass die Thrombozyten betroffener Tiere nach Aktivierung durch ADP und Ionophore A23187 eine deutlich geringere Menge an Proteinen ins Zytoskelett aufnahmen als solche gesunder Tiere. Etwa die Hälfte der Blutplättchen betroffener Tiere zeigten nach Aktivierung eine abweichende Anordnung der Zytoskelettkomponenten (SEARCY et al., 1994). CalDAG-GEFI (RasGRP2) spielt eine wichtige Rolle bei der „inside-out“-Aktivierung von GPIIb/IIIa und der Granulasekretion. Genveränderte Mäuse, die das *CalDAG-GEFI*-Gen nicht trugen, zeigten starke Defizite in der Aggregation nach Aktivierung der Thrombozyten mit Kalzium Ionophor (A23187), Kollagen, ADP und TXA₂ (CRITTENDEN et al., 2004). RasGRP2 fungiert als wichtiges

Signaltransduktionsprotein und aktiviert Rap1b, das wiederum die Affinität von GPIIb/IIIa moduliert und somit zu einer Thrombozyten-Fibrinogen-Interaktion führt (BERTONI et al., 2002). Eine Beeinträchtigung der Zytoskelettanordnung in der frühen Aktivierungsphase wurde nicht beobachtet (CRITTENDEN et al., 2004), was den Ergebnissen von SEARCY et al. (1994) widerspricht. Im Rahmen einer genetischen Untersuchung eines Bluterkalbes wurde die Region, die CalDAG-GEFI codiert, genauer betrachtet. Sie zeigte bei diesem Tier an zwei Stellen einen Einzelnukleotidaustausch, der jeweils zu einem nicht-synonymen Aminosäureaustausch führt. Ein Austausch findet innerhalb des Exon 6 statt und bedingt durch eine C>T-Mutation eine Substitution von Prolin durch Leucin. Eine weitere homozygote Mutation liegt im Exon 7, wobei an dieser Stelle ein T>C-Austausch vorliegt, der die Substitution von Leucin durch Prolin verursacht. Letztgenannte Mutation wird als hoch signifikanter Unterschied zwischen betroffenen Rindern im Vergleich zu Rindern ohne angeborene Blutungsneigung gesehen (BOUDREAUX et al., 2007).

4. Multiplate®-System

Das Multiplate®-System gibt es seit dem Jahr 2005. Es dient der Thrombozytenfunktionsdiagnostik im Vollblut und funktioniert über elektrische Widerstandsmessung (CARDINAL und FLOWER, 1980). Einfache Handhabung und kurze Messzeiten sind zwei wesentliche Vorteile, die das Gerät mit sich bringt. Der Name Multiplate steht für die Abkürzung „multiple platelet function analyzer“. Er beschreibt damit den Aufbau des Systems, das sich durch multiple Kanäle am Gerät, multiple Elektroden in den einzelnen Multiplate®-Messzellen, sowie multiple Tests zur Prüfung der Thrombozytenfunktion am Multiplate®-Gerät auszeichnet (MARSCHNER et al., 2012).

4.1. Geräteaufbau

Die folgende Beschreibung des Geräteaufbaus basiert auf dem Benutzerhandbuch I „Allgemeine Informationen und Installationsanleitung zum Multiplate®-System“ (DYNABYTE, 2010-11) und den Informationen aus dem Kompendium von CALATZIS et al. (2006).

Das Multiplate®-System ist ein kompaktes Instrument, das aus einer Messeinheit mit fünf Kanälen für parallele Messungen und einem integrierten Computersystem mit eigener Systemsoftware besteht. Benutzereingaben erfolgen

über Maus und Tastatur. Bei Benutzung der softwaregesteuerten Pipette wird der Anwender über Hinweise auf dem Bildschirm Schritt für Schritt durch die Analyse geführt. Ein im Gerät integrierter Wärmeblock wird bei Betrieb auf $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (standardgemäß für den Gebrauch in der Humanmedizin) aufgeheizt und sorgt für die nötige Inkubationstemperatur der Blutproben. Die Betriebstemperatur kann in der Voreinstellung durch den Benutzer manuell festgesetzt werden. Es gibt vier Vorwärmpositionen, in denen Flüssigkeiten (z.B. die NaCl-Lösung) in geeigneten Behältern erwärmt werden. Für die Reagenzien ist ein abnehmbarer Halter vorgesehen, der zusammen mit diesen im Kühlschrank gelagert werden kann.

4.1.1. Messkanäle

Insgesamt ist das Gerät mit fünf Kanälen ausgestattet, die entweder einzeln oder parallel aktiviert werden können. Jeder Kanal besteht aus einer Messzelle und dem Sensorkabel, welches das Messsignal von der Messzelle auf das Analysegerät überträgt. Bei inaktiven Kanälen befinden sich die zugehörigen Sensorkabel auf der Parkposition. Erst mit dem Umstecken des Sensorkabels in die Buchse der Messzelle, kann die Analyse beginnen.

4.1.2. Messzellen

Für das Multiplate®-System werden spezielle Einweg-Messzellen eingesetzt, die in den vorgesehenen Aussparungen im Wärmeblock ihren Platz finden. Sie bestehen aus dem Pipettierkonus für NaCl, Blut und Reagenz, der eigentlichen Messzelle mit vier kupfernen Sensordrähten und PTFE- (Polytetrafluorethylen) beschichtetem Rührstab und einem Buchsenanschluss für das Sensorkabel. Die Sensordrähte sind mit Silber beschichtet, um eine sensible und sichere Messung zu gewährleisten. Zudem bilden je zwei der vier Drähte eine Sensoreinheit, sodass zwei unabhängige Messungen pro Messzelle parallel durchgeführt werden, die die Messgenauigkeit des Gerätes erhöhen und eine Reproduzierbarkeit gewährleisten.

4.2. Messprinzip

Die Thrombozytenfunktionsdiagnostik basiert auf der Impedanzaggregometrie, die erstmals von CARDINAL und FLOWER (1980) beschrieben wurde. Aktivierte Thrombozyten lagern sich an die Sensordrähte und verursachen somit eine elektrische Widerstandsänderung zwischen zwei Drähten. Die Aktivierung

der Thrombozyten geschieht über entsprechende Testreagenzien, die auf die Rezeptoren an der Thrombozytenoberfläche einwirken und darüber eine Anheftung der Thrombozyten an die Sensordrähte ermöglichen (Abbildung 3). Der elektrische Widerstand zwischen beiden Sensordrähten steigt an und wird kontinuierlich gegen die Zeit in einer Kurve aufgetragen.

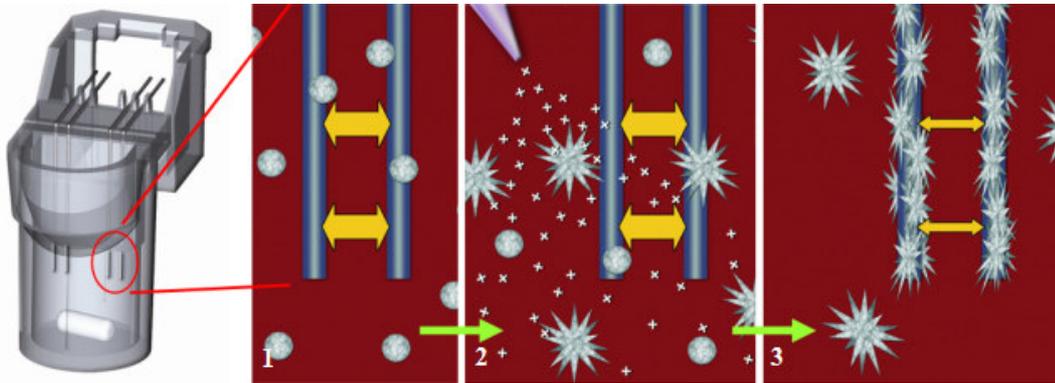


Abbildung 3: Prinzip der Impedanzmessung beim Multiplate®-Impedanzaggregometer in drei Schritten. 1. Die nicht aktivierten Thrombozyten bewegen sich frei zwischen den Sensordrähten. 2. Bei Zugabe von Aktivierungsreagenz werden die Thrombozyten stimuliert und bilden Pseudopodien aus. 3. Die aktivierten Thrombozyten lagern sich an die Sensordrähte, was eine Widerstandserhöhung verursacht (www.multiplate.net).

4.2.1. Parameter

Die Anlagerung der aggregierenden Thrombozyten an die Sensordrähte verursacht eine Widerstandserhöhung zwischen den Sensordrähten. Der dadurch ansteigende Impedanzwert wird durch die frei gewählte Einheit Aggregation Units (AU) ausgedrückt und gegen die Zeit aufgetragen (AU*Min) (Abbildung 4). Bei der Impedanzaggregometrie werden insgesamt drei Parameter aufgezeichnet. Die Area Under the Aggregation Curve (AUC) ist der wichtigste Parameter. Sie wird durch den maximalen Aggregationswert und die Steigung der Kurve beeinflusst und drückt die Gesamtaktivität der Blutplättchen aus (MARSCHNER et al., 2012). Der maximale Aggregationswert (Aggregation) und die Steigung (Velocity) finden nur in der Forschung (RUO: research use only) weitere Beachtung (CALATZIS et al., 2006). Die AUC wird in der Einheit AU*Min oder U (10 AU*Min = 1 U) angegeben (CALATZIS et al., 2006). Am Ende jeder Messung wird der Korrelationskoeffizient (cc) und die Differenz zwischen den AUC-Werten beider Einzelmessungen pro Messzelle automatisch vom System ermittelt. Liegt der cc unterhalb der festgelegten Grenze von 0,98 oder ist die

Differenz beider AUC-Werte größer als 20 % wird eine Wiederholungsmessung empfohlen.

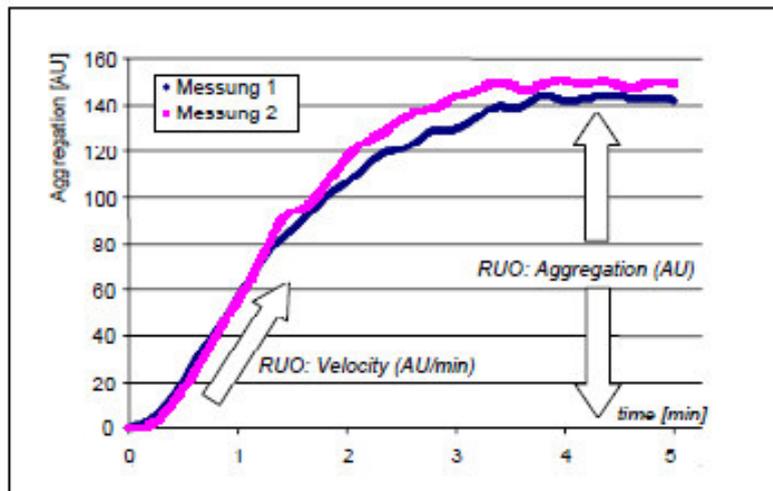


Abbildung 4: Im Multiplate®-Impedanzaggregometer werden pro Messzelle zwei Messungen (hier: Rosa und blau) parallel durchgeführt. Das Ergebnis wird in Form von Aggregationkurven graphisch dargestellt. Die Messwerte der Parameter Aggregation und Velocity werden nur in der Forschung (RUO) weiter berücksichtigt (www.multiplate.net).

4.3. Multiplate®-Reagenzien

Für das Multiplate®-System stehen insgesamt fünf verschiedene Testreagenzien zur Verfügung, die die Thrombozyten auf unterschiedlichen Wegen aktivieren (Abbildung 5). Nur die aktivierten Thrombozyten können sich an die Sensordrähte heften und somit eine Widerstandserhöhung erzeugen.

ADPtest: Adenosindiphosphat (ADP) aktiviert die Thrombozyten über die P2X1-P2Y1- und die P2Y12-ADP-Rezeptoren, die sich auf der Thrombozytenoberfläche befinden (GACHET, 2001a; MURUGAPPA und KUNAPULI, 2006). Die Bindung von ADP an P2Y12-Rezeptoren führt zu einer Reduktion von zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) im Thrombozyten, was wiederum die Freisetzung von Ca^{2+} aus endogenen Quellen bewirkt. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt letztlich zur Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten (CALATZIS et al., 2006).

COLtest: Kollagen stimuliert die Thrombozyten über den Kollagen-Rezeptor. Das bedingt eine Freisetzung von Arachidonsäure (AA) aus Phospholipiden der Zellmembran. AA wird durch das Enzym Zyklooxygenase (COX) zu Thromboxan A₂ (TXA₂) umgewandelt. TXA₂ wirkt über entsprechende

Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche aggregationsfördernd. Über diesen Test wird die physiologische Stimulierbarkeit der Thrombozyten ausgedrückt.

ADPtestHS (high sensitivity): In diesem Reagenz ist neben ADP auch Prostaglandin E1 (PGE1) enthalten. Zusammen haben sie eine erhöhte Sensitivität gegenüber den Effekten von ADP-Rezeptor-Antagonisten auf die Blutplättchen (MARSCHNER et al., 2012). PGE1 reduziert die Freisetzung von Ca^{2+} aus den endogenen Speicherorten der Thrombozyten und wirkt somit hemmend auf die Aggregation. Die synergistische Wirkung zu ADP-Rezeptor-Antagonisten wird sich hier zu Nutze gemacht (CALATZIS et al., 2006).

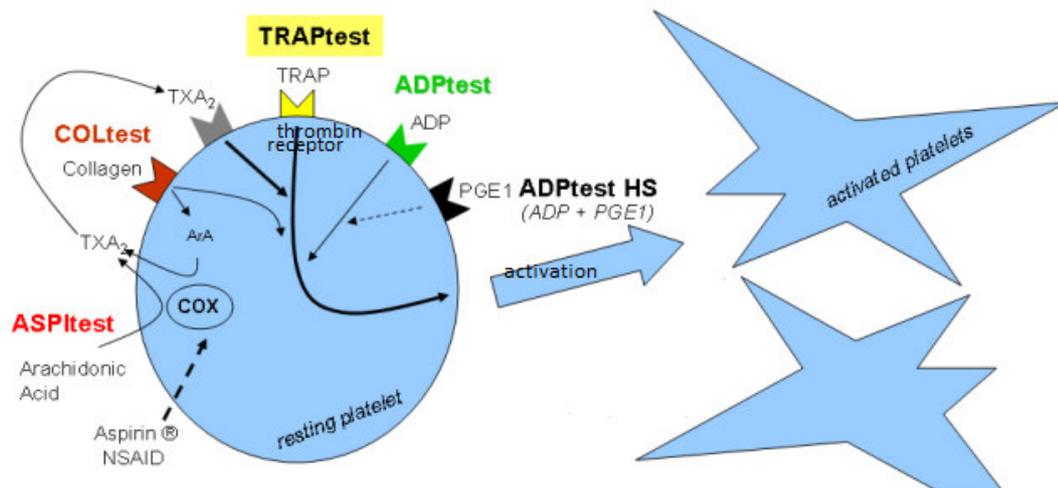


Abbildung 5: Übersicht über die verfügbaren Multiplate-Tests und deren dazugehörige Aktivierungswege. Die Dicke der durchgezogenen Pfeile verdeutlicht die Potenz der Aktivierungsfähigkeit der einzelnen Wege. Gestrichelte Pfeile weisen auf eine hemmende Wirkung hin (www.multiplate.net).

ASPI (Arachidonsäure) test: Die Aktivierung erfolgt hier mittels Thromboxan A₂, welches durch das Enzym COX aus der Arachidonsäure gebildet wurde. Die Arachidonsäure selbst führt nicht zu einer Thrombozytenaktivierung. Der ASPItest dient dazu, die Funktionstüchtigkeit der COX zu prüfen und gegebenenfalls COX-Hemmer zu ermitteln (CALATZIS et al., 2006; MARSCHNER et al., 2012).

TRAP (Thrombin Receptor Activating Peptide) test: TRAP-6 imitiert die Bindung von Thrombin am Thrombin-Rezeptor und löst dadurch eine starke Aktivierung aus ohne auf die Verstärkung der COX angewiesen zu sein. Das Ergebnis beschreibt die prinzipielle Stimulierbarkeit der Thrombozyten.

In dieser Arbeit werden die ersten beiden Reagenzien angewendet. Vorhergehende Tests haben gezeigt, dass ADP und Kollagen gute Thrombozytenaktivatoren sind und sich, zumindest bei Schafen (BAUMGARTEN et al., 2009), für eine Thrombozytenfunktionsanalyse am besten eignen. HUBER (2012) verwendete für die Referenzwertbestimmungen am Multiplate® die Reagenzien ADP und Col.

4.4. Blutentnahmesystem

Der Hersteller des Multiplate®-Systems empfiehlt zur Thrombozytenfunktionsanalyse Thrombininhibitor - (TI)-Abnahmesysteme. Direkte Thrombin-Hemmer wie z.B. Lepirudin (rekombinantes Hirudin) beeinflussen, im Gegensatz zu Zitrat, weder die Thrombozytenfunktion, noch die Kalziumkonzentration im Blut (GLUSA und MARKWARDT, 1990). Der Einsatz von Zitrat bedingt eine höhere spontane Thrombozytenaggregation als Hirudin (TOTH et al., 2006). Schließlich lösen sowohl ADP als auch Kollagen bei Verwendung von Zitrat, verglichen mit Hirudin, eine signifikant schwächere Aggregation der Thrombozyten aus (WALLEN et al., 1997).

4.5. Blutproben

Die Blutproben werden bis zur Auswertung bei Raumtemperatur gelagert. Niedrige Temperaturen der Blutproben können das Messergebnis beeinflussen. Die Auswertung erfolgt zwischen 30 und 180 Minuten. Innerhalb dieses Zeitintervalls zeichneten sich nur minimale Messwertschwankungen ab (KAISER et al., 2011; MARSCHNER et al., 2012).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchung von Tieren mit Verdacht auf eine Thrombozytopathie

1.1. Tiere

1.1.1. Im Rahmen der Studie durchgeführte Erstuntersuchung

Probanden mit Verdacht auf Thrombozytopathie wurden zum einen durch die Untersuchung ihrer Blutproben ermittelt, die über das BNP-Projekt zwischen 2011 und 2012 an die Klinik für Wiederkäuer gesandt wurden. Thrombozyten- und Leukozytenwerte unterhalb des Referenzbereiches sprachen für das Vorliegen einer BNP (FRIEDRICH et al., 2011). Kälber, die aufgrund ihrer Thrombozyten- und Leukozytenwerte nicht den BNP-Tieren zugeordnet werden konnten (Thrombozyten und Leukozyten im oder über dem derzeit anerkannten Referenzbereich), wurden den „differentialdiagnostischen Fällen“ zugeordnet. Basierend auf nordamerikanischen und kanadischen Veröffentlichungen zur Thrombozytopathie Simmentaler Rinder, wurden für unsere Untersuchungen ausschließlich Rinder der Rasse Deutsches Fleckvieh ausgewählt, erneut beprobt und deren Thrombozytenfunktion überprüft. Zum anderen wurden im Zeitraum der Studie weitere Patienten mit Blutungsneigung durch Hoftierärzte gemeldet und in die Klinik überwiesen oder Blutproben von diesen Tieren eingesandt. Diese Fälle wurden nach zuvor beschriebenen Kriterien entsprechend ausgewählt und in die Auswertung einbezogen

1.1.2. Klinikeigene Tiere mit Thrombozytopathie

Zwei männliche Fleckvieh-Kälber, bei denen mittels der Multiplate®- und genetischen Untersuchung das Krankheitsbild der HTS bestätigt werden konnte, wurden der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der LMU München überlassen bzw. von dieser aufgekauft.

Das erste Tier, geboren am 09.07.2012, wurde am 24.07.2012 an der Klinik unter der Kliniknummer 2012/1017 eingestallt. Von da an erfolgte im Rahmen der morgendlichen Allgemeinuntersuchung eine tägliche Untersuchung durch Studierende oder Tierärztinnen/Tierärzte und eine Kontrolle auf etwaige erneute

Blutungen. Zudem wurden regelmäßige Multiplate-Untersuchungen durchgeführt, um den Status der Thrombozytenfunktion zu verfolgen. Erneut auftretende, frische Blutungen jeglicher Art wurden genauer untersucht, beschrieben und dokumentiert. Am 12.11.2012 erlag das Tier einer hochgradigen Blutungsepisode mit Hämatombildung innerhalb der Bauchhöhle.

Das zweite Tier wurde am 07.03.2013 geboren und am 14.03.2013 unter der Kliniknummer 2013/0344 eingestallt. Auch hier erfolgte eine tägliche Allgemeinuntersuchung und regelmäßige Thrombozytenfunktionsmessungen. Das Tier steht aktuell noch an der Klinik.

Beide Tiere trugen dazu bei, den klinischen Verlauf der Hereditären Thrombozytopathie besser verfolgen zu können.

1.1.3. Zweituntersuchung nach Fragebogendurchführung

Ab Januar 2013 wurden Landwirte, die im Besitz sicher identifizierter Thrombozytopathie-Tiere waren, zum Krankheitsverlauf und dem aktuellen Status betroffener Tiere befragt (Fragebogen im Anhang). Von besonderem Interesse waren Symptome hinsichtlich der Blutungsneigung, die körperliche Verfassung und bei weiblichen Tieren ebenso die Frage nach Trächtigkeits- und Kalbeverlauf und Gesundheitszustand des Kalbes. Befanden sich die Tiere noch im Besitz der Landwirte, wurde bei den Tieren mit Einverständnis der Besitzer erneut Blutproben gewonnen und ein Thrombozytenfunktionstest durchgeführt. Tiere, deren Standort trotz Verkauf ermittelt werden konnte, wurden ebenfalls ein zweites Mal beprobt. Insgesamt konnten sieben Tiere wiederholt auf die Thrombozytenfunktionsstörung untersucht werden.

1.1.4. Kontrolltiere

Bei der Durchführung des Thrombozytenfunktionstests wurde neben dem Blut des Falltieres auch immer das Blut eines Kontrolltieres mitbewertet, um die Funktionstüchtigkeit der Reagenzien zu überprüfen. Gleichzeitig wurde ein Blutbild angefertigt, um eine Thrombozytopenie beim Kontrolltier auszuschließen. Zeichneten sich bei der Thrombozytenfunktionsmessung deutliche Kurven in den Graphen ab, war von intakten Aktivierungsreagenzien auszugehen. Mittels dieser Kontrollmessungen konnte eine Nulllinie beim Falltier auch als solche gewertet werden. Die Kontrolltiere stammten entweder aus dem Betrieb, in dem die Falltiere standen, oder waren Klinikpatienten, die aufgrund

anderer Untersuchungen beprobt werden mussten.

1.2. Verwendete Materialien

1.2.1. Blutproben

Zur Blutentnahme wurden bei Kälbern 18 Gauge Kanülen (1,2x40 mm; BD Microlance™³; Becton, Dickinson & Co Ltd., Drogheda, Ireland), bei Jungrindern 17 Gauge Kanülen (1,5 x 50 mm; Neobject®; Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland) und bei ausgewachsenen Rindern 14 Gauge Kanülen (2,1 x 60 mm; Bovivet; Kruuse, DK-5550 Langeskov, Denmark) verwendet. Bei jeder Beprobung wurde für die Blutchemie ein Serumröhrchen (Röhre 9 ml, 92 x 16 mm; Präparierungsträger/Gerinnungsaktivator; Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland), für die hämatologische ein kleines EDTA-Röhrchen (Röhre 2 ml; 55 x 12 mm; Kalium-ETDA; Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland), für die DNA-Untersuchung ein großes EDTA-Röhrchen (Röhre 5 ml, 75 x 13 mm; 1,6 mg ETDA/ml Blut; Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland oder 9 ml S-Monovetten, 92 x 16 mm, Kalium-EDTA; Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) und ein Hirudin-Aufzieh-Röhrchen (4,5 ml; Dynabyte, München, Deutschland) für das Multiplate®-Gerät befüllt. Die Hirudin-Röhrchen waren mit einer Durchstichkappe aus Gummi versehen, da das Blut während der Entnahme keinen Luftkontakt haben sollte. Um eine korrekte Blutentnahme unter Luftabschluss zu gewährleisten, wurde eine Konstruktion aus zwei Kanülen (eine Kanüle für die Vene, eine andere zum Durchstechen der Kappe des Hirudin-Röhrchens) und einem Stück Infusionsschlauch (ca. 1,5 cm) zur Verbindung beider Kanülen verwendet (Abbildung 6), wie in der Dissertation von HUBER (2012) beschrieben. Die für das Hirudin-Röhrchen vorgesehenen Kanülen hatten stets 17 Gauge, die für das Tier variierte gemäß der Größe des Tieres (s.o.).

1.2.2. Thrombozytenfunktionsmessung

Zur Messung der Thrombozytenfunktion stand das Multiplate®-Impedanzaggregometer (Dynabyte, München, Deutschland) zur Verfügung. Für die Probenuntersuchung an diesem Gerät wurden für das Gerät ausgelegte Messzellen, Pipettenspitzen, 0,9%ige NaCl-Lösung, sowie die Thrombozytenagonisten ADP (0,6 mmol/l mit 1000 µl Aqua dest. aufgefüllt; Dynabyte, München, Deutschland) und Col (100 µg/ml Col mit 1000 µl Aqua dest. aufgefüllt; Dynabyte, München, Deutschland) verwendet. Bei einem

Volumen von 30 μl oder 50 μl Col ergibt sich aus der oben genannten Konzentration eine Gebrauchslösung von 3 $\mu\text{g/ml}$ oder 5 $\mu\text{g/ml}$ Col. Für 20 μl oder 30 μl des 0,6 mmol/l konzentrierten ADP-Reagenzes ergibt sich entsprechend eine ADP-Konzentration der Gebrauchslösung von 12 $\mu\text{mol/l}$ oder 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP.

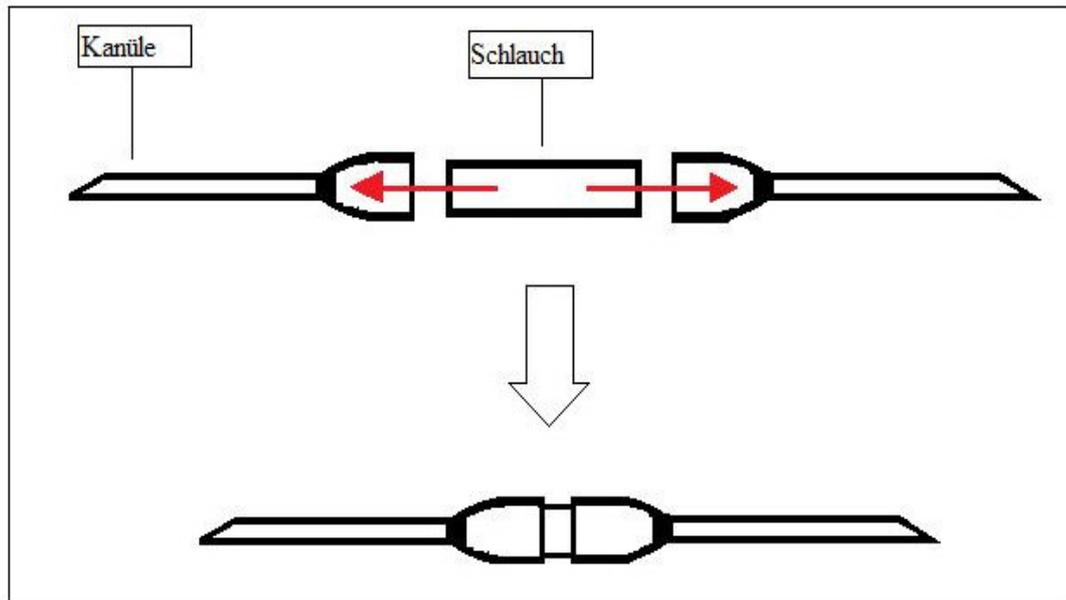


Abbildung 6: Infusionsschlauchstück-Kanülen-Steckverbindung zur luftabgeschlossenen Blutentnahme mit den Hirudin-Blutröhrchen (HUBER, 2012).

