

Aus der Klinik für Endokrinologie, Diabetologie und Rheumatologie  
der Universitätsklinik Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. med. W. A. Scherbaum

**Epitopendichteverteilung  
von  
Glykoprotein IIb-IIIa, Ib, Fibrinogen und P-Selektin  
sowie  
Thrombozytenaggregate  
bei  
Normalprobanden, SLE- und APS-Patienten**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

Stéphanie Muriel Lehmann

2007

**Meiner Familie**

<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
1.1 Systemischer Lupus Erythematoses .....	3
1.2 Antiphospholipid Syndrom.....	6
1.3 Thrombozyten .....	8
1.3.1 Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation .....	8
1.4 Zielsetzung .....	13
<b>2 PROBANDEN, MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>14</b>
2.1 Probandenkollektiv.....	14
2.1.1 Probanden und Probandendaten .....	14
2.2 Blutentnahme.....	15
2.3 Versuchsprotokoll für die Probenaufbereitung der Epitopendichte und der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate.....	16
2.3.1 Präparation zur Bestimmung der Epitopendichte .....	16
2.3.2 Präparation zur Bestimmung der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate .	16
2.3.3 Materialien für die Versuche.....	18
2.4 Grundlagen der Flow-Cytometrie .....	18
2.5 Datenanalysen am Flow-Cytometer .....	19
2.5.1 Datenanalyse der Epitopendichte am Flow-Cytometer.....	19
2.5.2 Datenanalyse der Thrombozytenaggregate am Flow-Cytometer .....	20
2.6 statistische Auswertung .....	21
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>22</b>
3.1 Epitopendichtebestimmung der thrombozytären Ober-flächenmarker in den Kollektiven .....	22
3.1.1 Glykoprotein IIb-IIIa .....	22
3.1.2 Glykoprotein Ib .....	24
3.1.3 Fibrinogen .....	25
3.1.4 P-Selektin .....	27
3.1.5 Subgruppenanalysen.....	28
3.1.5.1 Antiphospholipid-Antikörper-Status und Oberflächenmarker.....	28
3.1.5.1.1 Anticardiolipin-Antikörper- und $\beta_2$ -Glykoprotein I Antikörper-Status bei SLE-Patienten und Oberflächenmarker .....	30
3.1.5.1.2 Anticardiolipin-Antikörper- und $\beta_2$ -Glykoprotein I Antikörper-Status bei APS-Patienten und Oberflächenmarker .....	32

3.1.5.2	Thrombosen bei APS-Patienten und Oberflächenmarker .....	33
3.1.5.3	Einfluß der Medikation auf die Oberflächenmarker .....	34
3.1.5.3.1	Thrombozytenaggregationshemmer und Antikoagulanzen .....	34
3.1.5.3.2	Immunsuppressiva und Malariamittel.....	36
<b>3.2</b>	<b>Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate in den Kollektiven.....</b>	<b>40</b>
3.2.1	Thrombozyten-Lymphozyten-Aggregate (TLA) .....	40
3.2.1.1	Anteile der TLA an der Gesamtpopulation der Lymphozyten .....	41
3.2.2	Thrombozyten-T-Lymphozyten-Aggregate (TTLA).....	42
3.2.2.1	Anteil der TTLA an der Gesamtpopulation der T-Lymphozyten.....	43
3.2.3	Thrombozyten-Granulozyten-Monozyten-Aggregate (TGMA).....	45
3.2.3.1	Anteil der TGMA an der Gesamtpopulation der Granulo- und Monozyten .....	46
3.2.4	Subgruppenanalysen.....	47
3.2.4.1	Antiphospholipid-Antikörper-Status und die Thrombozyten- Leukozyten-Aggregate .....	47
3.2.4.1.1	Anticardiolipin-Antikörper- und $\beta_2$ -Glykoprotein I Antikörper-Status bei SLE-Patienten .....	49
3.2.4.1.2	Anticardiolipin-Antikörper- und $\beta_2$ -Glykoprotein I Antikörper-Status bei APS-Patienten.....	51
3.2.4.2	Thrombosen bei APS-Patienten und die Thrombozyten-Leukozyten- Aggregate .....	53
3.2.4.3	Einfluß der Medikation auf die Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate .....	54
3.2.4.3.1	Thrombozytenaggregationshemmer und Antikoagulanzen .....	54
3.2.4.3.2	Immunsuppressiva und Malariamittel.....	56
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>59</b>
4.1	<b>P-Selektin als Aktivitätsparameter für Thrombozyten.....</b>	<b>59</b>
4.2	<b>Thromboembolische Ereignisse .....</b>	<b>63</b>
4.3	<b>Beobachtungen unter medikamentöser Therapie .....</b>	<b>63</b>
4.4	<b>Unschlüssige Daten .....</b>	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>74</b>