1.3. Methoden

1.3.1. Klinische Untersuchung

Die klinischen Anzeichen der Tiere mit Blutungsneigung wurden in erster Linie vom Hoftierarzt ermittelt, der die Blutproben des betroffenen Tieres einschickte. Bevor wir die Erstuntersuchungen der Verdachtstiere durchführten, wurden die Hoftierärzte, die das entsprechende Tier betreuten, zur aufgetretenen Symptomatik telefonisch befragt. Aus Managementgründen konnten wir auffällige Tiere nicht immer zeitnah zum Auftreten der Blutungssymptome beproben, weshalb die Beschreibung klinischer Anzeichen der Blutungsneigung bei einigen Tieren ausschließlich auf den Untersuchungen der Hoftierärzte und den Aussagen der Landwirte beruht. Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten klinischen Untersuchungen umfassten die Beschreibung des Allgemeinbefindens (gut oder reduziert), der Körperkondition (normal, zurückgeblieben), der

Schleimhautfarbe zur Beurteilung einer klinischen Anämie (obB oder blass) und sofern auftretend die Charakterisierung der Hautblutungen (gering-, mittel-, hochgradig; Lokalisierung), der Hämatome (Größe, Lokalisierung) und des Blutes im Kot (Schlieren, Koagel; gering-, mittel-, hochgradig).

1.3.2. Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte stets kopfwärts aus der Vena jugularis. Sobald die Kanüle gut in der Halsvene lag und ein steter Blutfluss vorhanden war, wurden die einzelnen Blutröhrchen befüllt. Zur Befüllung des Hirudin-Röhrchens wurde oben genannte Infusionsschlauchstück-Kanüle-Steckverbindung verwendet. Mit der aufgesetzten Kanüle konnte dann der Gummiverschluss des Hirudin-Röhrchens durchstoßen werden. Nach Aufziehen des Blutes wurde das Hirudin-Röhrchen von der zweiten Kanüle abgestöpselt und anschließend die in der Halsvene liegende Kanüle wieder entfernt. Bis zur Auswertung wurden die Blutproben bei Raumtemperatur gelagert. Die Messungen erfolgten frühestens nach 30 Minuten bis maximal drei Stunden nach der Blutentnahme.

1.3.3. Blutprobenauswertung

Die Auswertung von EDTA-Blut erfolgte über das Hämatologiesystem pochH-100iV DIFF (Sysmex Europe GmbH), das Serum wurde am Hitachi cobas c311 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) im Labor der Klinik für Wiederkäuer in Oberschleißheim bearbeitet. Über das EDTA-Blut wurden die Thrombozytenkonzentration und der Hämatokrit für unsere Zwecke ermittelt. Die Anfertigung der Blutchemie aus dem Serum sollten dem Hoftierarzt und Landwirt weitere Informationen zum Gesundheitszustand des Tieres liefern und als Entschädigung unsererseits für die „Bereitstellung“ des Tieres für unser Projekt dienen. Für die Beurteilung des Blutbildes und der Blutchemie wurden die Referenzwerte herangezogen, die zum Zeitpunkt der Studie vom Labor der Klinik für Wiederkäuer eingesetzt wurden und auf den Werten von STÖBER und GRÜNDER (1990) basierten. Das Hirudinblut wurde zur Messung der Thrombozytenfunktion mit dem Impedanzaggregometer Multiplate® ausgewertet.

1.3.4. Thrombozytenfunktionsmessung

1.3.4.1. Vorbereitung der Impedanzmessung

Vor Messbeginn musste das Computersystem des Multiplate®-Gerätes gestartet

werden. Die Multiplate-Software öffnete sich automatisch, der Heizblock begann sich zu erhitzen. Die 0,9%ige NaCl-Lösung wurde in ein dafür vorgesehenes Plastikreagenzröhrchen umgefüllt, welches in den Aussparungen des Heizblockes seinen Platz fand. Entsprechend der Tierart wurde die Betriebstemperatur auf 38,4 °C angehoben. Die in Pulverform gelieferten Aktivierungsreagenzien ADP und Col wurden mit je 1000 µl Aqua dest. in Lösung versetzt und das Hirudinblut wurde bereitgestellt.

Sobald der Heizblock die oben genannte Temperatur erreicht hatte, wurde eine elektronische Kontrolle durchgeführt, um die Messkanäle zu überprüfen. Fehlerhafte Kanäle wurden angezeigt und konnten gegebenenfalls blockiert werden.

Vor Messbeginn wurde vom Computersystem eine Beschriftung der einzelnen Kanäle, die zum Einsatz kamen, gefordert. Neben der Identifikation der Blutprobe, waren auch Art und Menge der eingesetzten Aktivierungsreagenzien einzutragen. Anschließend wurden die Messzellen in die dafür vorgesehenen Aussparungen eingesetzt und die Sensorkabel konnektiert.

1.3.4.2. Impedanzmessung

Die Durchführung der Thrombozytenfunktionsmessung erfolgte auf Anweisung des Computersystems. Die dazugehörige elektronische Pipette zog dabei auf Knopfdruck die in der Voreinstellung angegebenen Volumina auf. Zunächst waren alle eingesetzten Messzellen mit 300 µl der 0,9%igen NaCl-Lösung zu befüllen. Anschließend wurde die gleiche Menge an Hirudinblut der auszuwertenden Blutprobe hinzugefügt. Nach einer 3-minütigen Inkubationszeit wurden die Aktivierungsreagenzien in vorher angegebener Menge hinzupipettiert. Die ersten Multiplateuntersuchungen erfolgten mit 30 µl Kollagen und 20 µl ADP. Nach Vorliegen der Studie von HUBER (2012) wurden die Reagenzienmengen auf 50 µl Kollagen und 30 µl ADP erhöht. Nach Zugabe der Aktivierungsreagenzien erfolgte eine 6-minütige Impedanzmessung (HUBER, 2012). Die Messergebnisse wurden in Form einer Kurve oder Nulllinie in einem Graphen dargestellt und im Computersystem abgespeichert. Bei Bedarf konnten die Ergebnisse ausgedruckt werden.

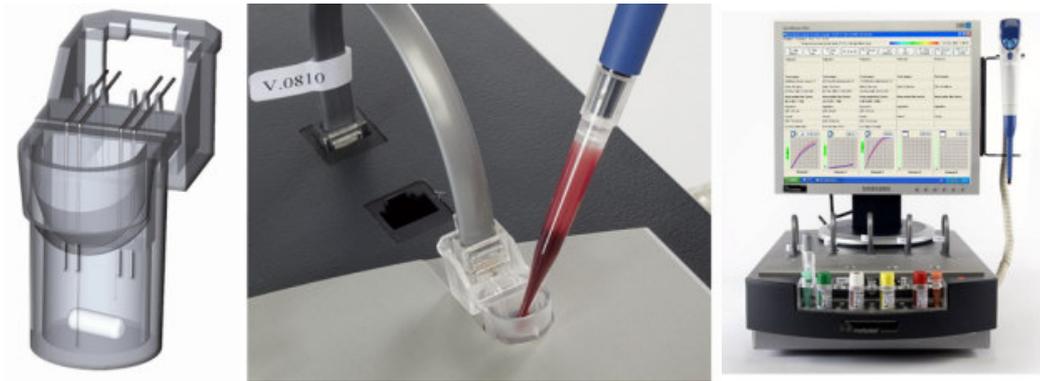


Abbildung 7: Messzelle, Messkanal und Impedanzaggregometer Multiplate® (www.multiplate.net).

1.3.4.3. Beurteilung der Messergebnisse

Am Ende jeder Messung wurden in den Graphen auf dem Bildschirm Kurven unterschiedlicher Steigung und Amplitude abgebildet. Die Messergebnisse (in Units) spiegelten den Grad der Widerstandserhöhung zwischen den Sensordrähten innerhalb einer Messzelle wider, der von der Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten abhing. Eine Null-Linie war Ausdruck fehlender Widerstandsänderung zwischen den Sensordrähten und somit der Nachweis einer fehlenden Thrombozytenaggregation in der entsprechenden Messzelle. Ein solches Ergebnis bezeichneten wir als „auffällig“ oder „negativ“. Abhängig von der Aggregationsfähigkeit waren die Kurven mehr oder weniger stark ausgeprägt. Stellte sich eine Kurve da, wurde das Ergebnis als „unauffällig“ oder „positiv“ bewertet.

1.3.5. Genetische Untersuchung

Sofern die Messungen am Impedanzaggregometer auffällig waren, wurde das EDTA-Blut betroffener Tiere an den Lehrstuhl für Tierzucht der TU München abgegeben. Dort wurden eine genomweite Genotypisierung, eine genomweite Assoziationsstudie und eine Haplotypenanalyse klinisch und labordiagnostisch auffälliger Tiere durchgeführt. Betrachtet wurde ein Genabschnitt auf dem bovinen Chromosom 29, der das *RasGRP2*-Gen trägt und bei den Tieren mit hereditärer Thrombozytopathie Simmentaler Rinder homozygot verändert ist (T>C). Die Ergebnisse erhielten wir im Anschluss der Untersuchungen, sind jedoch nicht Teil der vorliegenden Arbeit, sondern dienen nur einer Bestätigung unserer Diagnosestellungen.

2. Ermittlung von Referenzwerten für das Multiplate®-Gerät

2.1. Tiere

Für die Ermittlung der Referenzwerte für das Multiplate®-Impedanzaggregometer wurden Bullen, Kühe und Jungrinder herangezogen, die zum Zeitpunkt der Beprobung augenscheinlich klinisch gesund waren und nach Aussage der Halter oder Besitzer noch keine Symptome einer Blutungsneigung gezeigt hatten. Für die Beprobung der Bullen wurde die Jahresuntersuchung an der Besamungsstation Grub in Poing und die monatliche Untersuchung an der Besamungsstation Neustadt a. d. Aisch genutzt. Im Rahmen dieser konnten von 73 Tieren Multiplate-Untersuchungen durchgeführt werden. Die Beprobung der Kühe und Jungrinder erfolgte auf vier ausgewählten Betrieben der Tierarztpraxis Berchthold in Pittenhart und dem Lehr- und Versuchsgut der Tierärztlichen Fakultät der LMU. Insgesamt wurden 65 Kühe und 62 Jungrinder beprobt.

2.2. Verwendete Materialien

2.2.1. Blutproben

Zur Blutprobenentnahme bei den Bullen wurden Supra-Sonderkanülen (2,0 x 80 mm; Ehrhardt, Medizinprodukte GmbH, D-73312 Geislingen) verwendet. In Grub wurden zusätzlich 30 ml Spritzen (transoject®; 24539 Neumünster, Germany) benutzt. Zum Umfüllen des Blutes aus der Spritze in EDTA-Röhrchen (2 ml, 55 x 12 mm, K-EDTA; Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) und Hirudin-Vacutainer (3,0 ml Röhrchen, Antikoagulanzen: rekombinantes Hirudin; Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim) diente eine 17 Gauge Kanüle (1,5 x 50 mm, Neobject®; Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland). In Neustadt a. d. Aisch wurde die Infusionsschlauchstück-Kanülen-Steckverbindung eingesetzt. Das Blut wurde direkt in die oben genannten Röhrchen gewonnen. Für die Kühe und Jungrinder wurden größenabhängig 17 Gauge (1,5 x 50 mm, Neobject®; Dispomed Witt oHG, Gelnhausen, Deutschland) oder 14 Gauge Kanülen (2,1 x 60 mm; Bovivet; Kruuse, DK-5550 Langeskov, Denmark) verwendet.

2.2.2. Thrombozytenfunktionsmessung

Für die Thrombozytenfunktionsmessung wurde analog zu 1.3.4 das Multiplate®-

Impedanzaggregometer (Dynabyte; München, Deutschland; seit 2012 Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) mit entsprechendem Zubehör eingesetzt. Seit 2013 konnte ADP-Reagenz nur noch in der Konzentration 0,2 mmol/l bezogen werden. Um dennoch eine 0,6 molare Lösung zu erhalten, wurden die Aktivatoren mit nur 333 µl Aqua dest. aufgefüllt.

2.3. Methoden

2.3.1. Blutentnahme

Die Blutentnahme bei den Bullen erfolgte aus der Vena jugularis kopf- bzw. halswärts. An der Besamungsstation in Grub wurden zu den eigenen Blutproben von jedem Tier eine separate 30 ml Spritze an Blut gewonnen, das von uns in Hirudin-Vacutainer und EDTA-Blutröhrchen umgefüllt wurde. In Neustadt a. d. Aisch wurden die EDTA-Röhrchen und Hirudin-Vacutainer direkt befüllt. Für die Hirudin-Vacutainer kam wieder die Infusionsschlauchstück-Kanülen-Steckverbindung zum Einsatz. Die Jungrinder und Kühe wurden an der Vena jugularis kopfwärts angestochen. Das Blut wurde auf direktem Weg in die EDTA-Röhrchen gefüllt. Um die Hirudin-Vacutainer mit Blut zu befüllen, wurde oben beschriebene Infusionsschlauchstück-Kanülen-Steckverbindung verwendet. Bis zur Auswertung wurde das Blut bei Raumtemperatur gelagert.

2.3.2. Blutprobenauswertung

Die Auswertung des EDTA-Blutes erfolgte jeweils am Tag der Entnahme im Labor der Klinik für Wiederkäuer in Oberschleißheim. Die Thrombozytenfunktionsmessung wurde mit dem Hirudinblut innerhalb von 3 Stunden am Multiplate®-Impedanzaggregometer durchgeführt. Für die Impedanzmessung dienten Kollagen (50 µl) und ADP (30 µl) als Aktivierungsreagenzien. Der Ablauf der Impedanzmessung erfolgte wie unter 1.3.4 beschrieben.

2.3.3. Statistische Auswertung

Zur Ermittlung der Referenzwerte für die Thrombozytenfunktion bei Bullen, Kühen und Jungrindern wurde das Statistikprogramm SPSS (IBM, Version 20.0) verwendet. Pro Messdurchlauf sind durch die Doppelmessung in den Messzellen jeweils zwei AUC-Werte (AU*Min) pro Reagenz und Tier aufgezeichnet worden. Obwohl das Multiplate®-Computersystem schon jeweils den entsprechenden

Mittelwert aus den Doppelmessungen ausgerechnet hatte (Units), wurden für die Statistik dennoch die jeweiligen Einzelwerte herangezogen. Über den Kolmogorov-Smirnov Test wurde zunächst auf Normalverteilung überprüft. Mittels Henry & Reed-Test (REED et al., 1971) wurde anschließend auf Ausreißer untersucht und diese gegebenenfalls von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Zur Berechnung der Referenzwerte wurde das parametrische Verfahren ($\bar{x} \pm 2SD$) angewandt (FRIEDRICHS et al., 2012). Zur bildlichen Darstellung sind zusätzlich Boxplots angefertigt worden. Anschließend wurde innerhalb jeder Tiergruppe auf Korrelationen (mittels Korrelationskoeffizient nach Pearson) zwischen den AUC-Werten (bei Aktivierung mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Col und 18 $\mu\text{mol/l}$ ADP) und Thrombozytenkonzentration untersucht.

IV. ERGEBNISSE

1. Untersuchung von Tieren mit Verdacht auf Thrombozytopathie

1.1. Verdachtsfälle

Durch die eingesandten Blutproben und überwiesenen Rinder mit Blutungsneigung ergaben sich nach den beschriebenen Selektionskriterien 116 Verdachtsfälle. Aufgrund von Verkauf, Schlachtung, Tod oder zu großer Entfernung des Betriebes von unserem Standort, konnte jedoch nicht bei allen verdächtigen Tieren, von denen Blutproben eingesandt worden waren, die Thrombozytenfunktion mittels Multiplate® untersucht werden. Von Rindern mit auffälligem Multiplate®-Ergebnis wurde anschließend eine genetische Untersuchung am Lehrstuhl für Tierzucht der TU München durchgeführt.

1.2. Thrombozytopathie-Tiere

Aus der Summe der Verdachtstiere konnten 44 Falltiere ermittelt werden, die sowohl bei der Impedanzmessung, als auch genetisch auffällig waren. Für die folgende Beschreibung des Phänotypes dieser erblich bedingten Gerinnungsstörung beim Fleckvieh wurden nur diese Tiere berücksichtigt. Abbildung 8 und Tabelle 1 geben eine Übersicht über die Häufigkeit auftretender Symptome und die Verteilung derer auf die einzelnen Tiere.

1.2.1. Klinische Anzeichen

Bei 31 der 44 Tiere (ca. 70 %) äußerte sich die Blutgerinnungsstörung in spontanen Hautblutungen. Die Tiere zeigten an der Blutaustrittsstelle keine Verletzung. Das Blut sickerte tropfenweise durch die Haut in das Fell und hinterließ der Schwerkraft folgend lange Blutstraßen. Abhängig vom Grad der Hautblutung bildeten sich blutdurchtränkte Fellareale, die unter Umständen die gesamte Rückenpartie bedeckten (Abbildung 9). Nach Auskunft der Landwirte und Hoftierärzte hielten die Hautblutungen einige Stunden bis mehrere Tage an, traten wiederholt auf oder stagnierten schon nach kurzer Zeit, ohne dass es zu erneuten Blutungen kam. Auffallend war, dass Hautblutungen vermehrt in den Sommermonaten auftraten. Von 31 Fällen mit Hautblutungen wurden 26 Fälle zwischen Juni und September gemeldet (Abbildung 10).

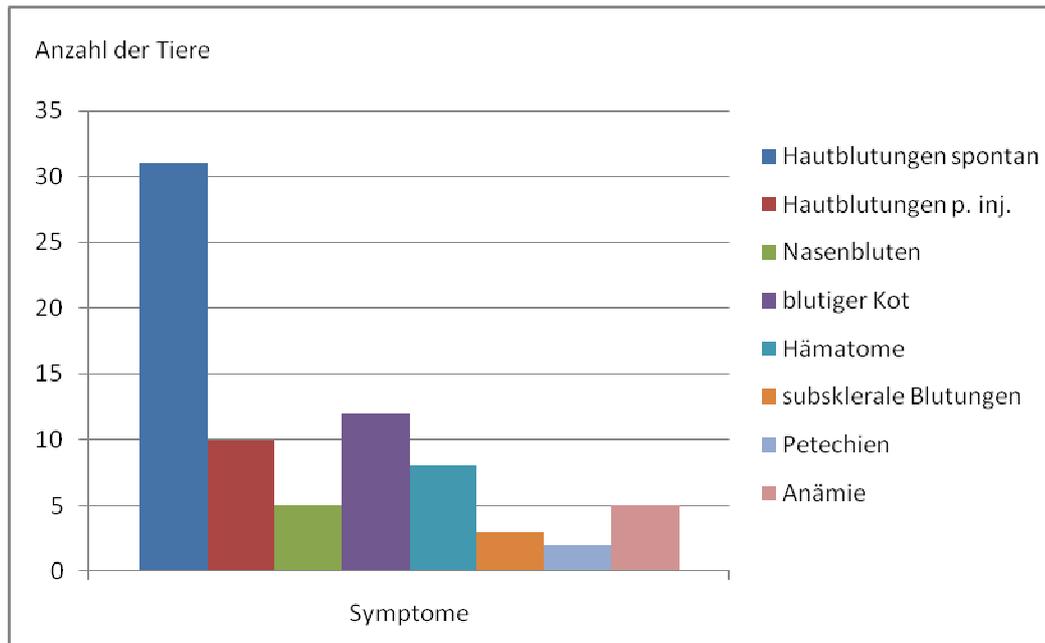


Abbildung 8: Die Häufigkeit aufgeführter Symptome der Blutungsneigung bei 44 Tieren mit HTS. Dabei muss berücksichtigt werden, dass bei den Tieren auch mehrere Symptome auftreten können.



Abbildung 9: Spontane Hautblutungen an der linken Brustwand bei einer Fleckviehkuh mit HTS. Zentral eine frische Blutung, die verkrusteten Stellen sind im Fell eingetrocknetes Blut.

Zehn Tiere reagierten nach Injektionen, Ohrmarkeneinziehen oder Verletzungen mit deutlich verlängerten Blutungszeiten aus den verletzten Hautstellen. Die Blutungen dauerten, wie bei den spontanen Hautblutungen, Stunden bis Tage an. Auffallend war, dass es bei keinem Tier nach Blutentnahme aus der Vena jugularis für die weiterführenden Untersuchungen zu Hautblutungen und Nachblutungen aus der V. jugularis kam.

Fünf Tiere zeigten Nasenbluten unterschiedlichen Grades, wie in Abbildung 11 dargestellt.

Bei 12 Tieren wurde von den Landwirten und/oder Tierärzten blutiger Kot beobachtet. Die Blutmenge variierte von Schlieren über Koagel bis hin zu hochgradigen Beimengungen im Kot. Blutiger Kot wurde nur bei Tieren beobachtet, die jünger als acht Wochen waren.

Acht Tiere wiesen vorberichtlich Hämatome an unterschiedlichsten Körperregionen auf. Die Blutergüsse traten entweder nach beobachteten Verletzungen auf oder entwickelten sich ohne bekanntes Trauma. Bei einem klinikeigenen Tier (ID_100) wurde im Rahmen der Sektion ein etwa fußballgroßes intraabdominales Hämatom beschrieben.

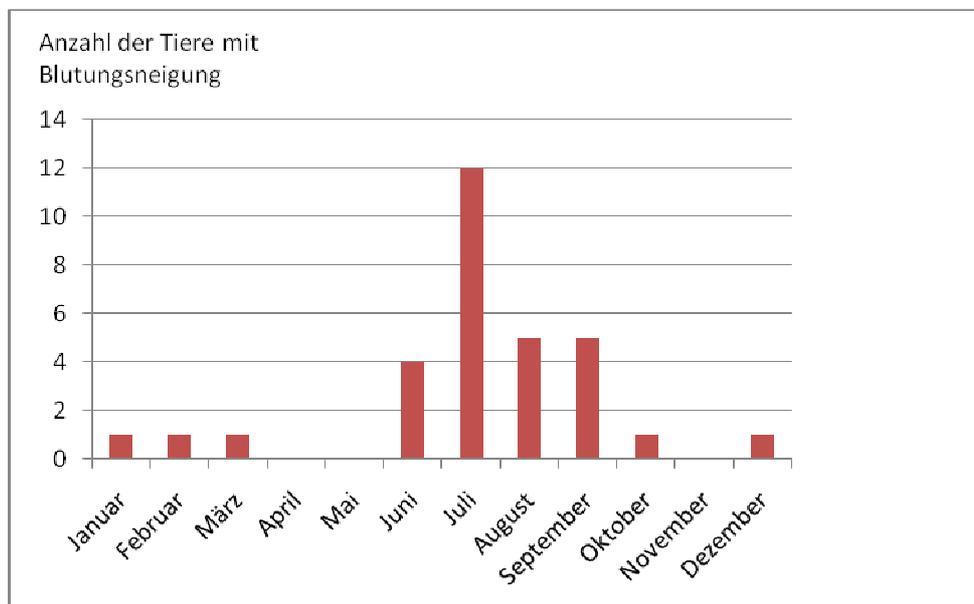


Abbildung 10: Verteilung der an HTS erkrankten Tiere mit spontanen Hautblutungen über das Jahr.

Bei drei Tieren traten Blutungen im Bereich der Skleren auf. Zwei Tiere zeigten Petechien im Bereich der Maulschleimhaut. Bei fünf Tieren wurden blasse

Schleimhäute als Zeichen einer Anämie beobachtet. Bei 20 Tieren lag der Hämatokritwert unterhalb des Referenzwertes. Darunter befanden sich auch die fünf Tiere mit blassen Schleimhäuten.

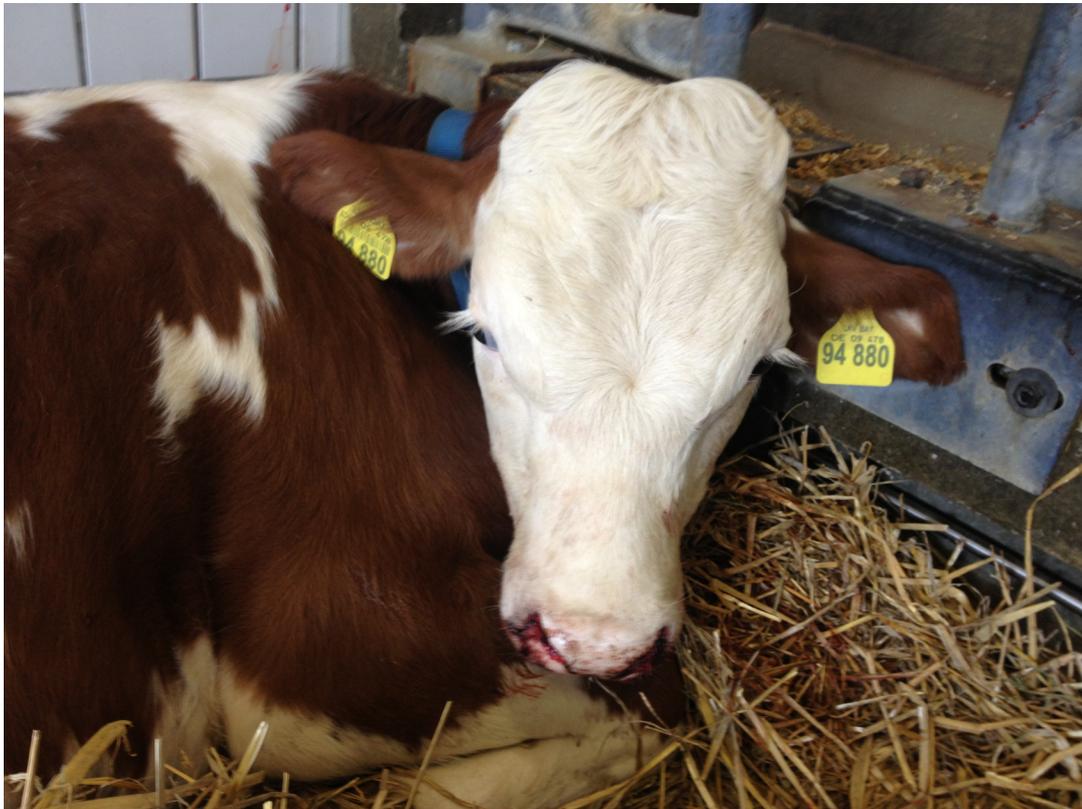


Abbildung 11: Beidseitiges Nasenbluten bei einem Kalb mit HTS. Das Kalb litt zudem an einer klinisch sichtbaren Anämie.

1.2.2. Geschlechterverteilung

Die 44 Falltiere teilten sich in 23 weibliche und 21 männliche Tiere auf.

1.2.3. Altersverteilung

Von den 44 Fleckviehrindern mit nachgewiesener Thrombozytenfunktionsstörung zeigten 24 Tiere im Alter von unter vier Wochen die ersten Symptome von Blutungsneigung. Bei zwei Tieren wurden erste Blutungen zwischen einem und sechs Monaten beobachtet. Acht Tiere hatten zwischen 6 und 18 Monaten klinische Anzeichen der HTS. Zehn Tiere waren schon über 1,5 Jahre, bevor die ersten Symptome von Blutungsneigung von ihren Besitzern beobachtet wurden. In Abbildung 12 ist die Altersverteilung der Falltiere bei Auftreten der ersten Symptome von Blutungsneigung grafisch dargestellt.

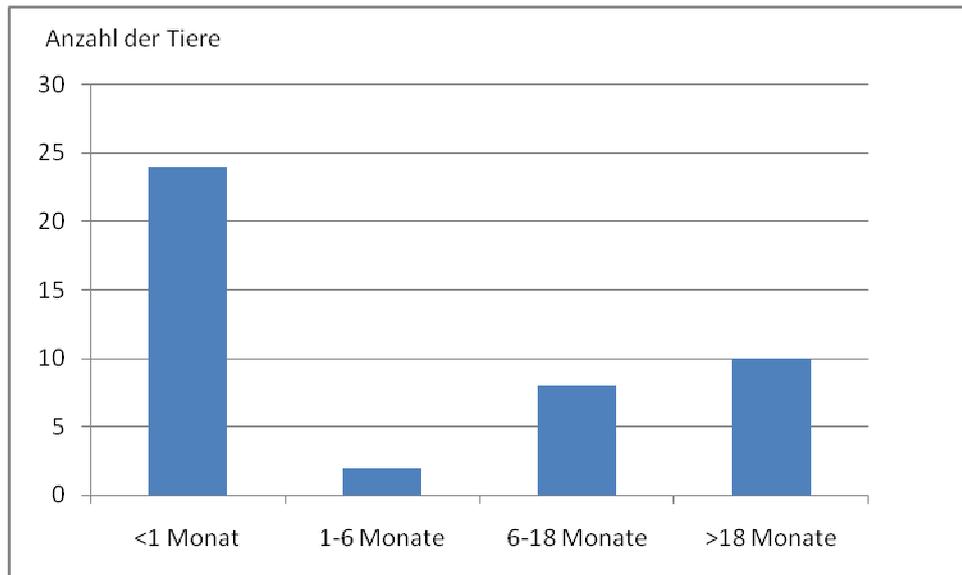


Abbildung 12: Altersverteilung der Tiere mit HTS bei Auftreten der erstmals beobachteten Symptome der Blutungsneigung.

1.2.4. Thrombozytenkonzentration

Mithilfe der Thrombozytenkonzentration konnte die HTS von der BNP abgegrenzt werden. Die Thrombozytenkonzentrationen lagen innerhalb oder über dem Referenzwert der Thrombozytenkonzentration gesunder Tiere. Die Thrombozytenkonzentration bei 41 von 44 Tieren mit HTS lag zwischen 203 G/l und 1856 G/l (Referenzbereich: 200 – 800 x 10³ Thrombozyten/ μ l) (Abbildung 13). Von drei Tieren lagen die Blutbilder nicht mehr vor. Es war jedoch bekannt, dass die Thrombozytenkonzentration jeweils innerhalb des Referenzbereiches lag.

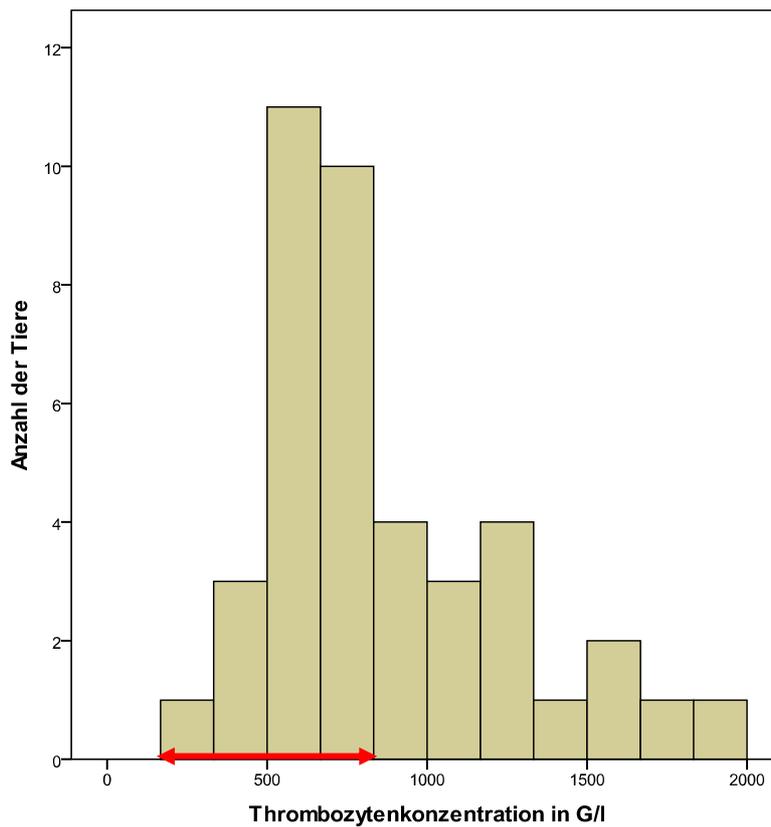


Abbildung 13: Verteilung der Thrombozytenkonzentrationen in G/l bei Rindern unterschiedlicher Altersgruppen mit HTS von 41 aus 44 Falltieren. Der rote Pfeil weist auf den hier verwendeten Referenzbereich der Thrombozytenkonzentration ($200 - 800 \times 10^3$ Thrombozyten/ μ l) hin.

1.2.5. Thrombozytenfunktionsmessung

Die Thrombozytenfunktionsmessung war für uns das wichtigste diagnostische Mittel, um bei Rindern mit Blutungsneigung eine Thrombozytopathie zu identifizieren. Als Aktivierungsreagenzien dienten Col und ADP. Ein auffälliges Multiplate®-Ergebnis lag vor, sobald eine Aggregation der Thrombozyten trotz Aktivierung vermindert ausfiel oder ausblieb. Niedrige AUC-Werte (in U) bestätigten das Vorliegen einer Thrombozytenfunktionsstörung.

1.2.5.1. AUC-Werte nach Stimulation mit Collagen-Reagenz

Bei 41 Tieren lag der Aggregationswert zwischen Null und 25 Units. 3 Tiere (ID_18, 64, 80) reagierten nach Stimulation mit Col (5 µg/ml) mit einer deutlichen Thrombozytenaggregation (Abbildung 14). Bei insgesamt 11 Tieren lag der Aggregationswert innerhalb des Referenzbereiches der entsprechenden Alters- bzw. Geschlechtergruppe (Bullen: 11,78 – 70,58 U; Kühe: 11,97 – 80,79 U; Jungrinder: 5,27 – 82,57 U; Kälber: 19,43 – 119,21 U).

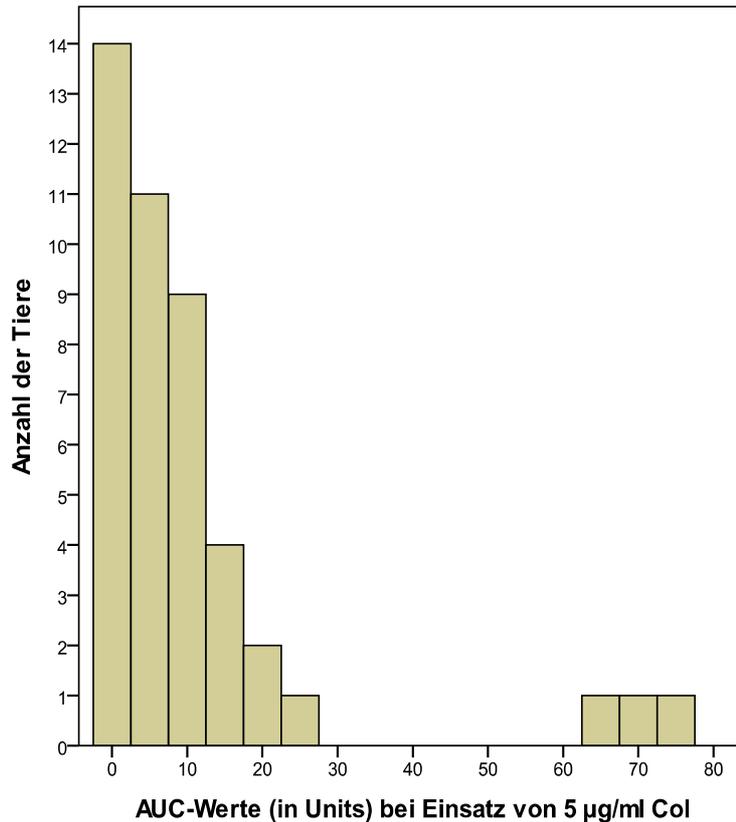


Abbildung 14: AUC-Werte der Thrombozytenfunktionsmessung in Units nach Aktivierung der Thrombozyten mit Collagen-Reagenz (n=44).

1.2.5.2. AUC-Werte nach Stimulation mit ADP-Reagenz

Wurde den Thrombozyten ADP (18 µmol/l) als Aktivierungsreagenz zugesetzt lagen die Aggregationswerte zwischen Null und 7 Units (Abbildung 15). Bei allen 44 Falltieren fehlte eine adäquate Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit ADP. Demnach befand sich der Aggregationswert bei keinem Tier innerhalb des entsprechenden Referenzbereiches (Bullen: 32,5 – 108,32 U; Kühe: 35,01 – 130,86 U; Jungrinder: 42,86 – 119,28 U; Kälber: 17,84 – 119,21 U).

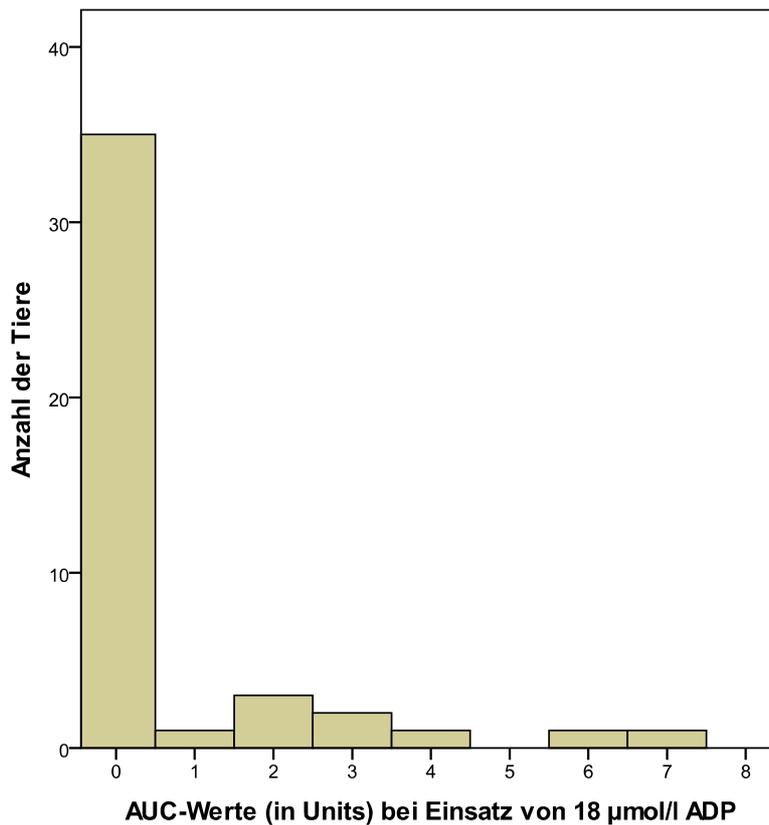


Abbildung 15: AUC-Werte der Thrombozytenfunktionsmessung in Units nach Aktivierung der Thrombozyten mit ADP-Reagenz (n=44).

1.2.6. Klinischer Verlauf der klinischen Tiere mit Thrombozytopathie

1.2.6.1. Kliniktier 2012/1017

Mittels einer Thrombozytenfunktions- und einer anschließenden genetischen Untersuchung konnte bei diesem Tier eine Thrombozytopathie nachgewiesen werden. In Tabelle 2 ist die klinische Entwicklung des Tieres in Bezug auf seine Thrombozytenfunktionsstörung dargestellt.

1.2.6.2. Kliniktier 2013/0344

Eine Thrombozytenfunktionsmessung und die darauffolgende genetische Untersuchung bestätigten das Vorliegen der HTS. Tabelle 3 zeigt die klinische Entwicklung des Tieres in Bezug auf die Thrombozytenfunktionsstörung.

| Datum | Hautblutung spontan | Hautblutung p. Inj. | blutiger Kot | Impedanzmessung | Ergebnis Impedanzmessung | Thrombozytenkonzentration | Sonstiges |
|------------|---|---------------------|--------------|-----------------|--------------------------|---------------------------|----------------------|
| 12.07.2012 | x | | | x | auffällig | im Referenzbereich | Hkt: 54,2 % |
| 24.07.2012 | x | | | x | auffällig | im Referenzbereich | |
| 25.07.2012 | x | | | | | | |
| 27.07.2012 | | | | x | auffällig | | |
| 28.07.2012 | x | | | | | | |
| 29.07.2012 | | | x | | | | |
| 30.07.2012 | | | x | x | auffällig | | |
| 31.07.2012 | | | x | | | | |
| 09.08.2012 | x | | | | | | |
| 11.08.2012 | | | x | | | | |
| 14.08.2012 | | | x | | | | |
| 19.08.2012 | | | x | | | | |
| 21.08.2012 | x | | | | | | |
| 28.08.2012 | | | x | | | | |
| 29.08.2012 | | | x | | | | |
| 30.08.2012 | x | | x | | | | |
| 02.09.2012 | x | | | | | | |
| 03.09.2012 | x | | | x | auffällig | | |
| 05.09.2012 | x | | | x | auffällig | | |
| 09.09.2012 | x | | | | | | |
| 10.09.2012 | x | | | | | | |
| 18.09.2012 | x | | | | | | |
| 19.09.2012 | x | | | | | | |
| 25.09.2012 | x | | | x | auffällig | im Referenzbereich | Hkt: 27,2 % |
| 27.09.2012 | x | | | | | | unblutige Kastration |
| 10.11.2012 | | x | | | | | |
| 11.11.2012 | | x | | | | | |
| 12.11.2012 | | x | | x | auffällig | | |
| 13.11.2012 | Tod; Sektion: fußballgroßes Hämatom im Bereich rechter Bauchwand, Hämatom zieht flächig bis zur Brustwand | | | | | | |

Tabelle 2: Klinischer Verlauf des klinkeigenen Tieres 2012/1017 mit HTS. Der Patient wurde täglich untersucht. Auffällige Befunde bezüglich der Blutungsneigung sind unter Angabe des Datums in der Tabelle wiedergegeben. Die Impedanzmessung wurde als auffällig bezeichnet, sofern die Messungen im Multiplate® unter Verwendung von Col und ADP AUC-Werte unter 10 U ergaben. Thrombozytenkonzentrationen zwischen 200 und 800 G/l wurden als Referenzbereich definiert.

Tabelle 3: Klinischer Verlauf des klinkeigenen Tieres 2013/0344. Der Patient wurde täglich untersucht. Auffällige Befunde bezüglich der Blutungsneigung sind unter Angabe des Datums in der Tabelle wiedergegeben. Die Impedanzmessung wurde als auffällig bezeichnet, sofern die Messungen im Multiplate® unter Verwendung von Col und ADP AUC-Werte unter 10 U ergaben. Thrombozytenkonzentrationen zwischen 200 und 800 G/l wurden als Referenzbereich definiert.

| Datum | Hautblutung spontan | Hautblutung p. Inj. | blutiger Kot | Impedanzmessung | Ergebnis Impedanzmessung | Thrombozytenkonzentration | Sonstiges |
|------------|---------------------|---------------------|--------------|-----------------|--------------------------|---------------------------|--------------|
| 14.03.2013 | x | x | | x | auffällig | im Referenzbereich | Hkt: 21,90 % |
| 16.03.2013 | | | | | | | Hkt: 20,00 % |
| 17.03.2013 | | | x | | | | |
| 18.03.2013 | | | x | | | | |
| 19.03.2013 | | | x | | | | |
| 22.03.2013 | | | x | | | | |
| 26.03.2013 | | | x | | | | |
| 16.04.2013 | | | | x | auffällig | über Referenzbereich | |
| 16.05.2013 | | | | x | auffällig | über Referenzbereich | Hkt: 20,00 % |
| 11.06.2013 | | | | x | auffällig | im Referenzbereich | Hkt: 30,20 % |
| 15.07.2013 | x | | | | | | |
| 18.07.2013 | | | | x | auffällig | über Referenzbereich | Hkt: 30,00 % |
| 13.08.2013 | x | | | X | auffällig | | |
| 23.08.2013 | x | | | | | | |
| 25.08.2013 | x | | | | | | |
| 05.09.2013 | x | | | | | | |
| 08.09.2013 | x | | | | | | |
| 09.09.2013 | x | | | | | | |
| 27.09.2013 | x | | | | | | |

1.2.7. Fragebogenauswertung

Von 44 Tieren mit nachgewiesener Thrombozytenfunktionsstörung sollte mittels eines Telefongespräches mit den Besitzern der Werdegang seit der ersten Beprobung eruiert werden. Sieben Tiere wurden aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes unmittelbar nach der Beprobung auf dem Hof oder der Klinik für Wiederkäuer euthanasiert, sind direkt danach gestorben oder zum Schlachten gegangen und fielen damit aus diesem Teil der Studie heraus. In fünf Fällen davon scheint die Blutungsneigung unmittelbare Ursache gewesen zu sein. Zu einem Tier konnte keine Information mehr gewonnen werden. Von den verbliebenen 36 Tieren haben sich nach Auskunft der Landwirte 31 Tiere zwischen erster Beprobung und erneuter Befragung normal entwickelt. Fünf Rinder sind in ihrer Entwicklung zurückgeblieben (Abbildung 16). Dazu gehört auch unser klinikeigenes Tier (ID_126), das deutliche Wachstumsdefizite zeigt. 12 Tiere (männlich) wurden im Alter weniger Wochen über den Viehmarkt verkauft. Von diesen Tieren hatten sich bis dahin nach Auskunft der Landwirte alle bis auf eines normal entwickelt. Das körperlich zurückgebliebene Tier und ein weiteres zeigten erneut Blutungsepisoden. Sieben Tiere wurden bewusst geschlachtet, weil die Landwirte weitere Blutungsphasen befürchteten. Davon wurden zwei weibliche Tiere zum Schlachten gebracht, da für die Landwirte aufgrund der Blutungsneigung eine Belegung zu riskant erschien. Ein weibliches Tier, das zum Zeitpunkt des Gespräches noch im Bestand war, sollte ebenso zum Schlachten, weil das Risiko einer Gefährdung des Tieres bei einer Belegung zu hoch eingeschätzt wurde, obwohl es keine weiteren Blutungsphasen mehr zeigte. Acht Tiere standen zum Zeitpunkt des Gespräches noch in den jeweiligen Betrieben. Fünf der neun Tiere zeigten im Laufe der Aufzucht weitere Symptome der Blutungsneigung. Zwei Rinder, die erneut Blutungen zeigten, wurden dennoch bei Erreichen des Zuchtalters besamt. Ein weiteres sollte trotz erneuter Blutungen besamt werden. Eine Kuh zeigte die Symptome erst lange nach der ersten Kalbung, wurde dann aber aufgrund der Blutungsneigung geschlachtet. Insgesamt kalbten nach Auskunft der Besitzer drei Tiere ohne Probleme ab und brachten symptomatisch gesunde Kälber zur Welt. Zwei männliche Tiere wurden als normal entwickelte adulte Bullen geschlachtet, von denen einer bis dahin erneut Blutungssymptome zeigte. Von den insgesamt 36 Rindern zeigten 17 Tiere seit der ersten Blutungssymptomatik wiederholt Blutungsperioden (Abbildung 16). Drei Tiere wurden aufgrund anderer Ursachen geschlachtet oder euthanasiert. Ein

Tier musste wegen unstillbarer Blutungen notgeschlachtet werden. Zwei Tiere erlagen im Laufe der Aufzucht den Folgen der Blutungsneigung. Darunter auch eines der klinikeigenen Tiere (ID_100). Von insgesamt sieben Tieren wurde erneut eine Thrombozytenfunktionsmessung durchgeführt. Die Thrombozytenfunktionsstörung konnte bei allen beprobten Tieren wiederholt bestätigt werden.

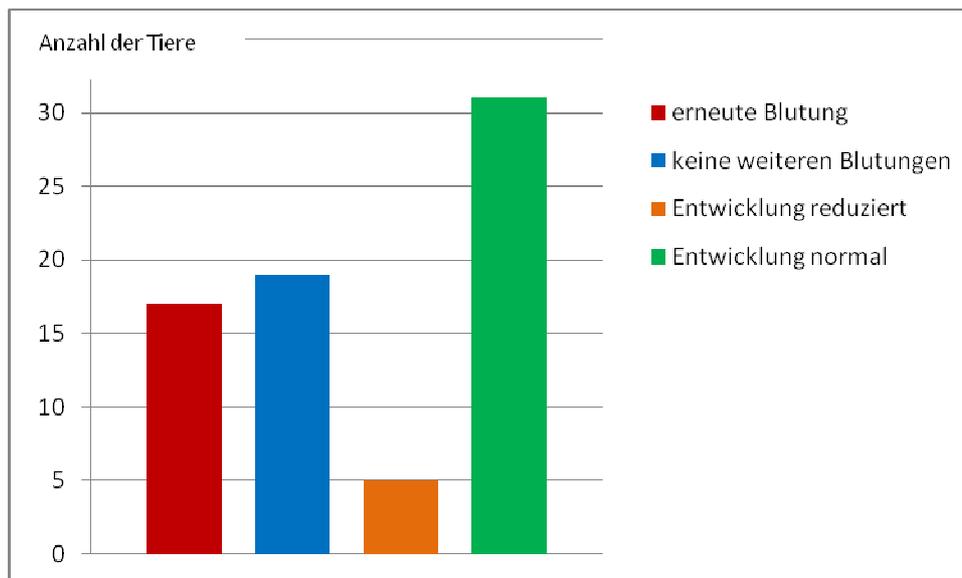


Abbildung 16: Übersicht des Verlaufes hinsichtlich der Blutungsneigung und der körperlichen Entwicklung von 36 der 44 Rinder mit HTS zwischen erster Beprobung und dem Zeitpunkt der telefonischen Befragung des Besitzers.

2. Ermittlung von Referenzwerten für das Multiplate®-Impedanzaggregometer

2.1. Bullen

Insgesamt wurden Proben von 73 Bullen im Alter zwischen 12 Monaten und 10,5 Jahren gezogen. Zwei Proben waren aufgrund von Gerinnung im Impedanzaggregometer nicht auswertbar. Zur Berechnung der Referenzwerte für das Multiplate-Gerät wurden nur Messwerte von Bullen über 18 Monate herangezogen, um Überschneidungen des Alters mit dem der Jungrindergruppe zu vermeiden. Aufgrund der - verglichen mit den in unserer Klinik gebräuchlichen Referenzwerten der Thrombozytenkonzentration bei Rindern (200000/ μ l – 800000/ μ l) - durchschnittlich niedrigeren Thrombozytenkonzentration bei vorliegenden Blutergebnissen, berechneten wir auch die AUC-Werte der Bullen

mit ein, deren Thrombozytenkonzentration zwischen 150000/ μ l und 200000/ μ l lag. Schließlich umfasste die Gruppe der Bullen 61 Tiere. In Abbildung 17 ist die Verteilung der AUC-Werte in Units nach Inkubation der Thrombozyten mit 5 μ g/ml Col und 18 μ mol/l ADP von 61 Bullen dargestellt.

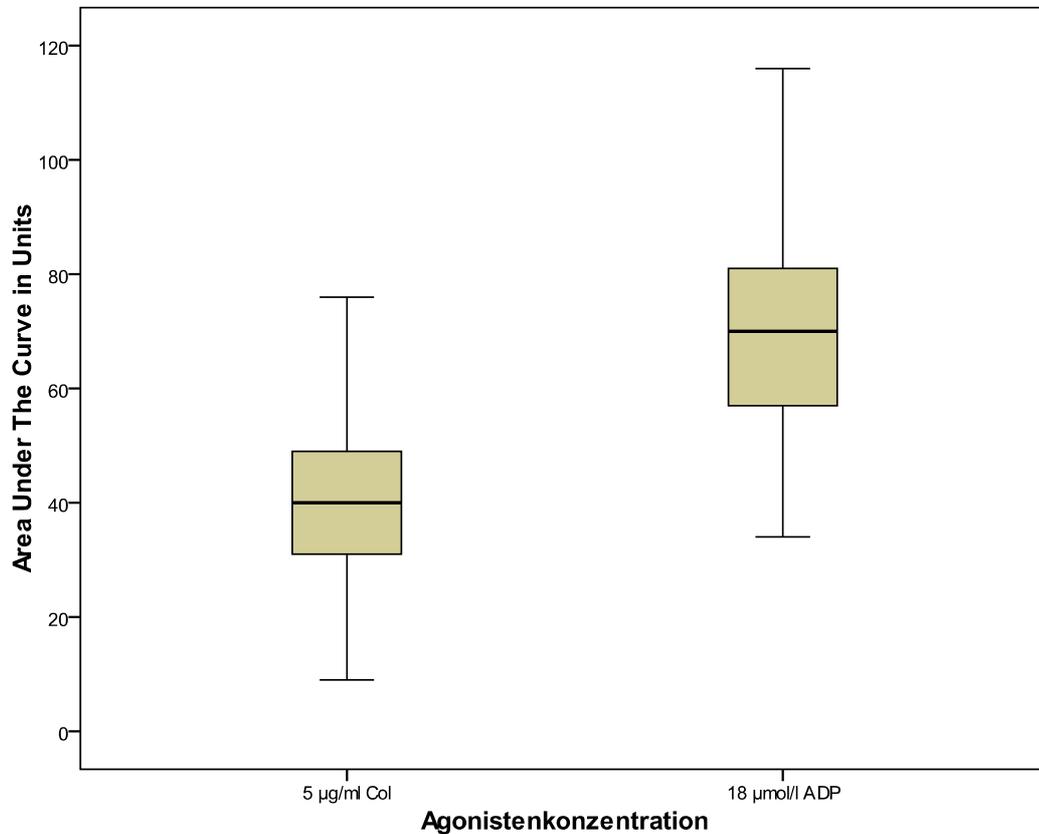


Abbildung 17: Verteilung der AUC-Werte in Units im Multiplate® von 61 Bullen mit einer Thrombozytenkonzentration von > 150000/ μ l, inkubiert mit 5 μ g/ml Col und 18 μ mol/l ADP. In den Boxen (Interquartilbereiche) sind jeweils die Mediane dargestellt.

Zur Ermittlung der Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov Test angewandt. Für diesen Test wurden die Doppelmessungen pro Reagenz und Tier einzeln einbezogen (n = 122). Das Ergebnis deutet sowohl für 5 μ g/ml Col (p = 0,916) als auch für 18 μ mol/l ADP (p = 0,826) auf eine Normalverteilung hin. Der Ausreißertest nach Henry und Reed ergab keine Ausreißer (Col: Min.: 0,003953; Max.: 0,1173 / ADP: Min.: 0,072435; Max.: 0,108652). Die berechneten Referenzwerte für Bullen ab 18 Monate sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Referenzbereich, Mittelwert (\bar{X}) und Standardabweichung (SD) für die Thrombozyten-Aggregation im Multiplate®, von mit 5 µg/ml Col und 18 µmol/l ADP inkubiertem Hirudinblut bei Bullen über 18 Monate.

| | \bar{X} AUC in AU*Min | |
|----------------------------------|-------------------------|---------------|
| | 5 µg/ml Col | 18 µmol/l ADP |
| \bar{X} | 411,80 | 704,11 |
| SD | 146,99 | 189,56 |
| Referenzbereich | | |
| Untere Grenze ($\bar{X}-2*SD$) | 117,82 | 324,99 |
| Obere Grenze ($\bar{X}+2*SD$) | 705,78 | 1083,23 |

2.1.1. Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und den AUC-Werten (Units) der Thrombozytenfunktion

Der Vergleich zwischen der Thrombozytenkonzentration und den AUC-Werten zeigte für 5 µg/ml Col eine mittlere ($r = 0,595$; $p < 0,001$) und für 18 µmol/l ADP eine geringe ($r = 0,377$; $p = 0,003$) Korrelation. Die graphische Darstellung der Zusammenhänge zwischen Thrombozytenkonzentration und Aggregationswert sind der Abbildung 18 (5 µg/ml Col) und der Abbildung 19 (18 µmol/l ADP) zu entnehmen.