# Abkürzungen

ACL	Anticardiolipin-Antikörper	TLA	Thrombozyten-Lymphozyten-Aggregate
Ak	Antikörper	TRAP	Thrombin Rezeptor aktivierendes Peptid
ANA	antinukleäre Antikörper	TTLA	Thrombozyten-T-Lymphozyten-Aggregate
APL-Ak	Antiphospholipid-Antikörper	VDRL-Luestest	Veneral Diseases Research Laboratory-Luestest
APS	Antiphospholipid Syndrom	vs	versus
ARA	American Rheumatology Association	VWF	von Willebrand Faktor
ASS	Acetylsalicylsäure		
$\beta_2$ GPI	$\beta_2$ -Glykoprotein I		
CD	Cluster of Differentiation		
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting		
FITC	Fluorescein Isothiocyanat		
FSC	Forwardscatter/ Vorwärtsstreulicht		
G	Gauge		
GP	Glykoprotein		
GPL	IgG-Phospholipid-Ak		
INR	International normalized ratio		
kDa	Kilodalton		
LA	Lupus Antikoagulant		
MAD	mittlere Abweichung des Medians		
NSAR	nicht steroidale Antirheumatika		
pAPS	primäres Antiphospholipid Syndrom		
PBS	Protein Buffered Solution		
PE	Phycoerythrin		
PerCP	Perdinin Chlorophyll Protein		
sAPS	sekundäres Antiphospholipid Syndrom		
SLE	systemischer Lupus erythematodes		
SSC	Sidewardscatter/ Seitwärtsstreulicht		
TGMA	Thrombozyten-Granulozyten- Monozyten-Aggregate		



# 1 Einleitung

## 1.1 Systemischer Lupus Erythematoses

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) gehört zu den Kollagenosen und ist durch überwiegend nicht-organspezifische Autoantikörper, eine Vaskulitis und einer immunologisch medierten Schädigung des Bindegewebes unterschiedlichster Organe charakterisiert.

Schon früh wurde das so typische - über dem Nasenrücken auf beide Wangen sich symmetrisch ausbildende- Schmetterlingserythem beschrieben, das aber nur eine der vielen klinischen Manifestationen des SLE darstellt. Dieser kennzeichnende Ausschlag wurde erstmals von Hebra 1845 beschrieben. Die lateinische Bezeichnung Lupus bedeutet "Wolf" und wurde zur Beschreibung von Hautläsionen benutzt. Erste Verwendungen des Begriffes gehen auf das 13. Jahrhundert zurück. Der systemische Charakter des Lupus wurde erst im Jahre 1872 durch Moretz Karposi erkannt [29].