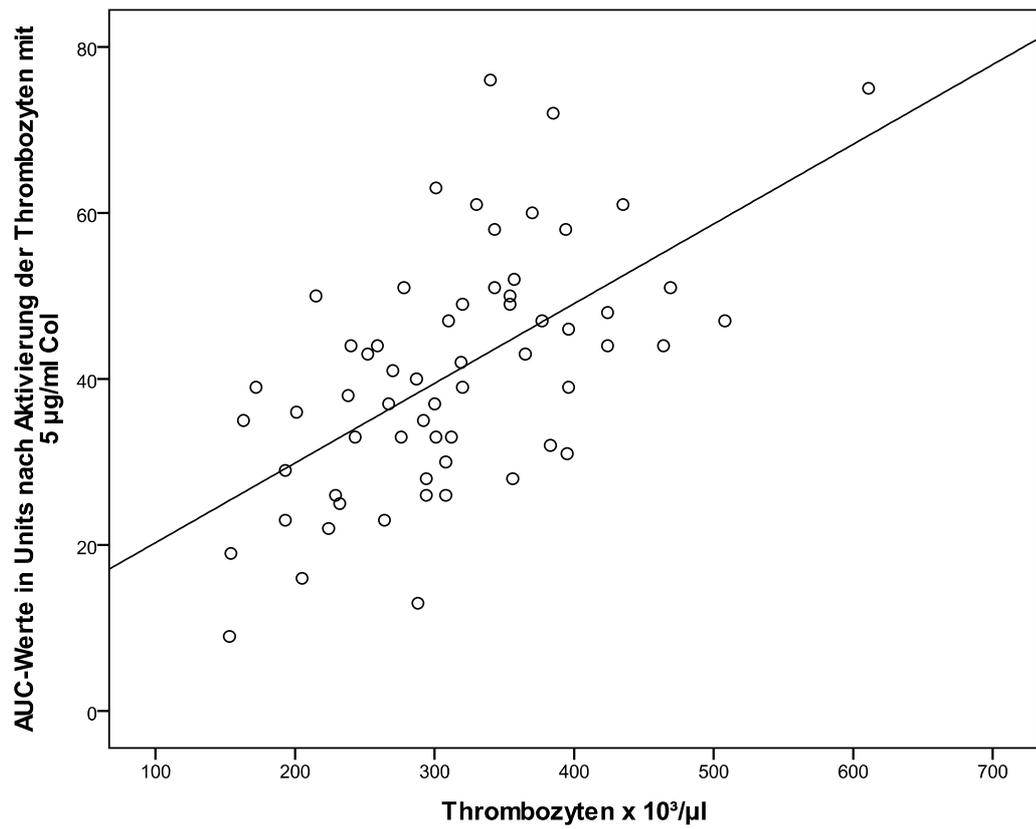


Abbildung 18: Streudiagramm mit Trendlinie für die AUC-Werte im Multiplate® in Abhängigkeit von der Thrombozytenkonzentration bei 61 Bullen, inkubiert mit 5 µg/ml Col.

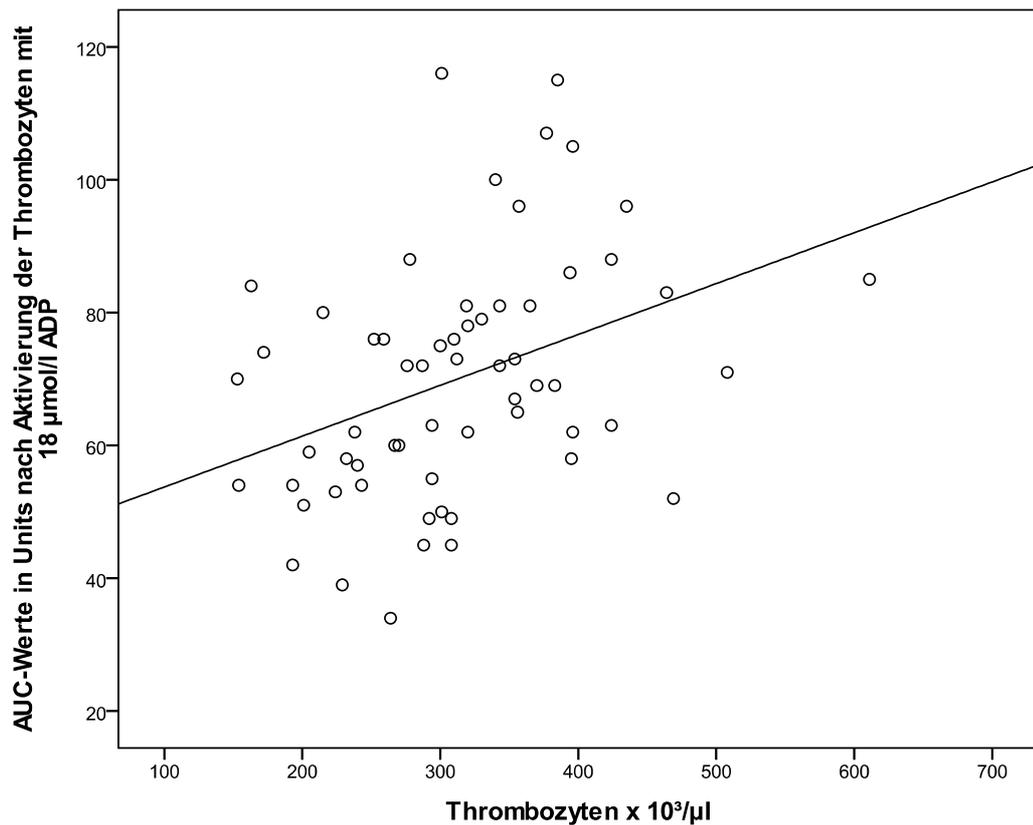


Abbildung 19: Streudiagramm mit Trendlinie für die AUC-Werte im Multiplate® in Abhängigkeit von der Thrombozytenkonzentration bei 61 Bullen, inkubiert mit 18 µmol/l ADP.

2.2. Kühe

Von den 65 Kühen wurden nur Tiere mit einer Thrombozytenkonzentration > 200000/µl mit einbezogen (n = 61). Kühe mit einer Thrombozytenkonzentration < 200000/µl wurden für die weitere Berechnung nicht mit berücksichtigt. Das Alter der Tiere variierte zwischen 20 Monaten und 11,5 Jahren. In Abbildung 20 ist die Verteilung der AUC-Werte in Units nach Inkubation der Thrombozyten mit 5 µg/ml Col und 18 µmol/l ADP von 61 Kühen dargestellt.

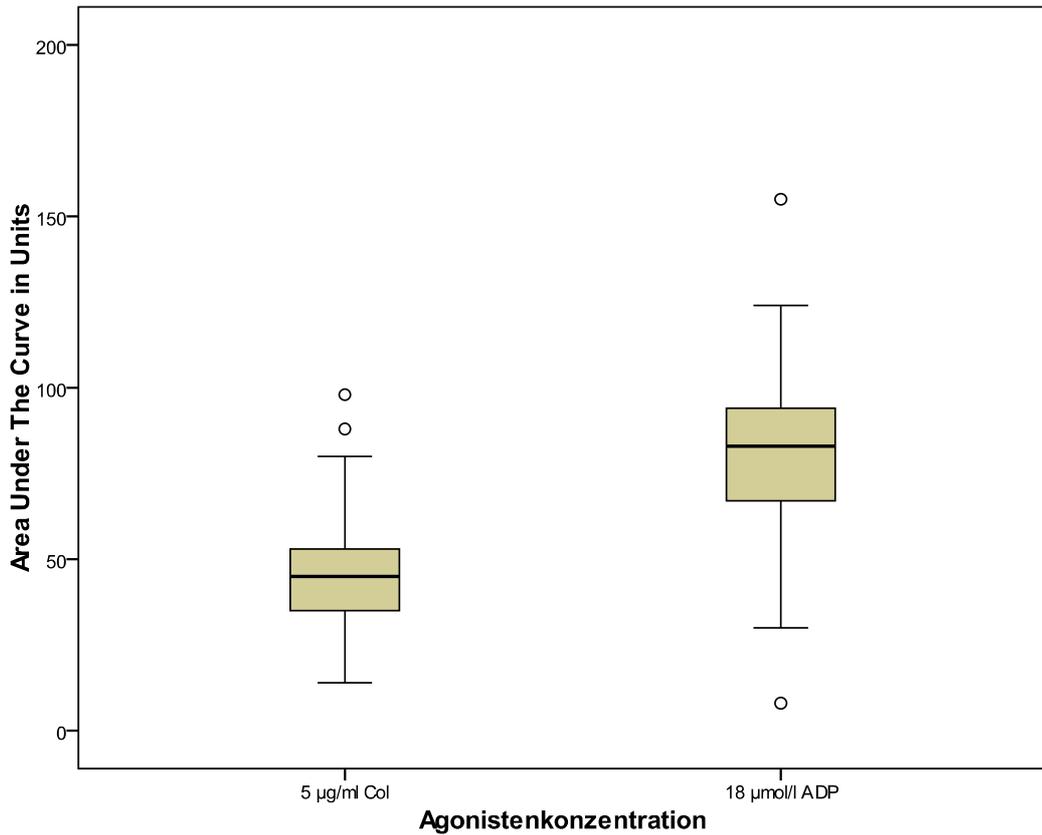


Abbildung 20: Verteilung der AUC-Werte in Units im Multiplate® von 61 Kühen mit einer Thrombozytenkonzentration von $> 200000/\mu\text{l}$, inkubiert mit $5 \mu\text{g/ml}$ Col und $18 \mu\text{mol/l}$ ADP. In den Boxen (Interquartilbereiche) sind jeweils die Mediane dargestellt.

Die Normalverteilung wurde durch den Kolmogorov-Smirnov Test (KST) ermittelt. Für diesen Test wurden die Doppelmessungen pro Reagenz und Tier einzeln einbezogen ($n = 122$). Für $5 \mu\text{g/ml}$ Col wurde über den KST eine asymptotische Signifikanz von $p = 0,291$ errechnet. Die Ergebnisse bei Einsatz von $18 \mu\text{mol/l}$ ADP zeigten eine asymptotische Signifikanz von $p = 0,676$. Beide Werte sprechen für eine Normalverteilung. Der Ausreißertest nach Henry und Reed ergab keine Ausreißer (Col: Min.: 0,016949; Max.: 0,07232 /ADP: Min.: 0,01473; Max.: 0,10186). Die berechneten Referenzwerte für Kühe ab 18 Monate sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Referenzbereich, Mittelwert (\bar{X}) und Standardabweichung (SD) für die Thrombozyten-Aggregation im Multiplate®, von mit 5 µg/ml Col und 18 µmol/l ADP inkubiertem Hirudinblut bei Kühen über 18 Monate.

| | \bar{X} AUC in AU*Min | |
|----------------------------------|-------------------------|---------------|
| | 5 µg/ml Col | 18 µmol/l ADP |
| \bar{X} | 463,77 | 829,34 |
| SD | 172,08 | 239,61 |
| Referenzbereich | | |
| Untere Grenze ($\bar{X}-2*SD$) | 119,61 | 350,12 |
| Obere Grenze ($\bar{X}+2*SD$) | 807,93 | 1308,56 |

2.2.1. Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und den AUC-Werten (Units) der Thrombozytenfunktion

Der Vergleich zwischen der Thrombozytenkonzentration und den AUC-Werten zeigte für 5 µg/ml Col ($r = 0,473$; $p < 0,001$) und für 18 µmol/l ADP ($r = 0,371$; $p = 0,003$) jeweils eine geringe Korrelation. Die Zusammenhänge zwischen Thrombozytenkonzentration und Aggregationswert sind in Abbildung 21 (5 µg/ml Col) und Abbildung 22 (18 µmol/l ADP) graphisch dargestellt.

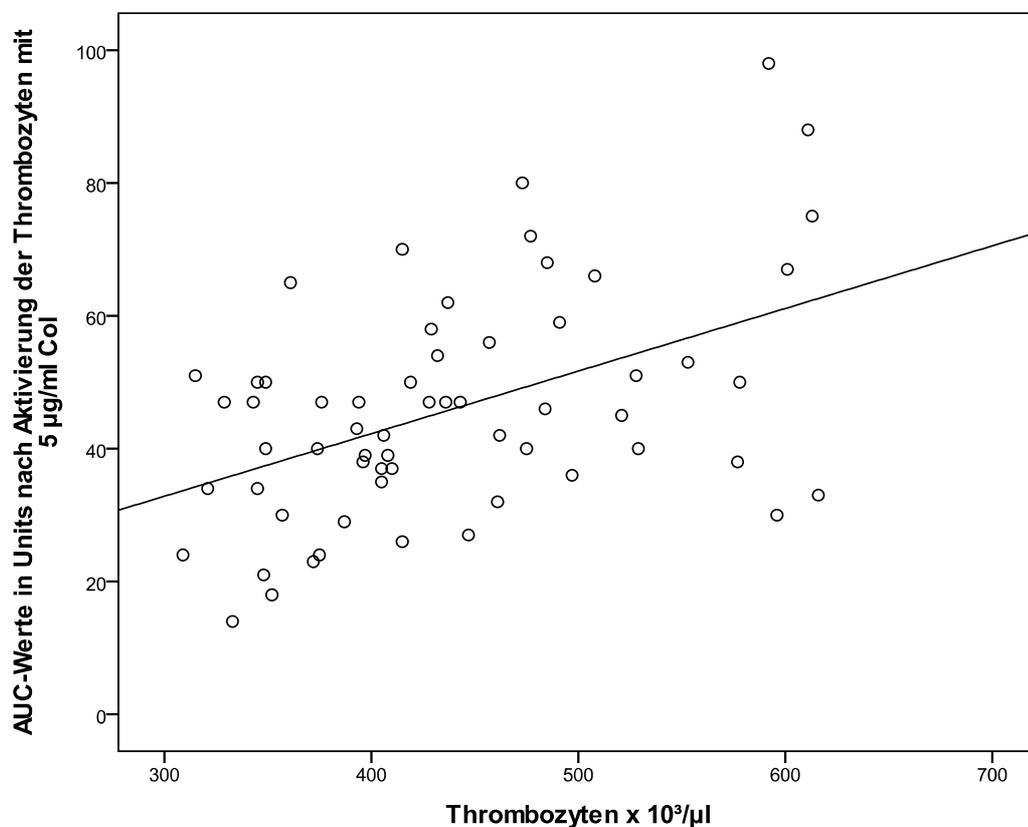


Abbildung 21: Streudiagramm mit Trendlinie für die AUC-Werte (Units) im Multiplate® in Abhängigkeit von der Thrombozytenkonzentration bei 61 Kühen, inkubiert mit 5 µg/ml Col.

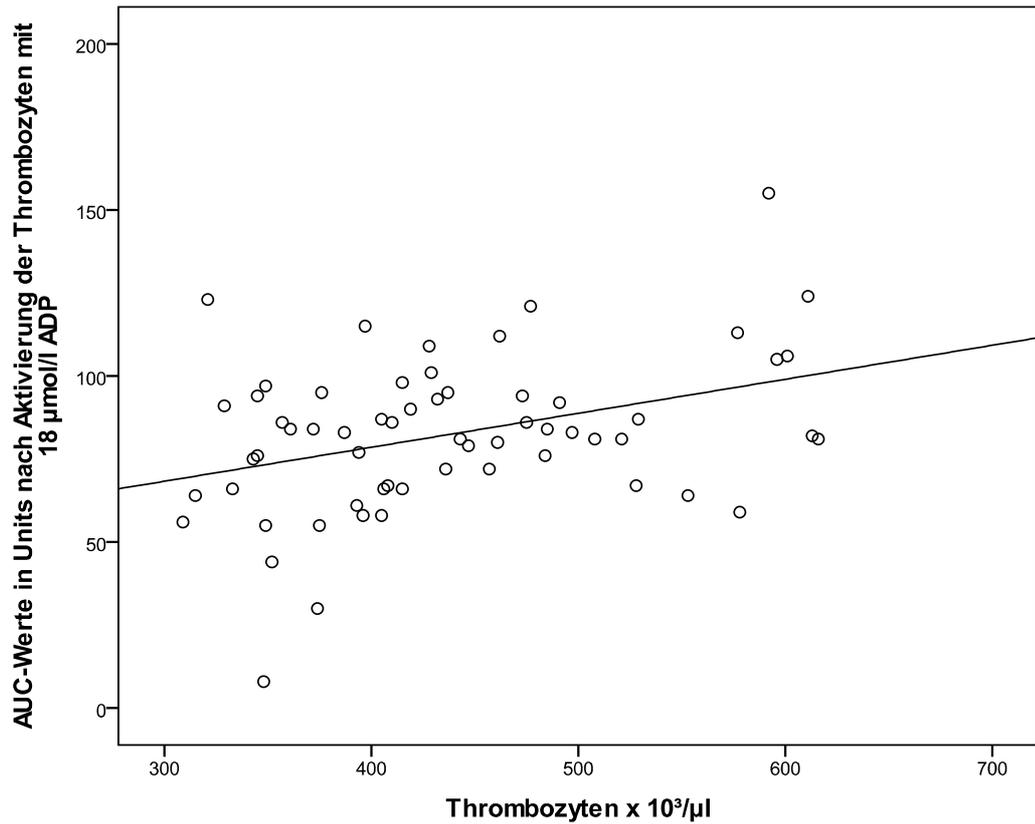


Abbildung 22: Streudiagramm mit Trendlinie für die AUC-Werte (Units) im Multiplate® in Abhängigkeit von der Thrombozytenkonzentration bei 61 Kühen, inkubiert mit 18 µmol/l ADP.

2.3. Jungrinder

In fünf verschiedenen Betrieben Oberbayerns wurden 62 Jungrinder beprobt. Bei zwei Tieren konnten die Blutproben aufgrund von Gerinnung nicht verwertet werden. Für die statistische Auswertung standen 60 weibliche Jungrinder zwischen 6 und 18 Monaten zur Verfügung, deren Thrombozytenkonzentration $> 200000/\mu\text{l}$ lag. In Abbildung 23 ist die Verteilung der AUC-Werte in Units nach Inkubation der Thrombozyten mit 5 µg/ml Col und 18 µmol/l ADP von 60 weiblichen Jungrindern dargestellt.

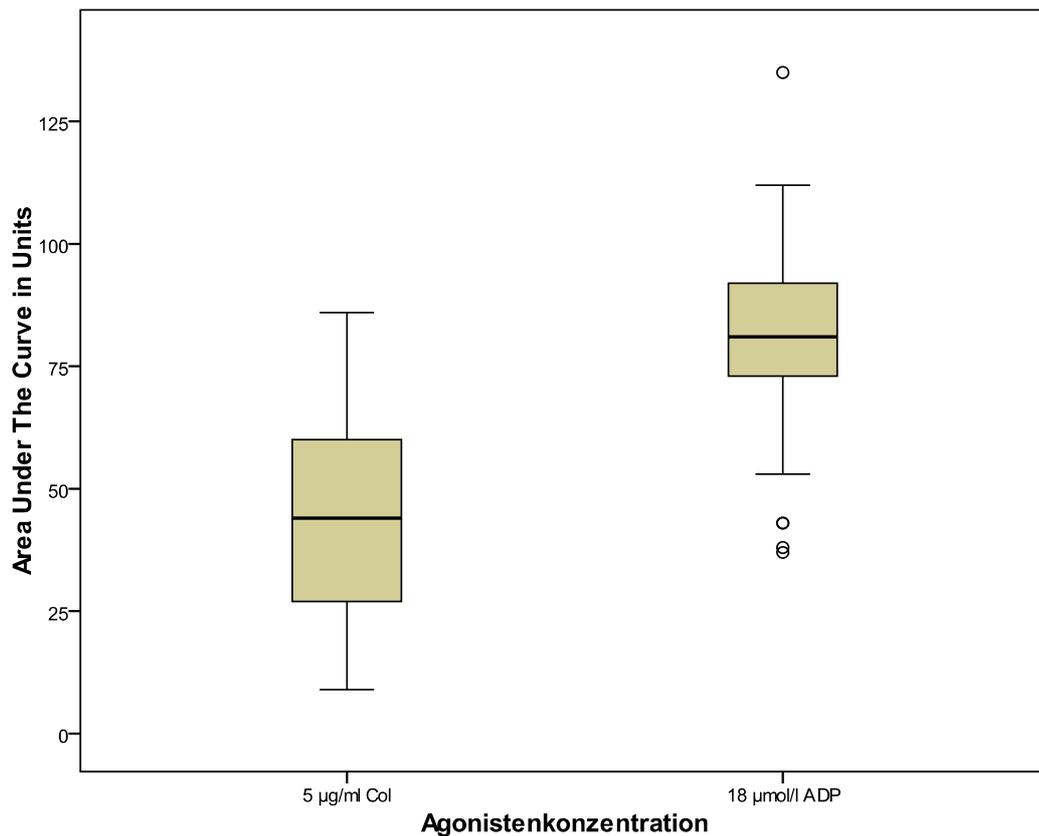


Abbildung 23: Verteilung der AUC-Werte in Units im Multiplate® von 60 Jungrindern mit einer Thrombozytenkonzentration von $> 200000/\mu\text{l}$, inkubiert mit $5 \mu\text{g/ml}$ Col und $18 \mu\text{mol/l}$ ADP. In den Boxen (Interquartilbereiche) sind jeweils die Mediane dargestellt.

Die Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Test überprüft. Dafür wurden die Doppelmessungen pro Reagenz und Tier einzeln einbezogen ($n = 120$). Der KST ergab eine Normalverteilung für $5 \mu\text{g/ml}$ Col ($p = 0,317$) und $18 \mu\text{mol/l}$ ADP ($p = 0,523$). Der Ausreißertest nach Henry und Reed ergab keine Ausreißer (Col: Min.: 0,00722; Max.: 0,11793 / ADP: Min.: 0,007387; Max.: 0,14035). Die berechneten Referenzwerte für Jungrinder zwischen 6 und 18 Monaten sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Referenzbereich, Mittelwert (\bar{X}) und Standardabweichung (SD) für die Thrombozyten-Aggregation im Multiplate®, von mit 5 µg/ml Col und 18 µmol/l ADP inkubiertem Hirudinblut bei Jungrindern zwischen sechs und 18 Monaten.

| | \bar{X} AUC in AU*Min | |
|----------------------------------|-------------------------|---------------|
| | 5 µg/ml Col | 18 µmol/l ADP |
| \bar{X} | 439,18 | 810,70 |
| SD | 193,24 | 191,05 |
| Referenzbereich | | |
| Untere Grenze ($\bar{X}-2*SD$) | 52,7 | 428,6 |
| Obere Grenze ($\bar{X}+2*SD$) | 825,66 | 1192,8 |

2.3.1. Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und den AUC-Werten (Units) der Thrombozytenfunktion

Zwischen der Thrombozytenkonzentration und den AUC-Werten besteht für 5 µg/ml Col eine geringe ($r = 0,289$; $p = 0,025$) und für 18 µmol/l ADP eine mittlere ($r = 0,509$; $p < 0,001$) Korrelation. In Abbildung 24 (5 µg/ml Col) und Abbildung 25 (18 µmol/l ADP) sind die Zusammenhänge zwischen Thrombozytenkonzentration und Aggregationswert graphisch dargestellt.

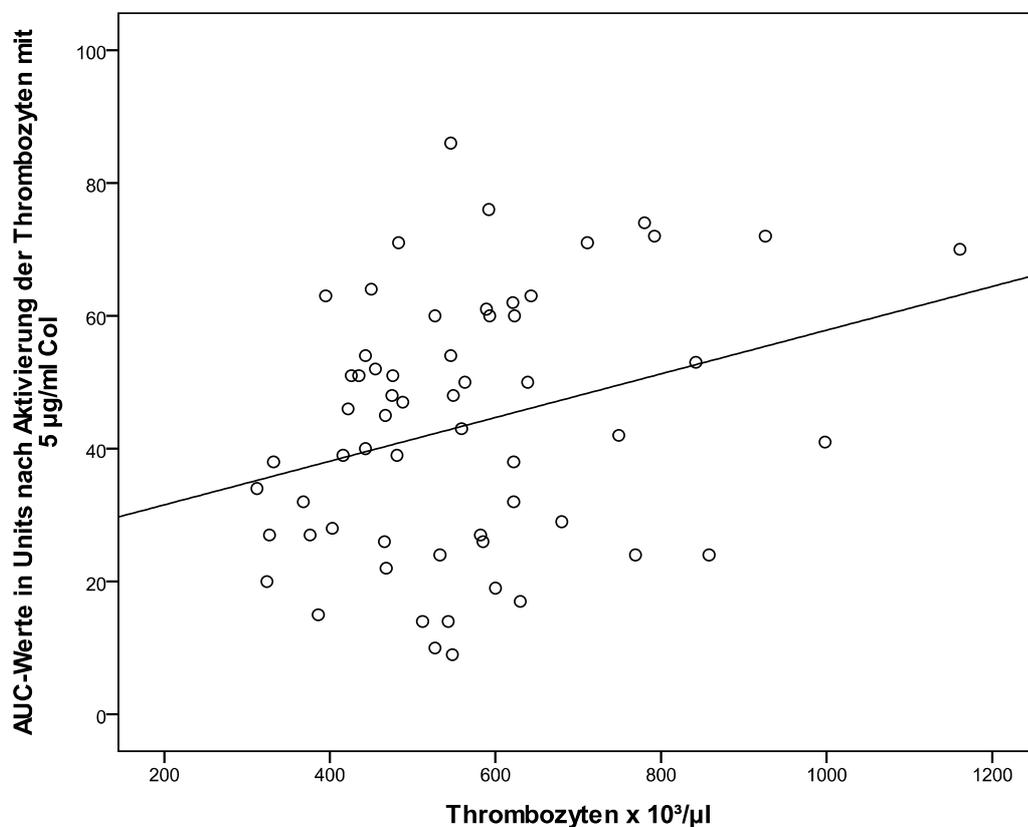


Abbildung 24: Streudiagramm mit Trendlinie für die AUC-Werte im Multiplate® in Abhängigkeit von der Thrombozytenkonzentration bei 60 Jungrindern, inkubiert mit 5 µg/ml Col.

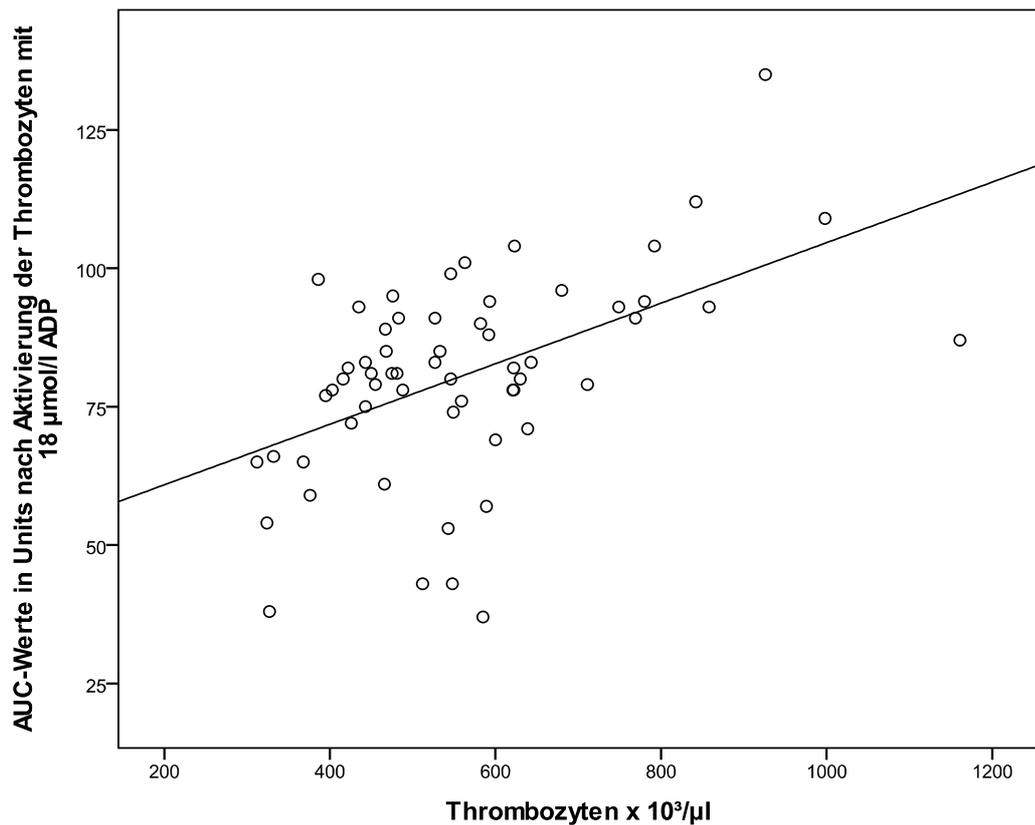


Abbildung 25: Streudiagramm mit Trendlinie für die AUC-Werte (Units) im Multiplate® in Abhängigkeit von der Thrombozytenkonzentration bei 60 Jungrindern, inkubiert mit 18 µmol/l ADP.

2.4. Vergleich der AUC-Werte der Thrombozytenfunktion (Units) von Bullen, Kühen und Jungrindern miteinander

In Abbildung 26 und Abbildung 27 sind die AUC-Werte im Multiplate® für Bullen, Kühe und Jungrinder nebeneinander aufgeführt. Die AUC-Werte variierten unter Einsatz von Col als Aktivierungsreagenz von 9 bis 76 Units bei Bullen, von 14 bis 98 Units bei Kühen und von 9 bis 86 Units bei Jungrindern. Bei Aktivierung der Thrombozyten mit ADP lagen die AUC-Werte bei Bullen zwischen 34 und 116 Units, bei Kühen zwischen 8 und 155 Units und bei Jungrindern zwischen 37 und 135 Units.

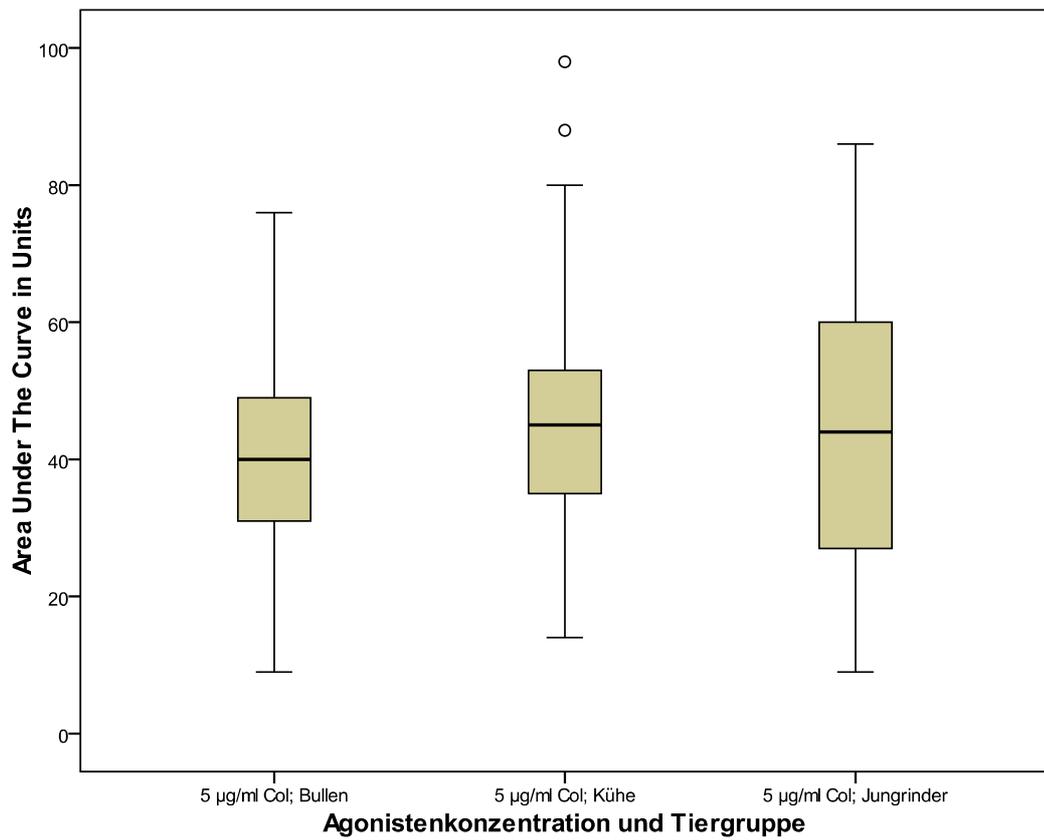


Abbildung 26: Vergleich der AUC-Werte in Units von 61 Bullen, 61 Kühen und 60 Jungrindern bei Inkubation des Hirudinblutes mit 5 µg/ml Col. In den Boxen (Interquartilbereiche) sind jeweils die Mediane dargestellt.

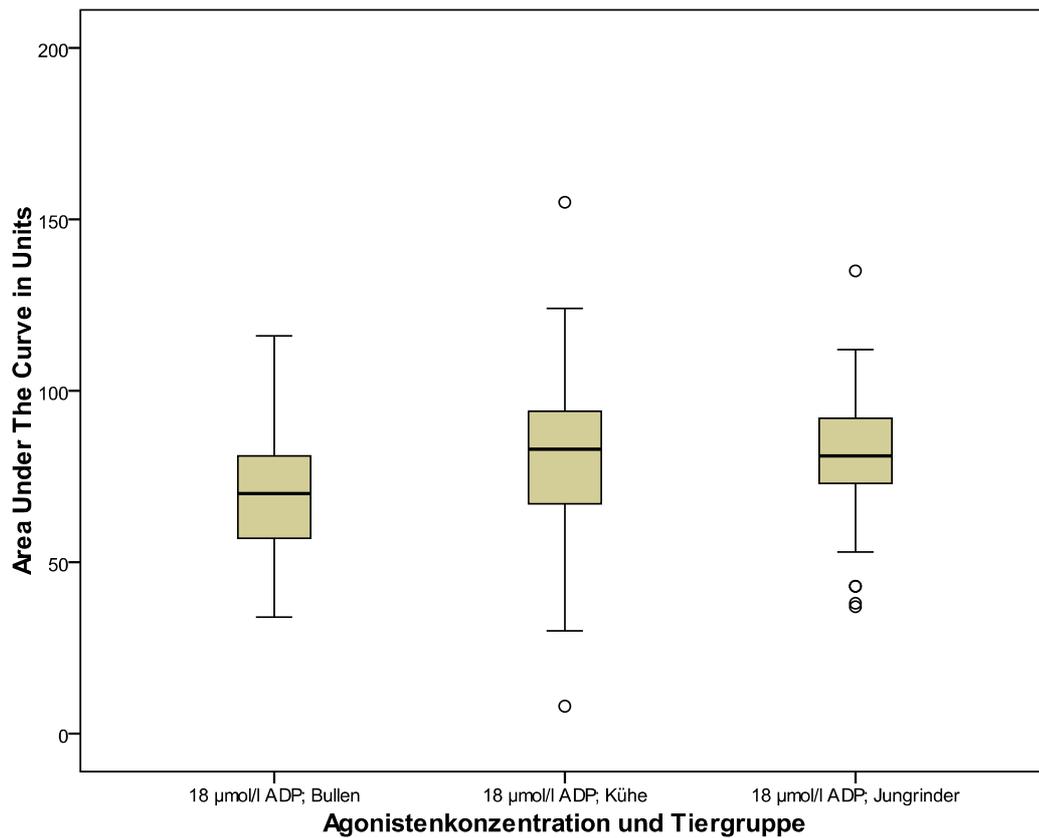


Abbildung 27: Vergleich der AUC-Werte in Units von 61 Bullen, 61 Kühen und 60 Jungrindern bei Inkubation des Hirudinblutes mit 18 µmol/l ADP. In den Boxen (Interquartilbereiche) sind jeweils die Mediane dargestellt.

2.5. Vergleich der Referenzbereiche für das Multiplate®-Impedanzaggregometer bei Bullen, Kühen und Jungrindern in Abhängigkeit der Aktivierungsreagenzien Col (5 µg/ml) und ADP (18 µmol/l)

Die Referenzbereiche vom Multiplate®-Impedanzaggregometer liegen unter Verwendung von Col (5 µg/ml) bei Bullen zwischen 117,82 und 705,78 AU*Min, bei Kühen zwischen 119,61 und 807,93 AU*Min und bei Jungrindern zwischen 52,7 und 825,66 AU*Min (Abbildung 28). Bei Aktivierung der Thrombozyten mit ADP (18 µmol/l) errechnet sich ein Referenzbereich von 324,99 bis 108,23 AU*Min für Bullen, eine Spanne von 350,12 bis 1208,56 AU*Min für Kühe und ein Intervall von 428,6 bis 1192,8 AU*Min für Jungrinder (Abbildung 29).

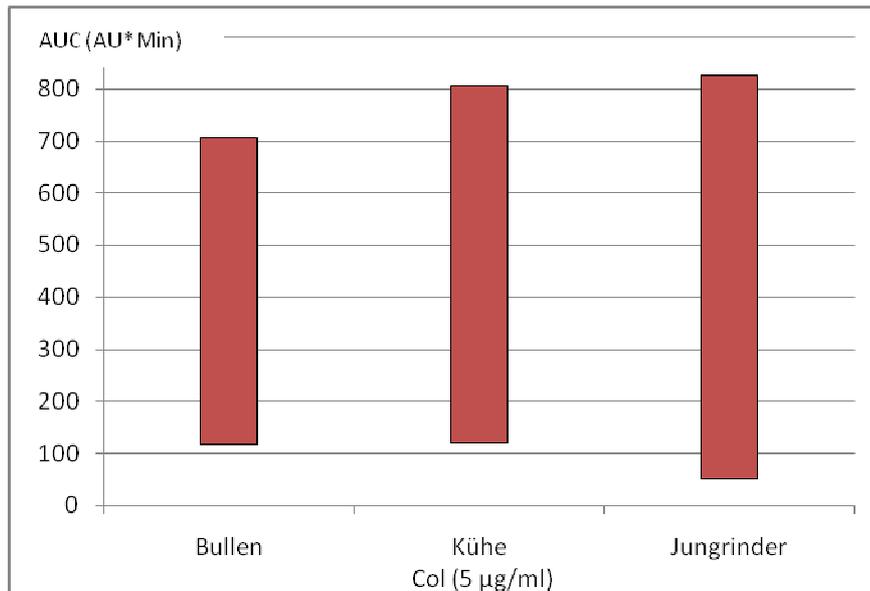


Abbildung 28: Vergleich der Referenzwerte für das Multiplate®-Impedanzaggregometer bei Bullen, Kühen und Jungrindern bei der Verwendung von Col (5 µg/ml) als Aktivierungsreagenz.

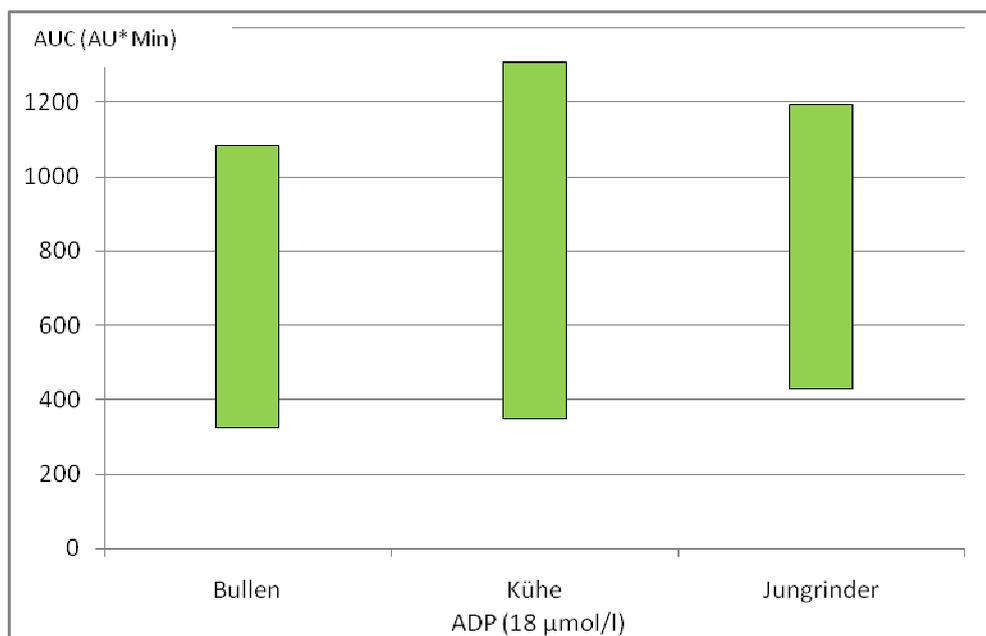


Abbildung 29: Vergleich der Referenzwerte für das Multiplate®-Impedanzaggregometer bei Bullen, Kühen und Jungrindern bei Verwendung von ADP (18 µmol/l) als Aktivierungsreagenz.

2.6. Vergleich der Thrombozytenkonzentrationen von Bullen, Kühen und Jungrindern miteinander

Die Thrombozytenkonzentration streute innerhalb der einzelnen Gruppen in mehr oder weniger großen Bereichen. Bei den Bullen (n=61) bewegte sich die

Thrombozytenkonzentration in einem Bereich von 153 bis 611×10^3 Thrombozyten/ μl . Die Thrombozytenwerte der Kühe ($n=61$) lagen zwischen 309 und 616×10^3 Thrombozyten/ μl . Bei den Jungrindern ($n=60$) wurden Werte zwischen 312 und 1161×10^3 Thrombozyten/ μl gemessen. In Abbildung 30 sind die Thrombozytenkonzentrationen ($\times 10^3/\mu\text{l}$) von Bullen, Kühen und Jungrindern nebeneinander in Boxplots dargestellt.

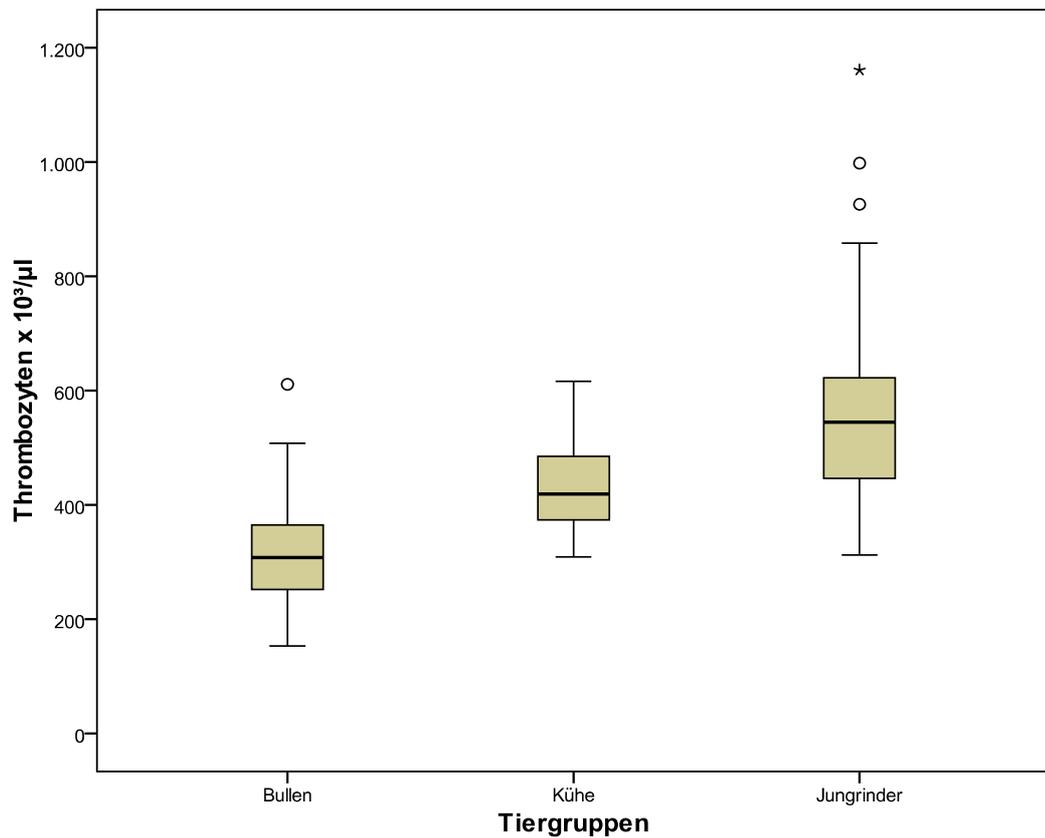


Abbildung 30: Vergleich der Thrombozytenkonzentration ($\times 10^3/\mu\text{l}$) von 61 Bullen, 61 Kühen und 60 Jungrindern. In den Boxen (Interquartilbereiche) sind jeweils die Mediane dargestellt. Die Kreise stellen Ausreißer und das Sternchen einen Extremwert dar.

V. DISKUSSION

1. Tierauswahl

In der Literatur wurde der Verdacht der erblich bedingten Thrombozytopathie (HTS) bisher nur beim Simmental-Rind bzw. beim Fleckvieh beschrieben (SEARCY und PETRIE, 1990; SEARCY et al., 1990; STEFICEK et al., 1993a; STEFICEK et al., 1993b). Eine Thrombozytenfunktionsstörung konnte auch bei Rindern der Rassen Japanese Black, Hereford und Brangus beschrieben werden (PADGETT et al., 1964; AYERS et al., 1988; OGAWA et al., 1997). Diese beruhte jedoch auf einem Speicherdefekt der δ -Granula und wurde dem CHS zugeordnet. Tiere mit Thrombozytopenie wurden ausgeschlossen, da die Thrombozytenkonzentration bei der HTS inner- oder oberhalb des derzeit anerkannten Referenzbereiches von 200000/ μ l - 800000/ μ l (STÖBER und GRÜNDER, 1990) liegt (SEARCY und PETRIE, 1990). Außerdem lösen niedrige Thrombozytenkonzentrationen nur geringe Spannungsänderungen am Meßdraht aus und führen somit zu falsch negativen Ergebnissen. Unsere Untersuchungen auf eine Thrombozytenfunktionsstörung beschränkten sich daher auf Tiere mit Blutungsneigung der Rasse DFV und einer Thrombozytenkonzentration inner- oder oberhalb des Referenzbereiches.

2. Multiplate®-Untersuchungen

Für die Untersuchung der Thrombozytenfunktion am Multiplate®-Impedanzaggregometer kann eine Vollblutprobe mit Hirudin als Antikoagulanzen verwendet werden. Das erleichtert die Probenbearbeitung vor der Messung wesentlich im Vergleich zu vorhergehenden Untersuchungsmethoden. WEISSER et al. (2010) bemängelten die von ihnen durchgeführte Thrombozytenfunktionsprüfung nach der Methode von Born (1962), da die aufwändige Probenbearbeitung vor der Messung nicht praxistauglich sei. Vor der Aggregationsprüfung musste aus den Vollblutproben plättchenreiches Plasma gewonnen werden, das daraufhin mit plättchenarmen Plasma auf bestimmte Thrombozytenkonzentrationen verdünnt wurde. Dazu waren entsprechend qualifizierte Labors notwendig. Mit der Untersuchung am Impedanzaggregometer kann die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten hingegen mit Vollblut erfasst

werden (TOTH et al., 2006). Für die Thrombozytenfunktionsdiagnostik am Multiplate® stehen verschiedene Aktivierungsreagentien zur Verfügung, mit denen Rezeptordefekte oder Defekte in der Signaltransduktionskaskade in den Thrombozyten aufgedeckt werden können (CALATZIS et al., 2006). Untersuchungen von SOLOVIEV et al. (1999) ergaben, dass beim Rind nur ADP, Col und Thrombin eine Aggregationsantwort auslösen können. Andere Autoren bestätigten, dass ADP und Col in der Lage sind, Thrombozyten in Schaf- und Rinderblut zu aktivieren (BAUMGARTEN et al., 2009; HUBER, 2012). Bei einer Thrombozytenfunktionsstörung aufgrund der HTS unterbleibt trotz Aktivierung der Blutplättchen mit ADP und Col eine Aggregation in den Messzellen des Multiplate®-Gerätes. Die Widerstandsänderung zwischen den einzelnen Sensordrähten unterbleibt (CARDINAL und FLOWER, 1980). Die AUC-Werte, die die Gesamtaktivität der Blutplättchen ausdrücken (MARSCHNER et al., 2012), liegen dann entsprechend bei Null oder im unteren Bereich. Optisch wird das durch eine Null-Linie oder eine nur sehr flache Kurve im Graphen auf dem Bildschirm des Messgerätes dargestellt (Abbildung 31). Alle Verdachtstiere, die zum Zeitpunkt der Untersuchung noch lebten und eine Thrombozytenkonzentration von $> 200000/\mu\text{l}$ aufwiesen, wurden mittels dieser Thrombozytenfunktionsmessung auf eine Thrombozytopathie untersucht. Nur die Impedanzaggregometrie ermöglicht eine gesicherte Diagnose einer Thrombozytenfunktionsstörung (WEISSER et al., 2010).

Die Hersteller des Multiplate®-Systems empfehlen zur Blutabnahme Röhrchen mit Thrombininhibitoren (z.B. Hirudin), da diese, im Gegensatz zu Citrat oder EDTA, weder die Thrombozytenfunktion, noch die Kalziumkonzentration im Blut beeinflussen (GLUSA und MARKWARDT, 1990). Für unsere Messungen setzten wir Hirudinröhrchen ein, da Hirudin im Vergleich zu Citrat bei ADP und Col eine stärkere Aggregation der Thrombozyten auslöst (WALLEN et al., 1997) und somit der Unterschied der Messergebnisse zwischen gesunden Tieren und den Tieren mit Thrombozytenfunktionsstörung deutlicher war. Eine aktuellere Studie belegt, dass - bei Hundeblood - Hirudin im Vergleich zu Heparin eine höhere Autokoagulationsneigung des Vollblutes bewirkt (MARSCHNER et al., 2012). In Anlehnung an eine Dissertation, bei welcher Impedanzmessungen bei Rindern durchgeführt worden waren, wurde dennoch Hirudin als Antikoagulanz verwendet, da es sich als sehr geeignet erwies (HUBER, 2012).

Die Reagenzien ADP und Col sind nach Angaben des Herstellers nach dem Anmischen nur eine begrenzte Zeit haltbar (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Beide Reagenzien sind nach dem Anmischen bei einer Temperatur von 2 - 8°C innerhalb einer Woche zu verbrauchen, ADP hält sich bei einer Temperatur von -18°C 4 Wochen lang. Col soll nach Herstellerangaben nicht gefroren werden. Ein Wirkungsverlust der Agonisten spiegelte sich in niedrigen oder AUC-Werten von Null wider. Um der Gefahr von falsch negativen Messergebnissen zu entgehen, wurde bei jeder Messung parallel eine Kontrollprobe untersucht (Abbildung 31). Diese stammte jeweils von Tieren, die in Bezug auf Blutungsneigung klinisch unauffällig waren und deren Thrombozytenkonzentration im Referenzbereich lag. Durch die Kontrollen konnten gleichzeitig andere Messfehler ausgeschlossen werden, die durch zu niedrige Blocktemperaturen oder verunreinigte NaCl-Lösung entstehen können. Falsch negative Messergebnisse können auch entstehen, wenn das Blut im Hirudinröhrchen geronnen ist. Die Thrombozyten befinden sich dann in den Aggregaten und der Teil des Blutes, der für die Thrombozytenfunktionsmessung pipettiert wird, enthält nur noch eine sehr niedrige Konzentration an Blutplättchen. Die Folge ist ein niedriger AUC-Wert. Um dieses Risiko zu minimieren, wird vor jeder Pipettierung auf bestehende Aggregate im Röhrchen geachtet und die Probe gegebenenfalls verworfen. Eine Gerinnungsbildung kann von unzureichender Durchmischung des Blutes mit dem Antikoagulant herrühren, weshalb die Röhrchen nach der Blutabnahme mindestens zweimal über Kopf geschwenkt werden sollten (Herstellerinformation: Verum Diagnostica GmbH, München). Weitere Ursachen einer vorzeitigen Gerinnung können ein durch Hitze deaktivierter Thrombininhibitor (Hinweis des Herstellers: Lagerung der Röhrchen zwischen 2 – 8 °C, Vermeidung von direkter Sonneneinstrahlung) oder eine fehlerhafte Blutentnahme sein. Grundsätzlich soll das Hirudin-Aufziehröhrchen erst dann auf die Kanülen-Infusionsschlauch-Steckverbindung aufgesetzt werden, wenn die Kanüle gut in der Vene des Tieres liegt und ein kontinuierlicher Blutfluss aus der Kanüle besteht.

Die Messzeit am Gerät von 6 Minuten basiert auf den Ergebnissen der Dissertation von HUBER (2012). Eine vorhergehende Studie empfiehlt bei Verwendung von Hirudin als Antikoagulant und Stimulierung der Blutplättchen mit ADP ebenso eine Messdauer von 6 Minuten, da sich bei längeren

Einwirkzeiten eine deutliche Überschneidung zwischen Puffer- und Agonistenaktivierung der Thrombozyten abzeichnet (MARSCHNER et al., 2012). Die Diagnose Thrombozytenfunktionsstörung kann mittels der Impedanzmessung ohne großen Aufwand in sehr kurzer Zeit gestellt werden. Allerdings sollte das Hirudin-Blut innerhalb von drei Stunden untersucht werden, da es sonst zu signifikanten Abweichungen innerhalb der Messwerte kommen kann (KAISER et al., 2011). TOTH et al. (2006) stellten keine Unterschiede bei der Impedanzmessung fest, wenn die Messung zwischen 30 Minuten und 240 Minuten nach der Blutentnahme erfolgte. Eine andere Studie konnte innerhalb der AUC-Werte bei Messungen zwischen 0,5 Stunden und 5 Stunden nach der Blutentnahme keine signifikanten Unterschiede vermerken (SEYFERT et al., 2007). Wir hielten einen maximalen Abstand von 3 Stunden zwischen Blutentnahme und Untersuchung am Multiplate® ein.

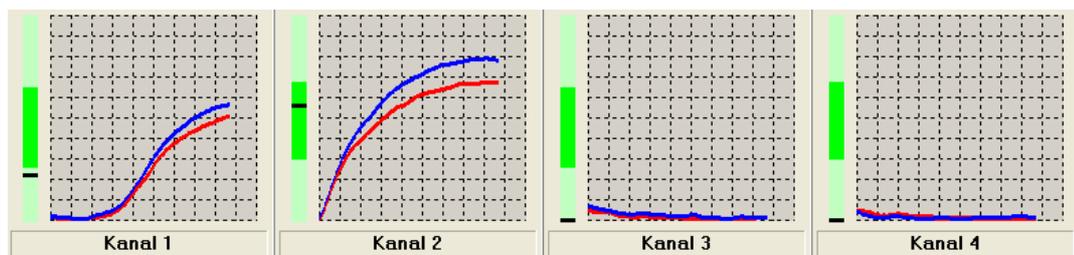


Abbildung 31: Graphische Darstellung einer Multiplate®-Messung. Kanal 1 + 2: Impedanzanstieg nach Aktivierung der Thrombozyten eines Kontrolltieres mit ADP bzw. Col. Kanal 3 + 4 zeigen eine fehlende Aggregation der Thrombozyten eines HTS-Tieres bei Aktivierung mit ADP bzw. Col. Die rote und die blaue Kurve basieren auf Messungen, die unabhängig voneinander innerhalb einer Messzelle erfasst worden sind.

3. Genetische Untersuchung

Einer Thrombozytenfunktionsstörung können verschiedene Ursachen zugrunde liegen, die sowohl erblich bedingt, als auch erworben sein können (SCHARF, 2003). Ein erblicher Defekt der Thrombozytenaggregation bei Simmental-Rindern wurde erstmals im nordamerikanischen Raum vermutet (SEARCY et al., 1990; STEFICEK et al., 1993b). Für diese Thrombozytenfunktionsstörung wird eine Punktmutation im Exon 7 des *RasGRP2*-Gens verantwortlich gemacht, die zu einem nicht synonymen Aminosäureaustausch (Leucin zu Prolin) führt und damit vermutlich zu einer veränderten Proteinfunktion (BOUDREAUX et al., 2007). Mittels einer genomweiten Assoziationsstudie der klinisch und labordiagnostisch auffälligen Tiere durch den Lehrstuhl für Tierzucht der TUM konnte eine

genomische Region auf Chromosom 29 identifiziert werden, die signifikant mit dem Phänotyp assoziiert ist. Diese genomische Region besteht aus einem 2,1 Mb langen homozygoten Bereich und enthält ungefähr 70 Gene (JUNG, 2013), darunter auch *RasGRP2*, welches als Ursache der erblichen Blutgerinnungsstörung angegeben wurde (BOUDREAUX et al., 2007). *RasGRP2* ist ein wichtiges Signaltransduktionsprotein, das über *Rap1b* die Affinität von GPIIb/IIIa moduliert und darüber zur Thrombozyten-Fibrinogen-Interaktion beiträgt (BERTONI et al., 2002). FROJMOVIC et al. (1996) machten das DARE-Syndrom, das mit einer verzögerten GPIIb/IIIa-Rezeptor-Expression auf der Thrombozytenoberfläche einhergeht, für die Blutungsneigung bei Rindern verantwortlich. Die Beteiligung des *RasGRP2*-Gens an der HTS ist demnach hoch wahrscheinlich. Das Ergebnis der am Lehrstuhl für Tierzucht der TUM durchgeführten genomweiten Assoziationsstudie führt zur Annahme, dass es sich bei dem erblichen Defekt um einen einfachen rezessiven Erbgang handeln könnte. Das steht im Widerspruch zu den Kreuzungsexperimenten durch MAPLETOFT et al. (2000), die von einem Zusammenspiel von mindestens zwei veränderten Genen ausgehen, die zu dem Krankheitsbild der HTS führen. Regelmäßige Thrombozytenfunktionstests an klinikeigenen, von HTS betroffenen Tieren und Nachuntersuchungen an schon bekannten Tieren mit HTS, weisen auf das dauerhafte Vorhandensein einer Thrombozytenfunktionsstörung hin. Dies spricht ebenso für ein genetisch bedingtes Krankheitsgeschehen. Bislang wurde die HTS keiner Kategorie bezüglich der Lokalisation der Veränderung am Thrombozyten zugeordnet. Sofern die Expression oder die Affinität der GP I Ib/IIIa-Rezeptoren auf den Thrombozyten durch die HTS tatsächlich beeinträchtigt werden, könnte die HTS zukünftig den Rezeptorglykoproteindefekten zugeordnet werden. Erbliche Thrombozytopathien, die auf Rezeptorglykoproteindefekten beruhen, wurden bislang nicht bei Rindern beschrieben. Eine weitere Thrombozytopathie, die bei Rindern festgestellt werden konnte, ist das CHS, welches zur Gruppe der Speichergranuladefekte gehört. In Japanese Black Rindern wurde eine Mutation im *CHSI*-Gen auf Chromosom 28 als mögliche Ursache für das CHS beschrieben (YAMAKUCHI et al., 2000). Thrombozytenfunktionsstörungen können daneben durch Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen innerhalb des Genoms ausgelöst werden.