Heute ist bekannt, daß es sich bei dieser chronisch-entzündlichen Erkrankung unbekannter Ätiologie um eine nicht-organspezifische, systemische Autoimmunerkrankung handelt. Dies bedeutet, daß der SLE zu einer generalisierten Immunreaktion im Organismus führt, bei der exzessiv Autoantikörper durch aktivierte polyklonale B-Zellen produziert werden. Die multiplen Autoantikörper können sich gegen unterschiedlichste körpereigene Strukturen richten (Tabelle 1.1). Der daraus resultierende Entzündungsprozeß führt zur klinischen Symptomatik. Durch die sich ausbildenden Antigen-Antikörper-Komplexe kommt es mitunter zu Niederschlägen in den Gefäßen, die das Komplementsystem aktivieren. Die sonst geltende Toleranz gegenüber den körpereigenen Antigenen ist aufgehoben.

**Tabelle 1.1: Autoantikörper bei SLE [6]**

gegen Zelloberflächenantigene: Lymphozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten
gegen Zellkernsubstanzen ( <b>antinukleäre Antikörper</b> ): DNS, RNS, Histon, extrahierbare nukleäre Antigene ( <b>Sm-Protein</b> , Ribonukloproteine, etc.)
gegen Zytoplasmakomponenten: Mitochondrien, Ribosomen, Lysosomen, zytoplasmatische Glykoproteine (SS-A), zytoplasmatisches RNS-Protein (SS-B)
gegen Serumeiweißproteine: Immunglobuline (Rheumafaktor), Gerinnungsfaktoren (pro- und antikoagulatorisch wirksam)

Der systemische Lupus erythematoses weist eine Prävalenz von 8-50/100.000 auf, wobei unter Asiaten und Afroamerikanern die Prävalenz wesentlich höher liegt: 1/1000. Es erkranken vorwiegend junge Frauen (w:m = 9:1) zwischen dem 15. und

40. Lebensjahr. Die schubweise verlaufende Erkrankung mit Multisystemcharakter kann jedes Organsystem des Körpers befallen. Zu den in Mitleidenschaft gezogenen Organen zählen die Gelenke (>80 %), die Haut (>70 %), die serösen Häute (Pleura (>70 %), Pericard, Peritoneum), die Nieren (>70 %), das Herz (>60 %), das Nervensystem (>50 %), die Lungen (>40 %), der Gastrointestinaltrakt und das blutbildende System [6].

Unterschiedliche Verlaufsformen der Erkrankung sind bekannt. Es kann ein milder Verlauf vorliegen, bei dem kein oder nur ein Organ beteiligt ist, oder der SLE kann sich auch als fulminante Verlaufsform zeigen, bei der besonders die Nierenbeteiligung, thrombembolische Ereignisse und / oder die Affektion des zentralen Nervensystems letale Auswirkungen haben. Trotz dieser schweren Komplikationen liegt die 10 Jahresüberlebensrate heute um 90 % [47]. Die häufigste Todesursache ist heutzutage nicht mehr das Nierenversagen, sondern viel mehr sind es die schweren Infektionen, die durch den immunsuprimierten Zustand entstehen [37]. Die sekundäre Morbidität wird des weiteren von arteriosklerotischen Komplikationen angeführt [47]: Angina pectoris, Myokardinfarkt, zerebrale Insulte.

Die Diagnose eines SLE wird an Hand der klinischen Manifestationen gestellt. Unterstützend werden Laborparameter herangezogen, wobei der immunologischen Diagnostik eine große Bedeutung zukommt. Besonders wichtige Antikörper sind: ANA, Anti-DNA-Ak gegen Einzel- und Doppelstränge, Sm-Ak, Ro-Ak, La-Ak, U1RNP-Ak und APL-Ak ( $\beta_2$ -Glykoprotein I und ACL-Ak). Die Bestimmung des Titers der Anti-ds-DNA-Antikörper und der Komplementkonzentration (C3, C4, CH50) erlauben eine Beurteilung der Krankheitsaktivität. Eine niedrige Komplementkonzentration und ein hoher Anti-ds-DNA-Titer weisen auf eine hohe Krankheitsaktivität hin.