4. Phänotyp

Die Beschreibung des Phänotyps basiert auf den Untersuchungen der 44 Falltiere, bei denen sowohl die Impedanzmessung, als auch die genetische Untersuchung für eine Hereditäre Thrombozytopathie Simmentaler Rinder sprechen. Aus diesem Grund werden Differentialdiagnosen zu den einzelnen Symptomen nicht berücksichtigt. Vielmehr wollen wir einen Überblick über die verschiedenen Arten von Blutungen geben, die Anzeichen auf das Vorliegen der HTS sein können. Die im Anschluss beschriebenen Symptome können sowohl einzeln, als auch in Kombination auftreten. Auffällig und den Verdachtstieren gemeinsam ist, dass ihr Allgemeinbefinden nahezu ungestört ist, außer wenn der Blutverlust zu einer entsprechenden Anämie geführt hat.

4.1. Klinische Symptome

4.1.1. Hautblutungen

Das am häufigsten beobachtete Symptom der HTS war die Hautblutung, die entweder (vermeintlich) spontan auftrat oder durch Maßnahmen wie Ohrmarkeneinziehen oder Injektionen ausgelöst wurde. Die Blutungen hielten oft einige Stunden bis Tage an und kamen nur einmalig oder wiederholt zum Vorschein. Der Grad der Hautblutung wurde schnell überbewertet, da das Blut beim Austreten mit dem Fell verklebte und teilweise großflächige Verkrustungen hinterließ. Nähere Begutachtung der Blutaustrittsstellen der Haut klinikeigener, von HTS betroffener Tiere, ergab, dass das Blut durch makroskopisch nicht sichtbare Läsionen sickert. Sofern es sich um spontane Hautblutungen handelte, waren auf der Haut keine Veränderungen hinsichtlich Schwellung, Verletzung oder Hämatombildung zu erkennen. Eines der klinikeigenen Tiere mit HTS blutete bei Verabreichung subkutaner Injektionen verstärkt nach. Dies scheint einerseits nicht verwunderlich, da es sich bei dieser Krankheit um eine dauerhafte Thrombozytenfunktionsstörung handelt. Demgegenüber steht jedoch die Tatsache, dass keines der Tiere, das bei der Blutprobenentnahme intravenös an der Vena jugularis beprobt worden war, nachblutete. Die spontanen Hautblutungen traten vermehrt an Ohren (8/31), Rücken (14/31) oder Schulterpartie (6/31) auf. Bisher gibt es keine Publikation zu dem Krankheitsbild der HTS, in der die Lokalisationen der Hautblutungen näher beschrieben sind. Es ist durchaus möglich, dass die Hautstruktur der verschiedenen Hautareale bei der Entstehung

spontaner Hautblutungen eine Rolle spielt.

4.1.2. Blutbeimengungen im Kot

Blutbeimengungen im Kot waren recht häufig zu beobachten (12/44). Nach Beschreibung der Landwirte, Hoftierärzte und auch nach unseren Untersuchungen an unseren klinikeigenen Tieren variierte die Blutmenge im Kot von geringgradigen bis hochgradigen Blutbeimengungen. Alle betroffenen Tiere befanden sich im Alter von unter 8 Wochen. Bisher wurde das Symptom „Blutbeimengungen im Kot“ nur von WEISSER et al. (2010) beschrieben. Seine Patientin zeigte dieses Symptom allerdings erst spät („während der weiteren Lebensjahre“). Andere Autoren sprechen von hochgradigen intraluminalen Blutungen im Darmtrakt, die im Rahmen einer Sektion entdeckt worden sind (SEARCY und PETRIE, 1990). Die Pathogenese ist bisher noch nicht beschrieben worden. Ein Zusammenhang zwischen Alter der Rinder mit HTS und dem Auftreten des Symptoms blutiger Kot, kann aufgrund der niedrigen Fallzahl nicht bewiesen werden, scheint aber möglich. Eine Ursache kann darin bestehen, dass die Darmschleimhaut bei Kälbern vermutlich empfindlicher ist, als die heranwachsender oder ausgewachsener Rinder. Kleinste Irritationen könnten daher zu Blutungen führen, die aufgrund der Gerinnungsstörung länger anhalten und dadurch erst auffällig werden. Eine weitere Erklärung bestünde darin, dass Kälber häufig mit Erregern zu kämpfen haben, die Neugeborenenendurchfall oder Kokzidiosen verursachen. Unabhängig davon, ob die Besiedlung der Erreger im Darm bei dem betroffenen Tier zu Durchfall führt, kann es zu Entzündungen der Darmschleimhaut kommen. Die dadurch bedingte Irritation des Gewebes und erhöhte Durchlässigkeit der Gefäße im Zusammenspiel mit der begrenzten Gerinnungsaktivität, könnten ebenso zu anhaltenden Blutungen im Darmbereich führen.

4.1.3. Nasenbluten

Epistaxis wurde neben den Hautblutungen schon in verschiedenen Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der Thrombozytopathie Simmentaler Rinder beschrieben (LEIPOLD und MOORE, 1977; SEARCY und PETRIE, 1990). SEARCY und PETRIE (1990) halten sehr kaltes Wetter für einen möglichen Auslöser massiven Nasenblutens bei Tieren mit HTS, da an kalten Tagen auch bei „gesunden“ Rindern Nasenbluten auftreten kann. Im Gegensatz zu

den Tieren mit intakter Blutgerinnung, hält das Nasenbluten bei Rindern mit HTS entsprechend länger an. Die geringe absolute Luftfeuchtigkeit bei niedrigen Temperaturen kann die Nasenschleimhaut austrocknen. Dadurch entstehende Gewebsläsionen oder entzündliche Reaktionen der Nasenschleimhaut können die Gefäße innerhalb der Nasenschleimhaut negativ beeinträchtigen und zu Nasenbluten führen. Zwei unserer fünf Falltiere zeigten Nasenbluten in den Wintermonaten (November, Januar), bei drei Tieren trat das Symptom zwischen April und September auf. Wir konnten demnach keinen offensichtlichen Zusammenhang zwischen Jahreszeit und Auftreten des Symptoms Nasenbluten erkennen. SEARCY und PETRIE (1990) ließen eine pathologische Untersuchung von einem Tier durchführen, das aufgrund hochgradiger Epistaxis euthanasiert werden musste. Es waren Blutungen zu finden, die aus Trachea und Bronchien stammten. Die genaue Ursache dieser Blutungen konnte selbst mittels Sektion und histologischer Untersuchungen der Bronchien und des Lungengewebes nicht identifiziert werden.

4.1.4. Hämatome

Die Größe und Lokalisation der Hämatome gestaltete sich sehr variabel. Halshämatome, Hämatome durch intramuskuläre Injektionen oder stumpfe Traumata ausgelöst oder intraabdominale Hämatome (Sektionsbericht) waren bei unseren Falltieren vertreten. SEARCY und PETRIE (1990) berichteten von einem zweijährigen weiblichen Fleckviehrind, das aufgrund ständig auftretenden Hämatomen euthanasiert werden musste. STEFICEK et al. (1993a) beschrieben eine Fleckviehkuh, die post partum massive innere Hämatome entwickelte. Die Sektion eines unserer klinikeigenen Tiere (ID_100) mit nachgewiesener HTS ergab massive Einblutungen, die rechtsseitig flächig von Bauch- bis Brustwand zogen, einschließlich eines fußballgroßen intraabdominalen Hämatoms. Es ist anzunehmen, dass die hochgradigen Blutverluste aus dem Gefäßsystem für den Tod durch Herz-Kreislaufversagen verantwortlich waren. Es besteht der Verdacht, dass die massiven Hämatome mittelbare Todesursache waren. Der Sektionsbericht konnte diesen Verdacht nicht bestätigen. Die massive Hämatombildung bei den Tieren mit HTS ist mit der Thrombozytenfunktionsstörung zu begründen. Den Thrombozyten fehlt die Fähigkeit im Rahmen der Hämostase verletzte Gefäße unverzüglich zu verschließen. Übermäßiger Blutverlust ist die Folge.

4.1.5. Weitere Symptome

Weitere klinische Anzeichen waren subsklerale Blutungen, Petechien und Anämie, als Folge des Blutverlustes. Obgleich eine klinische Anämie nur bei fünf Tieren beobachtet wurde, konnten über das Blutbild 20 Tiere mit einem Hämatokrit unter dem Referenzbereich von 28 % ermittelt werden (Referenzbereich bei DFV nach SATLER (2011): 28 – 45 %). Niedrige Hämatokritwerte gaben einen Hinweis auf chronischen Blutverlust. Eines der klinikeigenen Tiere (ID_100) ist mit hoher Wahrscheinlichkeit an den Folgen kontinuierlichen Blutverlustes verendet (fußballgroßes Hämatom im Bauchraum). Da dessen Tod sehr unvermittelt auftrat, liegt kein dem Todestag zeitnahes Blutbild vor. Bei der letzten durchgeführten Messung (6 Wochen vor dem Tod), hatte das Tier einen Hämatokrit von 27,2 %. Zudem zeigte es sich seit der Einstellung an der Klinik (3,5 Monate lang) mit blassem Flotzmaul. Im Gegensatz zu den klinischen Befunden an unseren Falltieren soll sich die Blutungsneigung nach Besitzerauskunft bei einem Tier einer anderen Studie auch in Form von Hämaturie geäußert haben. Dieses Symptom konnte am Western College of Veterinary Medicine, wohin das Tier überwiesen worden war, während dessen Aufenthaltes nicht beobachtet werden. Das Tier musste letztlich wegen massiver Hämatoeme euthanasiert werden (SEARCY und PETRIE, 1990).

4.2. Labordiagnostik

Die Hereditäre Thrombozytopathie Simmentaler Rinder ist auf zellulärer Ebene durch eine Funktionsstörung der Thrombozyten charakterisiert. Blutuntersuchungen von klinisch auffälligen Tieren schlossen eine Thrombozytopenie und Störungen im plasmatischen Gerinnungssystem aus (SEARCY und PETRIE, 1990; STEFICEK et al., 1993b; WEISSER et al., 2010). Die Thrombozytenkonzentration der ausgewählten 44 Falltiere lag jeweils oberhalb der unteren Referenzschwelle von 200000/ μ l. Die Blutungsneigung konnte infolgedessen nicht mit einer Thrombozytopenie begründet werden. Die Störung der Thrombozyten musste demnach qualitativen Ursprungs sein und geht entweder mit reduzierter oder fehlender Plättchenfunktion einher. Mehrere Arbeitsgruppen, denen sowohl die Licht- als auch Transmissions-Elektronen-Mikroskopie zur Verfügung standen, konnten keine ultrastrukturellen Unterschiede in der Morphologie zwischen ruhenden Thrombozyten gesunder und betroffener Rinder entdecken (STEFICEK et al., 1993a; SEARCY et al., 1994;

WEISSER et al., 2010). Im aktivierten Zustand schienen Blutplättchen betroffener Tiere - verglichen mit denen gesunder Tiere - jedoch eine abweichende Anordnung der Zytoskelettkomponenten zu tragen (SEARCY et al., 1994). Eine später erschienene Veröffentlichung konnte diesen Verdacht nicht bestätigen (CRITTENDEN et al., 2004). Aufgrund fehlender Ausstattung und begrenzter finanzieller Mittel konnten im Rahmen dieser Dissertation keine ultrastrukturellen Untersuchungen an HTS-Thrombozyten durchgeführt werden. Morphologische Untersuchungen mit der heute zur Verfügung stehenden Labortechnik könnten durchaus weiterführende Ergebnisse bringen.

4.3. Multiplate®-Ergebnisse

Die Thrombozyten von 41 Falltieren reagierten bei Stimulation mit Kollagen mit fehlender oder schwacher Aggregation. Beim Blut von 3 Tieren konnte eine ungestörte Aggregation ausgelöst werden. Im Vergleich dazu konnte nach Stimulation der Thrombozyten mit ADP bei keinem Tier eine Aggregation ausgelöst werden.

In vitro Tests in der Vergangenheit bestätigten eine abnorme Plättchenaggregation bei Tieren mit HTS. Die Thrombozyten klinisch gesunder Tiere reagierten unter Zugabe ausgewählter Gerinnungsaktivatoren (Col, ADP) mit einer Aggregation, wohingegen eine Aggregation der Thrombozyten bei Tieren mit Verdacht auf HTS ausblieb (SEARCY und PETRIE, 1990). WEISSER et al. (2010) konnten dieses Phänomen 20 Jahre später an einem DFV-Kalb bestätigen. Die Messungen im Multiplate®-Gerät bei Einsatz von Col zeigten durchschnittlich weitaus höhere AUC-Werte für das einzelne kranke Tier, als bei Verwendung von ADP. Demzufolge scheint ADP das bessere Reagenz zu sein, um eine sichere Aussage über das Bestehen der HTS zu treffen. Offensichtlich kommt der genetische Defekt auch auf zellulärer Ebene in unterschiedlicher Ausprägung zum tragen. Die Frage, warum manche Tiere (3/44), die nachweislich von diesem Gendefekt betroffen sind, aber dennoch mit einer unauffälligen Aggregation bei Stimulation mit Col reagieren, konnte innerhalb dieser Dissertation nicht geklärt werden. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass der Aktivierungsweg über die ADP-Rezeptoren vollständig beeinträchtigt ist, Col aber unter bestimmten, noch ungeklärten Bedingungen, zu einer Aktivierung der Thrombozyten fähig ist. Weiterführende Untersuchungen sind zur Aufklärung notwendig.

4.4. Mögliche Kofaktoren

Hautblutungen und andere Symptome der Blutungsneigung treten bei betroffenen Tieren nur sporadisch auf und unterbleiben zeitweise vollständig. Deshalb wird das Vorhandensein von Kofaktoren diskutiert, die zusammen mit dem genetischen Defekt zur hämorrhagischen Diathese führen. Die Ausprägung der klinischen Symptome der HTS ist bei den betroffenen Tieren sehr unterschiedlich. Unter den 44 Falltieren reichte das Spektrum von geringgradigem Nasenbluten bis zu hochgradiger Hautblutung, Spuren von Blut im Kot bis hin zu Todesfällen aufgrund hochgradig ausgeprägter Hämatome an unterschiedlichen Lokalisationen. Diese klinischen Abweichungen innerhalb der von HTS betroffenen Tiere wurden auch von anderen Autoren beschrieben (STEFICEK et al., 1993b; WEISSER et al., 2010). Im Hinblick auf die Genetik kann das möglicherweise mit einer unvollständigen Penetranz oder variabler Expressivität des genetischen Defektes zusammenhängen (CHAVALI et al., 2009; MARIANI und BERNARDI, 2009). Desweiteren ist es denkbar, dass die Haltung Einfluss auf die Art der Ausprägung klinischer Symptome nimmt. Gruppen- oder Laufstallhaltung bergen im Vergleich zur Einzel- oder Anbindehaltung eine erhöhte Verletzungsgefahr der Tiere und somit ein erhöhtes Blutungsrisiko. Die saisonale Häufung der klinischen Fälle in den Sommermonaten ist ein Indiz dafür, dass Stechmücken eine Rolle als Kofaktor einnehmen könnten. Blutsaugende Arthropoden sezernieren beim Stechakt antikoagulierende Substanzen über ihren Speichel. Dadurch wird der Gerinnungsprozess im Wirt blockiert oder verzögert, bis die Blutmahlzeit beendet ist (RIBEIRO, 1987). Mittels ihrer gerinnungshemmenden Substanzen im Speichel können blutsaugende Arthropoden Gerinnungsmediatoren bzw. -rezeptoren beeinflussen. Entweder werden Mediatoren direkt gebunden und somit als Aktivoren ausgeschaltet (VALENZUELA et al., 1999; CALVO et al., 2006) oder die Rezeptoren werden besetzt, ohne, dass nachgeschaltete Signalkaskaden aktiviert werden (GREVELINK et al., 1993; KELLER et al., 1993; MANS und RIBEIRO, 2008). Neben den Minimalinvasionen der Haut und Hautgefäße, die durch Insektenstiche verursacht werden, ist es demnach gut möglich, dass der InsektenSpeichel eine Auswirkung auf das Auftreten von Hautblutungen hat. Insektenstiche sind als Auslöser von Hautblutungen in diesem Zusammenhang schon beschrieben worden (NAVARRE et al., 1995; WEISSER et al., 2010).

Betrachtet man den Phänotyp erblich bedingter Blutungsneigung beim Menschen treten die Symptome auch nicht kontinuierlich auf. Bei der Glanzmann-Thrombasthenie sind klinische Symptome oft bei Kindern zu sehen, nehmen im jungen Erwachsenenalter jedoch ab. Zudem kann keine Aussage über die Schwere der Blutung getroffen werden (GEORGE et al., 1990). Bei dem Bernard-Soulier-Syndrom gestaltet sich der Phänotyp ebenso sehr unterschiedlich. Er variiert von ungefährlicher Hämatombildung bis hin zu lebensbedrohlichen Blutungskomplikationen (KIRCHMAIER und PILLITTERI, 2010). Sowohl die genetische Heterogenität, als auch Umweltfaktoren, könnten Einfluss auf den Grad der Blutungsneigung haben (SAVOIA et al., 2011). Das Pseudo-von-Willebrand-Syndrom geht bei betroffenen Patienten mit milden bis mittelgradigen Blutungssymptomen einher (OTHMAN et al., 2011). Auch bei diesem genetischen Defekt gibt es bislang keine Erklärung für die Variabilität des Phänotypes bezüglich der Blutungsneigung.

4.5. Altersverteilung

Die Hereditäre Thrombozytopathie Simmentaler Rinder basiert auf einem erblichen Defekt, der Auswirkung auf die Funktion der Thrombozyten hat. Über regelmäßige Untersuchungen beider klinikeigenen Tiere und über Nachuntersuchungen betroffener Thrombozytopathie-Tiere konnte gezeigt werden, dass die Aggregationsstörung zu jedem Zeitpunkt mit der Impedanzaggregometrie nachgewiesen werden kann - auch in blutungsfreien Phasen. Dennoch variierte das Alter der Tiere sehr, in dem bei ihnen erstmals Symptome der Blutungsneigung beobachtet wurden. Sehr häufig (24/44) wurden die ersten Symptome einer Blutungsneigung bei Kälbern im Alter bis 4 Wochen gemeldet. Dabei gilt zu bedenken, dass viele Fälle während der Zeit des BNP-Projektes gesammelt wurden. Das Thema „Blutschwitzen“ war bei Tierärzten und Landwirten aufgrund hoher Todeszahlen der Kälber in dieser Zeit sehr präsent und die Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung bot zudem kostenlose Blutuntersuchungen betroffener Tiere an. Dementsprechend wurden vor allem Blutproben von Kälbern ins Labor eingesandt. Die nächste Altersgruppe (1 - 6 Monate) beinhaltet nur zwei Tiere, die dritte Gruppe der 6 bis 18 Monate alten Tiere acht Tiere, während die letzte Gruppe (> 18 Monate) zehn Tiere beinhaltet. Ein weiterer Grund für diese Verteilung könnte in der Beobachtung der Tiere liegen. Viele Kälber und Fresser werden bei der Aufzucht in Gruppen

gehalten und nicht so intensiv beobachtet wie Kälber, die noch getränkt oder Kühe, die gemolken werden. Dadurch ist es möglich, dass geringgradige Blutungen bei Tieren dieser Altersklassen vom Landwirt unentdeckt bleiben. Die Untersuchungen der klinikeigenen Tiere zeigten, dass auch im Alter zwischen 1 und 6 Monaten immer wieder Hautblutungen auftreten können, obgleich diese nicht immer stark ausgeprägt sein müssen und leicht zu übersehen sind. Die Ausbildung für die Studenten an der Klinik gewährleistet eine tägliche gründliche klinische Untersuchung am Einzeltier. Die Tiere auf einem landwirtschaftlichen Betrieb hingegen werden - abhängig vom Betriebsmanagement – nur mehr oder weniger gründlich vom Landwirt beobachtet. Genannte Umstände und die begrenzte Tierzahl gestalten es schwierig, eine Aussage über den Zusammenhang zwischen dem Alter der Tiere und dem Auftreten klinischer Symptome von Blutungsneigung zu treffen. Es ist jedoch anzunehmen, dass das Alter der Tiere wenig Einfluss auf das Auftreten klinischer Symptome von Blutungsneigung hat.

5. Prophylaxe und symptomatische Therapie

Bei der Hereditären Thrombozytopathie Simmentaler Rinder handelt es sich um einen genetischen Defekt. Demzufolge stellen das Identifizieren von Trägertieren des Gendefektes und der Ausschluss derer aus der weiteren Zucht die einzige Möglichkeit der Ursachenbekämpfung von HTS dar. Die „Canadian Simmental Association“ sprach die Notwendigkeit einer Erkennung von Trägertieren und die Ausmerzung des Gendefektes aus (MAPLETOFT et al., 2000). In Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Tierzucht der TU München in Freising konnten bedeutsame Besamungsbullen als hetero- oder homozygote Trägertiere des Gendefektes identifiziert werden. Aufgrund der noch in den Anfängen befindlichen und nicht veröffentlichten Studien können bislang nur Empfehlung des Zuchtausschlusses betroffener Bullen ausgesprochen werden. Gleiches gilt auch für die Muttertiere betroffener Falltiere. Jede erneute Anpaarung mit einem Bullen, der Träger des Gendefektes ist, birgt die Gefahr, dass das nächste Kalb wieder von HTS betroffen sein wird. Besitzern von weiblichen Tieren mit HTS wird von einer Besamung abgeraten. Neben einer Weiterverbreitung des Gendefektes, besteht bei der Kalbung erhöhte Gefahr einer Blutungsneigung. STEFICEK et al. (1993a) beschrieben massive Hämatombildungen bei einer Kuh, die post partum im Bereich des M. semitendinosus und der Vulva entstanden sind. Weiterhin war das Weichgewebe innerhalb des Beckenkanals von manuell

spürbaren Umfangsvermehrungen durchsetzt, die mittels Nadelaspiration als Hämatome diagnostiziert wurden. Insgesamt bildete das Tier nach der Geburt aufgrund der Hämatome eine ernst zu nehmende Anämie aus, die zu einem Schockzustand führte. Eines der Falltiere (ID_32) wurde vier Wochen nach der Kalbung mit Blutung aus dem Uterus vorgestellt. Ob diese durch die Kalbung bedingt war, ließ sich nicht mehr feststellen. Ein Zusammenhang scheint aber wahrscheinlich. Eine andere Studie verfolgte ein weibliches Fleckviehkalb bis zu seinem Tod im fünften Lebensjahr. In dieser Zeit kalbte das Tier zweimal ohne Komplikationen ab (WEISSER et al., 2010). Auch unter unseren Falltieren befanden sich Kühe (ID_32, ID_64, ID_96), die ohne Probleme in die Geburt kamen und symptomatisch gesunde Kälber zur Welt brachten. Dennoch gilt es zu bedenken, dass Tiere mit Blutungsneigung tendenziell einem erhöhten Risiko von Blutungen ausgesetzt sind. Als Sofortmaßnahme einer Therapie – gerade bei lebensbedrohlichen Blutverlusten – wird die Durchführung einer Bluttransfusion beschrieben. Allerdings ist die Wirkung nur von kurzer Dauer, da die Lebenszeit der Thrombozyten aus dem Fremdblut auf wenige Tage beschränkt ist (SEARCY und PETRIE, 1990; WEISSER et al., 2010). Auch bei der Behandlung einiger Falltiere wurde die Bluttransfusion eingesetzt. Einige Hoftierärzte behandeln mit dem Homöopathikum Sangostyptal® 16. Nach Aussagen der Landwirte scheinen sich die Blutungen daraufhin zu bessern. Inwieweit es tatsächlich eine Wirkung auf die Thrombozyten oder das Gerinnungssystem hat, ist fraglich. SEARCY und PETRIE (1990) empfehlen die parenterale Gabe von Eisen, da Tiere mit Blutungsneigung bei längeren Blutungsphasen einen deutlichen Eisenmangel aufweisen.

6. HTS aus Sicht der Landwirte (Fragebogenauswertung)

Sensibilisiert durch die Bovine Neonatale Panzytopenie, die für betroffene Kälber häufig tödlich endet (FRIEDRICH et al., 2009), zogen zahlreiche Landwirte bei Anzeichen von Blutungsneigung ihrer Tiere den Hoftierarzt hinzu. Ausschlaggebend waren meist die Hautblutungen, welche die Besitzer sehr beunruhigten, obwohl das Allgemeinbefinden betroffener Tiere häufig ungestört war. Diese Beobachtung wurde auch bei anderen Fällen gemacht: SEARCY und PETRIE (1990) und WEISSER et al. (2010) berichteten ebenso von einem ungestörten Allgemeinbefinden und normalen Vitalfunktionen der Patienten. Dennoch gab es Fälle, in denen der Zustand der Tiere aufgrund des enormen

Blutverlustes nicht mehr mit dem Leben vereinbar war (SEARCY und PETRIE, 1990). Insgesamt entwickelten sich nach Auskunft der Landwirte in unserer Studie 31 von 36 Tieren normal. Fünf Rinder blieben in der Entwicklung etwas hinter ihren Altersgenossen zurück. Darunter auch eines unserer klinikeigenen Tiere (ID_126), das bis heute ein Wachstumsdefizit zeigt. Der genetische Defekt scheint in der Regel einen geringen Einfluss auf die Entwicklung betroffener Tiere zu nehmen. Von HTS betroffene Kälber wurden wie gewohnt auf dem Viehmarkt verkauft. Bisher gibt es keine Verpflichtung der Landwirte betroffener Tiere den Käufer über den Gendefekt aufzuklären. Nach Angaben der Landwirte, gab es keine negativen Rückmeldungen seitens der Käufer. Das lässt vermuten, dass sich die Tiere weiterhin normal entwickelten und - zumindest kurz nach dem Kauf - auch keine weiteren Blutungsepisoden mehr auftraten. Hinsichtlich des Einsatzes betroffener Tiere zur Zucht teilte sich die Meinung der Landwirte. Einige schätzten das Risiko einer rezidivierenden Blutungsphase hoch ein, sprachen sich bewusst gegen die Besamung ihrer Tiere aus und ließen sie zeitnah schlachten. Andere dagegen gingen das Risiko ein und ließen ihre Tiere besamen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Rinder mit HTS die Trächtigkeit und Kalbung problemlos bewältigen können und die Kälber durchaus klinisch gesund sein können. WEISSER et al. (2010) konnten dies auch beobachten. Zum jetzigen Stand der Wissenschaft können aufgrund ungenügender Veröffentlichungen nur Empfehlungen hinsichtlich des Umgangs mit betroffenen Fleckviehrendern mit HTS ausgesprochen werden. Durch die Identifizierung von Anlageträgern sollen Risikoanpaarungen zukünftig vermieden werden (siehe Kurzinformation im Anhang).

7. Ermittelte Referenzwerte

Nach der Empfehlung von HUBER (2012) wurden für die Ermittlung der Referenzwerte die Agonisten ADP mit einer Konzentration von 18 $\mu\text{mol/l}$ und Col mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ als Standard für jede Messung festgelegt. Die Messdauer von 6 Minuten wurde ebenso übernommen. MARSCHNER et al. (2012) empfehlen - vor allem bei Einsatz von ADP als Aktivierungsreagenz - eine Messzeit von 6 Minuten. Um einen erniedrigten AUC-Wert aufgrund einer Thrombozytopenie auszuschließen, wurden zur Berechnung der Referenzwerte für die Gruppen Jungrinder und Kühe ausschließlich Tiere mit einer Thrombozytenkonzentration über 200000/ μl mit einbezogen. Diese untere

Referenzwertschwelle wurde von STÖBER und GRÜNDER (1990) definiert. Bei der Ermittlung der Referenzwerte für Bullen wurde der untere Schwellenwert der Thrombozytenkonzentration auf $150000/\mu\text{l}$ herabgesetzt, da die Thrombozytenkonzentration der Bullen in vorliegender Studie durchschnittlich niedriger war, als in der Literatur beschrieben. Dadurch konnten weitere 6 Tiere für die Impedanzmessung mit berücksichtigt werden. Möglicherweise ist die Thrombozytenkonzentration aufgrund der Blutentnahmetechnik an der Besamungsstation Grub reduziert. Aus Gründen der Arbeitssicherheit wurde das Blut in eine 30 ml Spritze aufgezogen und unmittelbar danach in die Hirudin- und EDTA-Röhrchen umgefüllt. Eine vorzeitige Aktivierung der Thrombozyten in der Spritze kann nicht ausgeschlossen werden. Zudem definierte KRAMER (2000) für adulte Rinder einen Referenzbereich von 100000 bis 800000 Thrombozyten/ μl . Bislang ist nicht eindeutig sicher, ob die Thrombozytenkonzentration mit den AUC-Werten korreliert. TOTH et al. (2006) stellten keinen Zusammenhang zwischen der Plättchenkonzentration und den ermittelten AUC-Werten fest. Eine andere Studie dagegen wies auf einen signifikanten Zusammenhang zwischen Plättchenkonzentration und AUC-Wert bei Stimulierung der Thrombozyten mit ADP und Col hin (SEYFERT et al., 2007). Die signifikante Korrelation zwischen Plättchenkonzentration und Aggregation unter Col unterstützen auch WURTZ et al. (2012). HANKE et al. (2010) beschreiben deutlich reduzierte AUC-Werte bei einer Thrombozytenkonzentration unter $100000/\mu\text{l}$. Dennoch wurden auch AUC-Werte innerhalb des Referenzbereiches gemessen, obwohl die Thrombozytenkonzentration unterhalb von $50000/\mu\text{l}$ lag. Unseren Berechnungen zu Folge besteht zwischen der Thrombozytenkonzentration und den ermittelten AUC-Werten abhängig von den Gruppen und den verwendeten Reagenzien eine geringe bis mittlere Korrelation. Beim Vergleich der Thrombozytenkonzentration innerhalb der verschiedenen Alters- bzw. Geschlechtergruppen fällt auf, dass der Mittelwert der Thrombozytenkonzentration für Bullen mit $312,26 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ deutlich unter denen der Kühe ($438,36 \cdot 10^3/\mu\text{l}$) und Jungrinder ($561,28 \cdot 10^3/\mu\text{l}$) liegt. Untersuchungen von MIRZADEH et al. (2010) konnten keine signifikanten Unterschiede der Thrombozytenkonzentration in Abhängigkeit von Geschlecht oder Alter der Rinder erkennen.

Für Bullen konnte ein Referenzbereich von 117,82 AU*Min bis 705,78 AU*Min

für 5 µg/ml Col und 324,99 AU*Min bis 1083,23 AU*Min für 18 µmol/ml ADP ermittelt werden. Für die Gruppe der Kühe ergaben die Berechnungen eine Referenzspanne von 119,61 AU*Min bis 807,93 AU*Min für Col und 350,12 AU*Min bis 1308,56 AU*Min bei Aktivierung mit ADP. Die AUC-Werte bei den Jungrindern liegen zwischen 52,7 AU*Min und 825,66 AU*Min für Col und zwischen 428,6 AU*Min und 1192,8 AU*Min für ADP. Vergleicht man vorliegende Ergebnisse mit den von HUBER (2012) ermittelten Referenzwerten für das Multiplate®-Gerät bei Kälbern (194,25 AU*Min bis 1049,51 AU*Min für 5 µg/ml Col und 178,39 AU*Min bis 1192,09 AU*Min für 18 µmol/l ADP), so sind gewisse Übereinstimmungen der AUC-Werte innerhalb der Gruppen zu erkennen. Außer bei der Gruppe der Kälber ist bei allen anderen Gruppen der deutlich höhere AUC-Wert bei Stimulierung der Thrombozyten mit ADP zu verzeichnen. Betrachtet man die Aggregationskurven in Abbildung 32, die bei einer Impedanzmessung aufgezeichnet worden sind, wird deutlich, dass die Aggregation der Thrombozyten mit Col verzögert eintritt (Kanal 1). Bei Stimulation der Thrombozyten mit ADP kommt es hingegen ohne Verzögerung zu einer Aggregation (Kanal 2). Das erklärt sich über die verschiedenen Aktivierungswege, die die Agonisten bei den Thrombozyten nutzen (Abbildung 5). ADP wirkt direkt über ADP-Rezeptoren auf die Thrombozyten. Col bedingt zuerst die Freisetzung von Arachidonsäure, die innerhalb der Blutplättchen zu Thromboxan metabolisiert wird. Thromboxan wirkt dann über entsprechende Rezeptoren aktivierend auf die Thrombozyten.

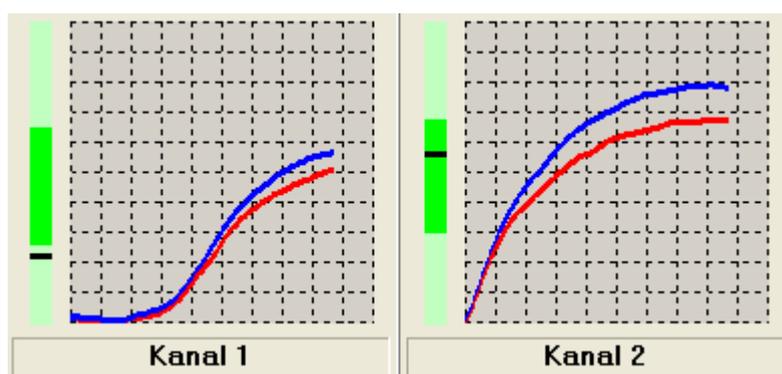


Abbildung 32: Kurvenfunktion nach Aktivierung der Thrombozyten mit Col (Kanal 1) und ADP (Kanal 2). Mit der roten und blauen Kurve werden die Messergebnisse dargestellt, die unabhängig voneinander innerhalb einer Messzelle erfasst worden sind.

Die Ergebnisse zur Ermittlung der Referenzwerte für das Multiplate®-

Aggregometer bei Bullen, Kühen und Jungrindern ergänzen die Studie von HUBER (2012), die Referenzwerte bei Kälbern der Rasse Deutsches Fleckvieh aufführt. Sie sollen dabei helfen, Aggregationswerte von Rindern der Rasse Deutsches Fleckvieh zu interpretieren und gegebenenfalls als pathologisch einzustufen. Die Hereditäre Thrombozytopathie Simmentaler Rinder ist eine angeborene Krankheit, die bislang nur bei Simmentaler Rindern beschrieben wurde und mit Blutungsneigung einhergeht. Mittels der Impedanzaggregometrie und den Aktivierungsreagenzien ADP und Col kann die Diagnose HTS sicher bestätigt werden (WEISSER et al., 2010). Eigene Untersuchungen an gesunden und nachweislich von HTS betroffenen DFV-Rindern jeder Altersklasse lassen erkennen, dass der Einsatz von 5 µg/ml Col als Aktivierungsreagenz in der Impedanzaggregometrie nicht immer zu einer gesicherten Diagnose führt. In 11 von 44 HTS-Fällen lagen die ermittelten AUC-Werte innerhalb der für die verschiedenen Altersgruppen berechneten Referenzbereiche. Unter Verwendung von 18 µmol/l ADP hingegen befanden sich die gemessenen AUC-Werte bei nachweislich kranken Tieren deutlich unterhalb der hier ermittelten Referenzwerte. Demzufolge empfehlen wir zur Diagnosestellung der HTS die Messungen mit dem Multiplate®-Aggregometer lediglich mit ADP (18 µmol/l) durchzuführen.

Die einfache Handhabung des Impedanzaggregometers und die unkomplizierte Beschaffung und Aufbereitung des Probenmaterials ermöglicht eine schnelle, sichere und wertvolle Thrombozytenfunktionsdiagnostik - auch in der Buiatrik.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

„Klinische Untersuchung und Thrombozytenfunktionsdiagnostik mittels Multiplate® bei Rindern mit Blutungsneigung der Rasse Deutsches Fleckvieh mit Verdacht auf eine erblich bedingte Gerinnungsstörung und Ermittlung von Referenzwerten in der Multiplate®-Impedanzaggregometrie für Bullen, Kühe und Jungrinder der Rasse Deutsches Fleckvieh“

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Rinder der Rasse Deutsches Fleckvieh (DFV) mit Blutungsneigung klinisch untersucht, deren Blutungssymptome und –episoden ausgewertet und eine Thrombozytenfunktionsdiagnostik mittels Multiplate® durchgeführt, um das Krankheitsbild der HTS detaillierter definieren zu können. Am Lehrstuhl für Tierzucht der TU München erfolgte eine genetische Untersuchung dieser Patienten zur Bestätigung des erblichen Defektes. Bei den 44 Rindern mit Blutungsneigung, welche die Selektionskriterien erfüllten und von denen alle Untersuchungsparameter vorliegen, wurden Blutungssymptome unterschiedlicher Lokalisation, Intensität und Dauer beobachtet, welche zum Teil je nach Alter der Tiere und Jahreszeit variierten. Die Thrombozytenfunktionstests waren im Vergleich zu Rindern der Rasse Fleckvieh ohne Blutungsneigung bei allen 44 Probanden zu jeder gemessenen Zeit verändert.

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit Referenzwerte für das Multiplate®-Thrombozytenfunktionsmessgerät bei Bullen, Kühen und Jungrindern der Rasse DFV ermittelt. 5 µg/ml Kollagen (Col) und 18 µmol/l ADP fungierten als Thrombozytenaktivatoren. Für die statistische Auswertung standen 60 bzw. 61 Tiere pro Gruppe zur Verfügung. Die Berechnung der Referenzwerte erfolgte nach Überprüfung auf Normalverteilung und Ausreißertest mit dem parametrischen Verfahren ($\bar{X} \pm 2 \text{ SD}$) (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Referenzwerte für das Multiplate®-Impedanzaggregometer bei Bullen, Kühen und Jungrindern.

| | | \bar{X} AUC in AU*Min | |
|-------------------|-----------------|-------------------------|---------------|
| | Referenzbereich | 5 µg/ml Col | 18 µmol/l ADP |
| Bullen | Untere Grenze | 117,82 | 324,99 |
| | Obere Grenze | 705,78 | 1083,23 |
| Kühe | Untere Grenze | 119,61 | 350,12 |
| | Obere Grenze | 807,93 | 1308,56 |
| Jungrinder | Untere Grenze | 52,7 | 428,6 |
| | Obere Grenze | 825,66 | 1192,8 |

VII. SUMMARY

“Clinical examination and diagnostics of platelet character by Multiplate® in bleeding Simmental cattle in suspicion on a hereditary coagulation disease and investigation of the reference values in the Multiplate®-aggregometry for bulls, cows and young cattle of Simmental breed”

Within the framework of this study, a clinical examination of Simmental cattle suffering from a bleeding disorder, as well as the evaluation of their symptoms and bleeding episodes was done. Furthermore, diagnostics of platelet character was performed by Multiplate®-aggregometry to obtain a more detailed clinical picture of Simmental Hereditary Thrombopathy. A molecular genetic analysis, carried out by the Chair of Animal Breeding at Technische Universität München, confirmed the genetic defect. For the 44 animals with incidence of bleeding complying with the criteria of selection and complete sets of parameters of analysis, bleeding symptoms of different localization, intensity and duration were observed, partially diversified according to the age of the animal and season. At any time of measuring the tests of platelet character showed abnormalities in all of the 44 probands, compared to Simmental cattle without bleeding symptoms.

Furthermore reference values in the Multiplate®-aggregometry for bulls, cows and young cattle were determined. Collagen (5 µg/ml) and ADP (18 µmol/l) were used as platelet-activation reagents. For the statistical analysis 60 and 61 propands per group were available, respectively. To calculate the reference values after the examination of common distribution and the test for outliers the parametric procedure ($\bar{x} \pm 2$ SD) was used. Table 8 shows the determined reference values.

Table 8: Reference values in the Multiplate®-aggregometry for bulls, cows and young cattle of Simmental cattle.

| | Reference value | \bar{X} AUC in AU*min | |
|---------------------|-----------------|-------------------------|---------------|
| | | 5 µg/ml Col | 18 µmol/l ADP |
| bulls | lowerlimit | 117,82 | 324,99 |
| | upperlimit | 705,78 | 1083,23 |
| cows | lowerlimit | 119,61 | 350,12 |
| | upperlimit | 807,93 | 1308,56 |
| young cattle | lowerlimit | 52,7 | 428,6 |
| | upperlimit | 825,66 | 1192,8 |

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Albers CA, Cvejic A, Favier R, Bouwmans EE, Alessi MC, Bertone P, Jordan G, Kettleborough RN, Kiddle G, Kostadima M, Read RJ, Sipos B, Sivapalaratnam S, Smethurst PA, Stephens J, Voss K, Nurden A, Rendon A, Nurden P, Ouwehand WH. Exome sequencing identifies NBEAL2 as the causative gene for gray platelet syndrome. *Nature Genetics* 2011; 43: 735-7.

Ayers JR, Leipold HW, Padgett GA. Lesions in Brangus cattle with Chediak-Higashi syndrome. *Veterinary Pathology* 1988; 25: 432-6.

Baumgarten A, Wilhelmi M, Kalbantner K, Ganter M, Mischke R. Measurement of platelet aggregation in ovine blood using a new impedance aggregometer. *Veterinary Clinical Pathology* 2009; 39: 149-56.

Beardsley DS. Platelet membrane glycoproteins: role in primary hemostasis and component antigens. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 1990; 63: 469-75.

Bell TG, Meyers KM, Prieur DJ, Fauci AS, Wolff SM, Padgett GA. Decreased nucleotide and serotonin storage associated with defective function in Chediak-Higashi syndrome cattle and human platelets. *Blood* 1976; 48: 175-84.

Bergmann F. Physiologie des Thrombozyten. In: Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J, eds.: Springer-Verlag 2006: 358-64.

Berndt MC, Andrews RK. Bernard-Soulier syndrome. *Haematologica* 2011; 96: 355-9.

Bertoni A, Tadokoro S, Eto K, Pampori N, Parise LV, White GC, Shattil SJ. Relationships between Rap1b, affinity modulation of integrin alpha IIb beta 3, and the actin cytoskeleton. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 25715-21.

Bevers EM, Comfurius P, van Rijn JL, Hemker HC, Zwaal RF. Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 1982; 122: 429-36.

Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Zwaal RF. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1439: 317-30.

Blume RS, Padgett GA, Wolff SM, Bennett JM. Giant neutrophil granules in the Chediak-Higashi syndrome of man, mink, cattle and mice. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 1969; 33: 271-4.

Boudreaux MK, Kvam K, Dillon AR, Bourne C, Scott M, Schwartz KA, Toivio-Kinnucan M. Type I Glanzmann's thrombasthenia in a Great Pyrenees dog. *Veterinary Pathology* 1996; 33: 503-11.

Boudreaux MK, Schmutz SM, French PS. Calcium diacylglycerol guanine nucleotide exchange factor I (CalDAG-GEFI) gene mutations in a thrombopathic Simmental calf. *Veterinary Pathology* 2007; 44: 932-5.

Breton-Gorius J, Vainchenker W, Nurden A, Levy-Toledano S, Caen J. Defective alpha-granule production in megakaryocytes from gray platelet syndrome: ultrastructural studies of bone marrow cells and megakaryocytes growing in culture from blood precursors. *The American Journal of Pathology* 1981; 102: 10-9.

Brooks M, Etter K, Catalfamo J, Brisbin A, Bustamante C, Mezey J. A genome-wide linkage scan in German shepherd dogs localizes canine platelet procoagulant deficiency (Scott syndrome) to canine chromosome 27. *Gene* 2010; 450: 70-5.

Brooks MB, Catalfamo JL, Brown HA, Ivanova P, Lovaglio J. A hereditary bleeding disorder of dogs caused by a lack of platelet procoagulant activity. *Blood* 2002; 99: 2434-41.

Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Reviews* 2011; 25: 155-67.

Calatzis A, Spannagl M, Loreth RM (2006) *Multiplate platelet function analysis – application and interpretation*, München

Calvo E, Mans BJ, Andersen JF, Ribeiro JM. Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *The Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 1935-42.

Camerer E, Kolsto AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thrombosis Research* 1996; 81: 1-41.

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

Carlin A. *Epidemiologische Untersuchung zur Bovinen Neonatalen Panzytopenie (BNP): eine Fall-Kontroll-Studie*. Diss. med. vet. 2011. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Chavali S, Ghosh S, Bharadwaj D. Hemophilia B is a quasi-quantitative condition with certain mutations showing phenotypic plasticity. *Genomics* 2009; 94: 433-7.

Cosemans JM, Iserbyt BF, Deckmyn H, Heemskerk JW. Multiple ways to switch platelet integrins on and off. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2008; 6: 1253-61.

Crittenden JR, Bergmeier W, Zhang Y, Piffath CL, Liang Y, Wagner DD, Housman DE, Graybiel AM. CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nature Medicine* 2004; 10: 982-6.

Davie EW, Kulman JD. An overview of the structure and function of thrombin.

Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2006; 32 Suppl 1: 3-15.

Diamandis M, Paterson AD, Rommens JM, Veljkovic DK, Blavignac J, Bulman DE, Wayne JS, Derome F, Rivard GE, Hayward CP. Quebec platelet disorder is linked to the urokinase plasminogen activator gene (PLAU) and increases expression of the linked allele in megakaryocytes. *Blood* 2009; 113: 1543-6.

Dormann D, Clemetson KJ, Kehrel BE. The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood* 2000; 96: 2469-78.

Duerschmied D, Bode C. [The role of serotonin in haemostasis]. *Hamostaseologie* 2009; 29: 356-9.

Dynabyte. Benutzerhandbuch I, Allgemeine Informationen und Installationsanleitung zum Multiplate®-System. München 2010-11;

Dynabyte. multiplate® - the new standard for platelet diagnostics. www.multiplate.net, 11.10.2013

Engelhardt Wv, Breves G (2005) *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag, Stuttgart

Fagerland JA, Hagemoser WA, Ireland WP. Ultrastructure and stereology of leukocytes and platelets of normal foxes and a fox with a Chediak-Higashi-like syndrome. *Veterinary Pathology* 1987; 24: 164-9.

Falik-Zaccari TC, Anikster Y, Rivera CE, Horne MK, 3rd, Schliamser L, Phornphutkul C, Attias D, Hyman T, White JG, Gahl WA. A new genetic isolate of gray platelet syndrome (GPS): clinical, cellular, and hematologic characteristics. *Molecular Genetics and Metabolism* 2001; 74: 303-13.

Friedrich A, Rademacher G, Weber BK, Kappe E, Carlin A, Assad A, Sauter-

Louis C, Hafner-Marx A, Buttner M, Böttcher J, Klee W. Gehäuftes Auftreten von hämorrhagischer Diathese infolge Knochenmarksschädigung bei jungen Kälbern. *Tierärztliche Umschau* 2009; 64: 423-31.

Friedrich A, Buttner M, Rademacher G, Klee W, Weber BK, Muller M, Carlin A, Assad A, Hafner-Marx A, Sauter-Louis CM. Ingestion of colostrum from specific cows induces Bovine Neonatal Pancytopenia (BNP) in some calves. *BMC Veterinary Research* 2011: 7-11.

Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, Szladovits B, Walton RM, Barnhart KF, Blanco-Chavez J. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology* 2012; 41: 441-53.

Frojmovic MM, Wong T, Searcy GP. Platelets from bleeding Simmental cattle have a long delay in both ADP-activated expression of GpIIb-IIIa receptors and fibrinogen-dependent platelet aggregation. *Thrombosis and Haemostasis* 1996; 76: 1047-52.

Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thrombosis and Haemostasis* 2001a; 86: 222-32.

Gachet C. Identification, characterization, and inhibition of the platelet ADP receptors. *International Journal of Hematology* 2001b; 74: 375-81.

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.

Gailani D, Renne T. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2007a; 5: 1106-12.

Gailani D, Renne T. Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2007b; 27: 2507-13.

George JN, Caen JP, Nurden AT. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. *Blood* 1990; 75: 1383-95.

Glusa E, Markwardt F. Platelet functions in recombinant hirudin-anticoagulated blood. *Haemostasis* 1990; 20: 112-8.

Grevelink SA, Youssef DE, Loscalzo J, Lerner EA. Salivary gland extracts from the deerfly contain a potent inhibitor of platelet aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90: 9155-8.

Hanke AA, Roberg K, Monaca E, Sellmann T, Weber CF, Rahe-Meyer N, Gorlinger K. Impact of platelet count on results obtained from multiple electrode platelet aggregometry (Multiplate). *European Journal of Medical Research* 2010; 15: 214-9.

Hardisty RM, Mills DC. The platelet defect associated with albinism. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1972; 201: 429-36.

Hartwig J, Italiano J, Jr. The birth of the platelet. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2003; 1: 1580-6.

Hayward CP, Rivard GE, Kane WH, Drouin J, Zheng S, Moore JC, Kelton JG. An autosomal dominant, qualitative platelet disorder associated with multimerin deficiency, abnormalities in platelet factor V, thrombospondin, von Willebrand factor, and fibrinogen and an epinephrine aggregation defect. *Blood* 1996; 87: 4967-78.

Hayward CP. Multimerin: a bench-to-bedside chronology of a unique platelet and endothelial cell protein--from discovery to function to abnormalities in disease. *Clinical and Investigative Medicine-Medecine Clinique Et Experimentale* 1997;

20: 176-87.

Hayward CPM, Cramer EM, Kane WH, Zheng SL, Bouchard M, Masse JM, Rivard GE. Studies of a second family with the Quebec platelet disorder: Evidence that the degradation of the alpha-granule membrane and its soluble contents are not secondary to a defect in targeting proteins to alpha-granules. *Blood* 1997; 89: 1243-53.

Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thrombosis and Haemostasis* 2002; 88: 186-93.

Hemker HC, van Rijn JL, Rosing J, van Dieijen G, Bevers EM, Zwaal RF. Platelet membrane involvement in blood coagulation. *Blood Cells* 1983; 9: 303-17.

Hermansky F, Pudlak P. Albinism associated with hemorrhagic diathesis and unusual pigmented reticular cells in the bone marrow: report of two cases with histochemical studies. *Blood* 1959; 14: 162-9.

Hirano K. The roles of proteinase-activated receptors in the vascular physiology and pathophysiology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2007; 27: 27-36.

Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 2003; 16: 17-20.

Hourani SM, Cusack NJ. Pharmacological receptors on blood platelets. *Pharmacological Reviews* 1991; 43: 243-98.

Huber M. Multiplate®-Impedanzaggregometrie in der Buiatrik – Etablierung der Methodik und Ermittlung von Referenzwerten für Kälber der Rasse Deutsches Fleckvieh. Diss. med. vet. 2012. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Iannello S, Fabbri G, Bosco P, Cavaleri A, Cantarella S, Camuto M, Milazzo P, Romeo F, Belfiore F. A clinical variant of familial Hermansky-Pudlak syndrome. *Medscape General Medicine* 2003; 5: 3.

Jain NC. The Platelets. In: *Essentials of Veterinary Hematology*, 1 edn. Jain NC, ed. Pennsylvania: Lea & Febiger 1993: 105-32.

Jung S. Molekulargenetische Aufklärung von zwei Erbkrankheiten der Fleckvieh-Population. Diss. rer. nat. 2013. Technische Universität München.

Jung SM, Moroi M. Activation of the platelet collagen receptor integrin $\alpha(2)\beta(1)$: its mechanism and participation in the physiological functions of platelets. *Trends Cardiovascular Medicine* 2000; 10: 285-92.

Kahr WH, Zheng S, Sheth PM, Pai M, Cowie A, Bouchard M, Podor TJ, Rivard GE, Hayward CP. Platelets from patients with the Quebec platelet disorder contain and secrete abnormal amounts of urokinase-type plasminogen activator. *Blood* 2001; 98: 257-65.

Kahr WH, Hinckley J, Li L, Schwertz H, Christensen H, Rowley JW, Pluthero FG, Urban D, Fabbro S, Nixon B, Gadzinski R, Storck M, Wang K, Ryu GY, Jobe SM, Schutte BC, Moseley J, Loughran NB, Parkinson J, Weyrich AS, Di Paola J. Mutations in NBEAL2, encoding a BEACH protein, cause gray platelet syndrome. *Nature Genetics* 2011; 43: 738-40.

Kaiser AFC, Neubauer H, Franken CC, Krüger J-C, Mügge A, Meves SH. Which is the best anticoagulant for whole blood aggregometry platelet function testing? Comparison of six anticoagulants and diverse storage conditions. *Platelets* 2011: 1-9.

Kehrel BE. [Platelets: biochemistry and physiology]. *Hamostaseologie* 2008; 28: 289-98.

Keller PM, Waxman L, Arnold BA, Schultz LD, Condra C, Connolly TM. Cloning of the cDNA and expression of moubatin, an inhibitor of platelet aggregation. *The Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 5450-6.

Kirchmaier CM, Pillitteri D. [Congenital thrombocytopathies]. *Internist (Berl)* 2010; 51: 1109-14, 16-7.

Kramer JW, Davis WC, Prieur DJ. The Chediak-Higashi syndrome of cats. *Laboratory Investigation* 1977; 36: 554-62.

Kramer JW. Normal Hematology of Cattle, Sheep and Goats. In: Schalm's *Veterinary Hematology*, fifth edn: Ed. Lippincott, Williams and Wilkins 2000: 1075-84.

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.

Kunieda T, Ide H, Nakagiri M, Yoneda K, Konfortov B, Ogawa H. Localization of the locus responsible for Chediak-Higashi syndrome in cattle to bovine chromosome 28. *Animal Genetics* 2000; 31: 87-90.

Lanza F. Bernard-Soulier syndrome (hemorrhagic thrombocytic dystrophy). *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2006; 1: 46.

Leipold HE, Moore W. Bovine thrombopathia. In: *First international registry of animal models of thrombosis and hemorrhagic diseases*. Dodds WJ, ed. Washington, D.C.: Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.) 1977: 23.

Lhermusier T, Chap H, Payrastre B. Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2011; 9: 1883-91.

Lipscomb DL, Bourne C, Boudreaux MK. Two genetic defects in alphaIIb are associated with type I Glanzmann's thrombasthenia in a Great Pyrenees dog: a 14-base insertion in exon 13 and a splicing defect of intron 13. *Veterinary Pathology* 2000; 37: 581-8.

Livesey L, Christopherson P, Hammond A, Perkins J, Toivio-Kinnucan M, Insalaco T, Boudreaux MK. Platelet dysfunction (Glanzmann's thrombasthenia) in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2005; 19: 917-9.

Lutzner MA, Lowrie CT, Jordan HW. Giant granules in leukocytes of the beige mouse. *The Journal of Heredity* 1967; 58: 299-300.

Macieira S, Rivard GE, Champagne J, Lavoie JP, Bedard C. Glanzmann thrombasthenia in an Oldenbourg filly. *Veterinary Clinical Pathology* 2007; 36: 204-8.

Macieira S, Lussier J, Bedard C. Characterization of the cDNA and genomic DNA sequence encoding for the platelet integrin alpha IIB and beta III in a horse with Glanzmann thrombasthenia. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2011; 75: 222-7.

Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2007; 27: 1687-93.

Mans BJ, Ribeiro JM. Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2008; 38: 841-52.

Mapletoft RJ, Schmutz SM, Searcy GP. A study of the inheritance of a bleeding disorder in Simmental cattle. *The Canadian Veterinary Journal* 2000; 41: 791-3.

Mariani G, Bernardi F. Factor VII Deficiency. *Seminars in Thrombosis and*

Hemostasis 2009; 35: 400-6.

Marschner CB, Kristensen AT, Spodsberg EH, Wiinberg B. Evaluation of platelet aggregometry in dogs using the Multiplate platelet analyzer: impact of anticoagulant choice and assay duration. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2012; 22: 107-15.

Menard M, Meyers KM. Storage pool deficiency in cattle with the Chediak-Higashi syndrome results from an absence of dense granule precursors in their megakaryocytes. *Blood* 1988; 72: 1726-34.

Meyers KM, Hopkins G, Holmsen H, Benson K, Prieur DJ. Ultrastructure of resting and activated storage pool deficient platelets from animals with the Chediak-Higashi syndrome. *The American Journal of Pathology* 1982; 106: 364-77.

Michelson AD. Gray platelet syndrome. *Blood* 2013; 121: 250.

Miller JL, Kupinski JM, Castella A, Ruggeri ZM. von Willebrand factor binds to platelets and induces aggregation in platelet-type but not type IIB von Willebrand disease. *The Journal of Clinical Investigation* 1983; 72: 1532-42.

Miller JL, Cunningham D, Lyle VA, Finch CN. Mutation in the gene encoding the alpha chain of platelet glycoprotein Ib in platelet-type von Willebrand disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 88: 4761-5.

Miller JL. Platelet-type von Willebrand disease. *Thrombosis and Haemostasis* 1996; 75: 865-9.

Mirzadeh K, Tabatabaei S, Bojarpour M, Mamoei M. Comparative Study of Hematological Parameters According Strain, Age, Sex, Physiological Status and Season in Iranian Cattle. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2010; 9:

2123-7.

Mischke R (2003) *Praktische Hämatologie bei Hund und Katze*. Hannover, Schlütersche GmbH & Co. KG

Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cell to platelets. *Blood Coagulation and Fibrinolysis: an International Journal in Haemostasis and Thrombosis* 1996; 7: 459-64.

Moriki T, Murata M, Kitaguchi T, Anbo H, Handa M, Watanabe K, Takahashi H, Ikeda Y. Expression and functional characterization of an abnormal platelet membrane glycoprotein Ib alpha (Met239 --> Val) reported in patients with platelet-type von Willebrand disease. *Blood* 1997; 90: 698-705.

Muller F, Renne T. Platelet polyphosphates: the nexus of primary and secondary hemostasis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2011; 71: 82-6.

Murata M, Russell SR, Ruggeri ZM, Ware J. Expression of the phenotypic abnormality of platelet-type von Willebrand disease in a recombinant glycoprotein Ib alpha fragment. *The Journal of Clinical Investigation* 1993; 91: 2133-7.

Murugappa S, Kunapuli SP. The role of ADP receptors in platelet function. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library* 2006; 11: 1977-86.

Navarre CB, Kasari TR, Green RA. Platelet function defect in a 5-day-old Simmental calf. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1995; 9: 283-5.

Nesheim ME, Taswell JB, Mann KG. The contribution of bovine Factor V and Factor Va to the activity of prothrombinase. *The Journal of Biological Chemistry* 1979; 254: 10952-62.

Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003; 102: 449-61.

Nurden AT, Freson K, Seligsohn U. Inherited platelet disorders. *Haemophilia* 2012; 18 Suppl 4: 154-60.

Nurden P, Jandrot-Perrus M, Combrie R, Winckler J, Arocas V, Lecut C, Pasquet JM, Kunicki TJ, Nurden AT. Severe deficiency of glycoprotein VI in a patient with gray platelet syndrome. *Blood* 2004; 104: 107-14.

Nurden P, Nurden AT. Congenital disorders associated with platelet dysfunctions. *Thrombosis and Haemostasis* 2008; 99: 253-63.

Ogawa H, Tu CH, Kagamizono H, Soki K, Inoue Y, Akatsuka H, Nagata S, Wada T, Ikeya M, Makimura S, Uchida K, Yamaguchi R, Otsuka H. Clinical, morphologic, and biochemical characteristics of Chediak-Higashi syndrome in fifty-six Japanese black cattle. *American Journal of Veterinary Research* 1997; 58: 1221-6.

Othman M, Notley C, Lavender FL, White H, Byrne CD, Lillicrap D, O'Shaughnessy DF. Identification and functional characterization of a novel 27-bp deletion in the macroglycopeptide-coding region of the GPIBA gene resulting in platelet-type von Willebrand disease. *Blood* 2005; 105: 4330-6.

Othman M, Lopez JA, Ware J. Platelet-type von Willebrand disease update: the disease, the molecule and the animal model. *Expert Review of Hematology* 2011; 4: 475-7.

Padgett GA, Leader RW, Gorham JR, O'Mary CC. The Familial Occurrence of the Chediak-Higashi Syndrome in Mink and Cattle. *Genetics* 1964; 49: 505-12.

Paterson AD, Rommens JM, Bharaj B, Blavignac J, Wong I, Diamandis M, Wayne JS, Rivard GE, Hayward CP. Persons with Quebec platelet disorder have a

tandem duplication of PLAU, the urokinase plasminogen activator gene. *Blood* 2010; 115: 1264-6.

Pujol-Moix N, Hernandez A, Escolar G, Espanol I, Martinez-Brotons F, Mateo J. Platelet ultrastructural morphometry for diagnosis of partial delta-storage pool disease in patients with mild platelet dysfunction and/or thrombocytopenia of unknown origin. A study of 24 cases. *Haematologica* 2000; 85: 619-26.

Raccugli G. Gray Platelet Syndrome - Variety of Qualitative Platelet Disorder. *American Journal of Medicine* 1971; 51: 818-28.

Raczynski J. Retrospektive Analyse von Fällen von hämorrhagischer Diathese im Patientengut der Klinik für Wiederkäuer. Diss. med. vet. 2011. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Rand ML, Wang H, Bang KW, Teitel JM, Blanchette VS, Freedman J, Nurden AT. Phosphatidylserine exposure and other apoptotic-like events in Bernard-Soulier syndrome platelets. *American Journal of Hematology* 2010; 85: 584-92.

Reed AH, Henry RJ, Mason WB. Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. *Clinical Chemistry* 1971; 17: 275-84.

Reininger AJ, Heijnen HF, Schumann H, Specht HM, Schramm W, Ruggeri ZM. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood* 2006; 107: 3537-45.

Renne T, Nieswandt B, Gailani D. The intrinsic pathway of coagulation is essential for thrombus stability in mice. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2006; 36: 148-51.

Ribeiro JM. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annual Review of Entomology* 1987; 32: 463-78.

Rosa JP, George JN, Bainton DF, Nurden AT, Caen JP, McEver RP. Gray platelet syndrome. Demonstration of alpha granule membranes that can fuse with the cell surface. *The Journal of Clinical Investigation* 1987; 80: 1138-46.

Rosing J, Bevers EM, Comfurius P, Hemker HC, van Dieijen G, Weiss HJ, Zwaal RF. Impaired factor X and prothrombin activation associated with decreased phospholipid exposure in platelets from a patient with a bleeding disorder. *Blood* 1985; 65: 1557-61.

Russell SD, Roth GJ. Pseudo-von Willebrand disease: a mutation in the platelet glycoprotein Ib alpha gene associated with a hyperactive surface receptor. *Blood* 1993; 81: 1787-91.

Sandrock K, Knofler R, Greinacher A, Furll B, Gerisch S, Schuler U, Gehrisch S, Busse A, Zieger B. Novel Mutation in Bernard-Soulier Syndrome. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2010; 37: 278-84.

Sanz MG, Wills TB, Christopherson P, Hines MT. Glanzmann thrombasthenia in a 17-year-old Peruvian Paso mare. *Veterinary Clinical Pathology* 2011; 40: 48-51.

Satler K. Untersuchung von geschlechts-, rasse- und altersspezifischen hämatologischen Parametern. Diss. med. vet. 2011. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Savoia A, Pastore A, De Rocco D, Civaschi E, Di Stazio M, Bottega R, Melazzini F, Bozzi V, Pecci A, Magrin S, Balduini CL, Noris P. Clinical and genetic aspects of Bernard-Soulier syndrome: searching for genotype/phenotype correlations. *Haematologica* 2011; 96: 417-23.

Scharf RE. [Congenital and acquired platelet function disorders]. *Hamostaseologie* 2003; 23: 170-80.

Schenone M, Furie BC, Furie B. The blood coagulation cascade. *Current Opinion*

in Hematology 2004; 11: 272-7.

Searcy GP, Petrie L. Clinical and laboratory findings of a bleeding disorder in Simmental cattle. The Canadian Veterinary Journal 1990; 31: 101-3.

Searcy GP, Sheridan D, Dobson KA. Preliminary studies of a platelet function disorder in Simmental cattle. Canadian Journal of Veterinary Research 1990; 54: 394-6.

Searcy GP, Frojmovic MM, McNicol A, Robertson C, Wong T, Gerrard JM. Platelets from bleeding Simmental cattle mobilize calcium, phosphorylate myosin light chain and bind normal numbers of fibrinogen molecules but have abnormal cytoskeletal assembly and aggregation in response to ADP. Thrombosis and Haemostasis 1994; 71: 240-6.

Seyfert UT, Haubelt H, Vogt A, Hellstern P. Variables influencing Multiplate(TM) whole blood impedance platelet aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy individuals. Platelets 2007; 18: 199-206.

Shiraishi M, Kawashima S, Moroi M, Shin Y, Morita T, Horii Y, Ikeda M, Ito K. A defect in collagen receptor-Ca²⁺ signaling system in platelets from cattle with Chediak-Higashi syndrome. Thrombosis and Haemostasis 2002; 87: 334-41.

Soloviev MV, Okazaki Y, Harasaki H. Whole blood platelet aggregation in humans and animals: a comparative study. Journal of Surgical Research 1999; 82: 180-7.

Spornitz UM (2004) Anatomie und Physiologie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg. 509

Steficek BA, Thomas JS, Baker JC, Bell TG. Hemorrhagic diathesis associated with a hereditary platelet disorder in Simmental cattle. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 1993a; 5: 202-7.

Steficek BA, Thomas JS, McConnell MF, Bell TG. A primary platelet disorder of consanguineous simmental cattle. *Thrombosis Research* 1993b; 72: 145-53.

Stöber M, Gründer H. Kreislauf. In: *Die klinische Untersuchung des Rindes*. Rosenberger G, ed. Berlin: Paul Parey Verlag 1990: 171-241.

Stoll A. Fall-Kontroll-Studie auf betriebs- und Tierebene über Bovine Neonatale Panzytopenie in Deutschland. Diss. med. vet. 2013. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Sugo T, Hamaguchi A, Shimada T, Kato H, Iwanaga S. Mechanism of surface-mediated activation of bovine factor XII and plasma prekallikrein. *Journal of Biochemistry* 1982; 92: 689-98.

Sutherland RJ, Cambridge H, Bolton JR. Functional and morphological studies on blood platelets in a thrombasthenic horse. *Australian Veterinary Journal* 1989; 66: 366-70.

Suzuki-Inoue K, Ozaki Y, Kainoh M, Shin Y, Wu Y, Yatomi Y, Ohmori T, Tanaka T, Satoh K, Morita T. Rhodocytin induces platelet aggregation by interacting with glycoprotein Ia/IIa (GPIa/IIa, Integrin alpha 2beta 1). Involvement of GPIa/IIa-associated src and protein tyrosine phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 1643-52.

Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 2010; 468: 834-8.

Suzuki T, Goryo M, Inanami O, Uetsuki J, Saito S, Kaketa K, Oshima T, Shimizu H, Okabe S, Tanaka T, Kamata R, Shuto F, Sato I, Tachikawa E, Sakaguchi M, Kobayashi H, Okada K. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation in Japanese black cattle with inherited platelet disorder, Chediak-Higashi syndrome. *Journal of Veterinary Medical Science* 1996; 58: 647-54.

Taylor RF, Farrell RK. Light and Electron-Microscopy of Peripheral-Blood Neutrophils in a Killer Whale Affected with Chediak-Higashi Syndrome. Federation Proceedings 1973; 32: 822.

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

Toti F, Satta N, Fressinaud E, Meyer D, Freyssinet JM. Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder. Blood 1996; 87: 1409-15.

Tracy PB, Giles AR, Mann KG, Eide LL, Hoogendoorn H, Rivard GE. Factor V (Quebec): a bleeding diathesis associated with a qualitative platelet Factor V deficiency. The Journal of Clinical Investigation 1984; 74: 1221-8.

Valenzuela JG, Francischetti IM, Ribeiro JM. Purification, cloning, and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*. Biochemistry 1999; 38: 11209-15.

Wallen NH, Ladjevardi M, Albert J, Broijersen A. Influence of different anticoagulants on platelet aggregation in whole blood; a comparison between citrate, low molecular mass heparin and hirudin. Thrombosis Research 1997; 87: 151-7.

Wei ML. Hermansky-Pudlak syndrome: a disease of protein trafficking and organelle function. Pigment Cell Research 2006; 19: 19-42.

Weisser P, Korte W, Rohr S, Kioussis E, Riesen W, Stolla R. Simmental Hereditary Thrombocytopathia (SHT) as diagnosis in German Fleckvieh cattle. Praktischer Tierarzt 2010; 91: 236-44.

White JG. Ultrastructural studies of the gray platelet syndrome. *The American Journal of Pathology* 1979; 95: 445-62.

White JG. The Secretory Pathway of Bovine Platelets. *Blood* 1987; 69: 878-85.

White JG, Rao GHR, Bretonorius J. The Dense Tubular System Is Present in Bovine Platelets. *Thrombosis and Haemostasis* 1987; 58: 199-.

Wurtz M, Hvas AM, Kristensen SD, Grove EL. Platelet aggregation is dependent on platelet count in patients with coronary artery disease. *Thrombosis Research* 2012; 129: 56-61.

Yamakuchi H, Agaba M, Hirano T, Hara K, Todoroki J, Mizoshita K, Kubota C, Tabara N, Sugimoto Y. Chediak-Higashi syndrome mutation and genetic testing in Japanese black cattle (Wagyu). *Animal Genetics* 2000; 31: 13-9.

Zhu D. Mathematical modeling of blood coagulation cascade: kinetics of intrinsic and extrinsic pathways in normal and deficient conditions. *Blood Coagulation and Fibrinolysis: an International Journal in Haemostasis and Thrombosis* 2007; 18: 637-46.

Zucker-Franklin D, Benson KA, Myers KM. Absence of a surface-connected canalicular system in bovine platelets. *Blood* 1985; 65: 241-4.

Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Mechanism and function of changes in membrane-phospholipid asymmetry in platelets and erythrocytes. *Biochemical Society Transactions* 1993; 21: 248-53.

IX. ANHANG

Thrombozytopathie-Fragebogen

Datum: _____

Tier_ID: _____

Betrieb: _____ Tel.Nr. _____

HTA: _____ Tel.Nr. _____

Datum der Beprobung _____

Betroffenes Tier:

OM_Nr. _____

Geb.datum _____

Status (lebend/tot) _____

Abgangsursache _____

Verkauft → Name _____

Tel.Nr. _____

Verlauf in den letzten Wochen/Monaten

Körperliche Entwicklung: normal zurückgeblieben vermehrt krank

Hautblutungen nein ja wo _____post injectionem ja nein

wann _____

wie oft _____

wie lange _____

Grad _____

Abbildung 33: Fragebogen zur Erhebung der Entwicklung der Tiere mit HTS hinsichtlich Blutungsneigung, Körperkondition und Zuchtnutzung (Seite 1).

Blutiger Kot nein

ja wann _____

wie oft _____

wie lange _____

Grad _____

Petechien nein

ja wo _____

wann _____

wie oft _____

wie lange _____

Grad _____

Hämatome nein

ja wo _____

post injectionem ja nein

wann _____

wie oft _____

wie lange _____

Grad _____

Nasenbluten nein

ja wann _____

wie oft _____

wie lange _____

Grad _____

Abbildung 34: Fragebogen zur Erhebung der Entwicklung der Tiere mit HTS hinsichtlich Blutungsneigung, Körperkondition und Zuchtnutzung (Seite 2).

Behandlungen bezüglich Blutungsneigung _____

Geschlecht: männlich weiblich

→tragend ja nein Kalbetermin _____

→Schon mal gekalbt ja nein

→Verlauf der Kalbung _____

→Zustand des Kalbes _____

Weitere Tiere mit Blutungsneigung im Bestand nein ja

Aktuell nein ja

Ohrmarkennr. betroffener Tiere _____

getroffene Maßnahmen _____

In der Vergangenheit nein ja

Ohrmarkennr. betroffener Tiere _____

getroffene Maßnahmen _____

Abbildung 35: Fragebogen zur Erhebung der Entwicklung der Tiere mit HTS hinsichtlich Blutungsneigung, Körperkondition und Zuchtnutzung (Seite 3).

Entfernung des Betriebes von Oberschleißheim _____ km (>100km relevant für uns)

Interesse an erneuter Beprobung des betroffenen Tieres? ja nein

Termin für weitere Blutentnahme: _____

Besitzer plant, Tier zu verkaufen! ja nein

Interesse an einem Verkauf des Tieres an die Klinik zu Forschungszwecken? ja nein

Preisvorstellung: _____

Abbildung 36: Fragebogen zur Erhebung der Entwicklung der Tiere mit HTS hinsichtlich Blutungsneigung, Körperkondition und Zuchtnutzung (Seite 4).

Anschreiben für Probeneinsendungen im Rahmen der Abklärung von Blutungsneigungen bei Rindern

Datum des Tel.: _____ Datum Probenn.: _____ Probeneingang: _____

Hoftierarzt/Praxis:

Name: _____

Straße: _____

PLZ/Ort: _____

Telefonnr.: _____

Betrieb:

Name: _____

Straße: _____

PLZ/Ort: _____

Telefonnr.: _____

Informationen zum Tier:

Geburtsdatum: _____

Rasse: _____

Geschlecht: _____

Ohrmarkennr.: _____

(bitte vollständig)

Informationen zu den Elterntieren:

Mutter: _____

(bitte vollständige OM-Nr.) Rasse: _____

Vater: _____

(Name, bzw. OM-Nr. falls kein Besamungsbulle)

Rasse: _____

Muttervater: _____

(Name, bzw. OM-Nr. falls kein Besamungsbulle)

Rasse: _____

Symptome:

Erste Symptome/Datum: _____

- Hautblutungen: ja wo _____ nein
- nach Injektionen ja nein
- Blutiger Kot: ja Grad der Blutung _____ nein
- Petechien: ja wo _____ nein
- Hämatome: ja wo _____ nein
- nach Injektionen: ja nein
- Nasenbluten: ja Grad der Blutung _____ nein

Verlauf:

lebt noch verendet euthanasiert geschlachtet sezirt ja nein

Datum: _____ Datum: _____ Datum: _____

Blutproben: vom betroffenen Tier 1 EDTA (mind. 10ml) und 1 Serum (nicht mehr von Muttertier)

Bitte schicken an:

Labor
Klinik für Wiederkäuer
Blutungsneigung bei Rindern
Sonnenstraße 16
85764 Oberschleißheim

Telefonische Kontaktaufnahme:

Lisa Lüchtenborg: 089/2180 78972
Annette Pfitzner (ehemals Friedrich): 089/2180 78975
Carola Sauter-Louis: 089/2180 78976
Sekretariat: 089/2180 78850

Abbildung 37: Probeneinsendeformular bei Verdacht auf Blutungsneigung für Tierärzte.

Kurzinformation zur Thrombopathie

Dr. Hubert Pausch¹, Dipl.-Biol. Simone Jung¹, Dr. Annette Pfitzner², Prof. Ruedi Fries¹

¹Lehrstuhl für Tierzucht, Technische Universität München

²Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung, Ludwig-Maximilians-Universität München

Hintergrund

In den vergangenen Jahren wurden aus vielen Regionen Deutschlands Kälber verschiedener Rassen mit spontan auftretenden und lang anhaltenden Blutungen gemeldet. Dieses Symptom, das vor allem Kälber in den ersten Lebenswochen betraf, wurde als „Blutschwitzen“ bekannt. Da das Knochenmark betroffener Kälber geschädigt und die Anzahl der Thrombozyten (=Blutplättchen) deutlich reduziert war, bezeichnete man dieses Syndrom als „Bovine neonatale Panzytopenie (BNP)“. Es gilt als gesichert, dass die Verwendung eines speziellen Impfstoffes gegen BVD in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Auftreten von BNP steht. Im Rahmen der BNP-Untersuchungen wurden aber auch Tiere mit Blutungsneigung gemeldet, deren Blutbilder nicht den BNP-typischen Mangel an weißen und roten Blutplättchen aufwiesen. Die Anzahl der Thrombozyten war bei diesen Tieren vollkommen normal, jedoch war deren Funktion derart gestört (=Thrombopathie, TP), dass die Blutgerinnung betroffener Tiere massiv beeinträchtigt war (=Bluter). Im Gegensatz zu BNP litten auch ausgewachsene Tiere an TP. Es wurden ausschließlich Fleckvieh-Tiere mit TP diagnostiziert.

Genetische Charakterisierung

Angeborene Formen der Thrombopathie sind bei vielen Tierarten beschrieben, unter anderem auch bei Kanadischen Simmental Rindern. Fleckvieh galt bislang als nicht betroffen. Beim Fleckvieh wurden 32 Tiere mit der Verdachtsdiagnose TP genotypisiert und auf Genotypenebene mit allen gesunden Fleckvieh Tieren verglichen. Dadurch konnte ein kurzer Abschnitt im Genom (=Haplotyp) identifiziert werden, der bei allen betroffenen Tieren in reinerbigem Zustand vorliegt. Dies ist als

deutlicher Hinweis auf einen rezessiven Genort zu werten. Über weitere eingehende Untersuchungen konnte bei allen betroffenen Tieren eine homozygote Mutation identifiziert werden, die ursächlich für TP beim Kanadischen Simmental ist. Es besteht kein Zweifel, dass die untersuchten Fleckvieh Tiere von der rezessiv vererbten Thrombopathie betroffen sind.



Abbildung 1: Anhaltendes Nachbluten aus einer kleinen Wunde bei einem von der Thrombopathie betroffenen Kalb (Foto: PFITZNER, LMU).

Erscheinungsbild

Mischerbige (=heterozygote) Tiere sind nach aktuellem Wissensstand gesund. Aber auch reinerbige Tiere haben in der Regel ein ungestörtes Allgemeinbefinden, leiden aber nach Verletzungen, Injektionen oder chirurgischen Eingriffen an zum Teil massiven, lang anhaltenden Blutungen der Haut sowie Blutungen der Nase und Schleimhäute. Es kann auch zu blutigen Beimengungen im Kot und der Bildung von Blutergüssen kommen. Innere Blutungen können bei homozygoten Tieren bis

zum Tod führen. Bislang sind die Auslöser der Blutungsepisoden nicht vollständig geklärt, jedoch werden vermehrt in den Sommermonaten, wenn die Insektenpopulationen besonders groß sind, Kälber mit Blutungssymptomen gemeldet. Homozygote Tiere können aber durchaus auch das reproduktionsfähige Alter erreichen. Jedoch stellt insbesondere ein möglicher starker Blutverlust während der Abkalbung eine große Gefahr für betroffene Kühe dar. An der Klinik für Wiederkäuer wurden Blutungsepisoden betroffener Tiere erfolgreich mit Bluttransfusionen behandelt. Jedoch können nur die Symptome behandelt werden, langfristig ist die Krankheit nicht therapierbar.

Identifizierung von Anlageträgern

Der ursächliche Abschnitt im Genom wird zukünftig mit einem Haplotypentest über die routinemäßig erfassten SNP-Daten bei allen Kandidaten mit gültigem Genotyp abgefragt. Zu beachten ist, dass der Haplotypentest nicht zu 100% sicher ist und von Seiten der TU München und der ZuchtData keinerlei Haftungen für

etwaige Konsequenzen übernommen werden, die aus den Ergebnissen gezogen werden. Die Frequenz des Haplotyps in der Fleckvieh Population liegt bei rund 6%. Aufgrund des rezessiven Charakters der Mutation sind demnach bei Zufallspaarung vier betroffene Kälber je 1000 Anpaarungen zu erwarten. Durch die frühzeitige Identifizierung von Anlageträgern können zukünftig Risikoanpaarungen, bei denen Anlageträger auf der Vater- und Mutterseite im Pedigree stehen, vermieden werden. Dadurch kann das Risiko, dass Kälber mit gestörter Blutgerinnung auftreten, auf ein Minimum reduziert werden.

Anmerkung

Diese Ergebnisse entstanden in enger Zusammenarbeit mit Lisa Luchtenborg (Klinik für Wiederkäuer, LMU München) sowie Dr. Hermann Schwarzenbacher (ZuchtData, Wien).

Freising, am 24.09.2013

Abbildung 38: Kurzinformation zur Thrombopathie bei Fleckvieh-Rindern (HTS).

X. DANKSAGUNG

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer für die Überlassung des spannenden und interessanten Themas.

Großer Dank geht an Frau Dr. Annette Pfitzner, die meine Doktorarbeit betreute. Vielen Dank Annette für dein entgegengebrachtes Vertrauen, die Freiheit, die du mir in der Durchführung der Dissertation gegeben hast und die schnelle Bearbeitung von all den Dingen, die deine Hilfe benötigten.

Für die Erstellung meiner Datenbanken danke ich Frau Dr. Carola Sauter-Louis. Danke Carola, dass du uns im Endspurt der Doktorarbeit unterstützt hast.

Vielen Dank an das gesamte Bluterteam. Es hat Spaß gemacht mit euch zu arbeiten - in der Klinik und auch während der Arbeitswoche in Traunstein.

Großer Dank geht auch an das Tcp-Team unter der Führung von Herrn Prof. Dr. Ruedi Fries aus dem Lehrstuhl für Tierzucht der TU München in Freising. Danke für die Einführung in das Reich der Genetik und die gute Zusammenarbeit im Rahmen meiner Doktorarbeit. In dem Zusammenhang danke ich auch Simone Jung, die sich stets unserer Proben -auch bei zeitlichen Engpässen- angenommen hat. Danke Simone für die hilfreichen Telefonkonferenzen und Treffen, die auch gerne mal über den fachlichen Informationsaustausch hinaus gehen durften.

Tausend Dank gilt auch dem lieben Doktorandenteam (inkl. denjenigen, die die Karriereleiter mittlerweile eine Stufe aufgestiegen sind). Ohne euch wäre das Doktorandenleben einfach nicht das gewesen, was es war. Zu erwähnen sind auch die Durchwahlen 78832 und 78807, die stets zur Aufmunterung beigetragen haben.

Nicht zu vergessen sind alle Landwirte, die ihre Tiere und ihre Zeit für die Probennahmen zur Verfügung gestellt haben.

Vielen Dank an die Praxis Dr. Berchthold in Pittenhart und Maurice, die mir mit ausgewählten Betrieben den zweiten Teil meiner Doktorarbeit ermöglicht haben.

Danke auch an die Mitarbeiter der Besamungsstationen Grub in Poing und Neustatt an der Aich, ohne die es nur schwer möglich gewesen wäre, in kurzer Zeit genügend Blutproben von Bullen zur Ermittlung der Referenzwerte zu erhalten.

Besonderer Dank gilt auch unserem Laborteam, das sich stets um die Auswertung eingehender Blutproben gekümmert hat. Danke Frau Hartmann für so manche Überstunden, die Sie wegen meiner Blutproben auf sich nehmen mussten.