Den APL-Ak (Antiphospholipid-Antikörpern) kommt eine besondere Rolle beim SLE zu. Auch wenn ihre pathophysiologische Funktionsweise bis jetzt nicht vollständig geklärt ist, so steht dennoch fest, daß sie eine Untergruppe von SLE-Patienten charakterisieren, die durch thromboembolische Komplikationen gekennzeichnet sind. APL-Ak scheinen eine Aktivierung des Gerinnungssystems an mehreren Stellen zu verursachen und somit zu klinischen Symptomen von tiefer Beinvenenthrombose, Lungenarterienembolie, Schlaganfälle und anderen arteriellen und venösen Gefäßverschlüssen zu führen [16].

Um laut der 1982 überarbeiteten ARA-Kriterien (Tabelle 1.2) eine Erkrankung als SLE zu klassifizieren, müssen 4 der 11 ARA-Kriterien erfüllt werden [61]. Immer auszuschließen ist eine medikamenteninduzierte Genese durch z. B. Hydralazin, Hydantoin, Isoniazid oder Procainamid.

Tabelle 1.2: revidierte Kriterien für die Klassifikation des SLE [61], [38]

	Kriterium	Definition
1	Schmetterlingserythem	Erythem, flach oder erhaben über Wangen und Nasenrücken mit Aussparung der Nasolabialfalten
2	diskoide Hautveränderungen	erhabene gerötete, hyperkeratotische Effloreszenzen mit anhaftenden Schuppen; evtl. atrophische Narben nach Abheilung
3	Photosensibilität	Hauteffloreszenzen als gesteigerte Reaktion auf Sonnenexposition
4	Schleimhautulzera	orale oder nasopharyngeale Ulzerationen
5	Arthritis	nichterosive Arthritis von zwei oder mehr peripheren Gelenken
6	Serositis	Pleuritis – anamnestisch Schmerzen oder Pleurareiben oder Erguß oder Perikarditis – dokumentiert im EKG oder echokardiographisch oder Perikardreiben
7	Nierenbeteiligung	persistierende Proteinurie > 0,5 g/24 h oder Zylindurie
8	ZNS-Beteiligung	Krampfanfälle oder Psychosen
9	hämatologische Beteiligung	hämolytische Anämie mit Retikulozytose oder Leukopenie < 4000/mm <sup>3</sup> oder Lymphopenie < 1500/mm <sup>3</sup> oder Thrombopenie < 100000/mm <sup>3</sup> ohne auslösende Medikamente
10	immunologische Beteiligung	positives LE-Zell-Phänomen oder Antikörper gegen doppelsträngige DNS oder Nachweis von Antikörpern gegen Sm-Nukleoproteine oder falsch positive Lues-Serologie
11	antinukleäre Antikörper	erhöhte Titer in der indirekten Immunfluoreszenz ohne auslösende Medikamente

Heutzutage stehen eine Reihe von Therapiemöglichkeiten zur Verfügung, die es ermöglichen den SLE zu behandeln. Sie verfolgen im wesentlichen zwei Hauptziele:

- Reduktion der Entzündung,
- Unterdrückung des Immunsystems, das für die Entzündung verantwortlich ist.

Zur Verfügung stehende Medikamente sind nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR), Glukokortikoide, Malariamittel und Immunsuppressiva. Die Diagnose des SLEs bedeutet nicht obligat, daß eine Therapie erfolgen muß. Die Indikation zur Therapie besteht bei Krankheitsaktivität. Dann erfolgt eine stadien- und aktivitätsabhängige Behandlung. Die NSAR kommen vorwiegend bei subjektiven Beschwerden und bei

Gelenksymptomatik zum Einsatz. Liegen Hautmanifestationen oder eine milde Arthritis vor, so wird mit den sehr effektiven Malariamitteln therapiert, die ebenfalls Krankheits-schübe verhindern helfen können. Die Glukokortikoide haben sich sowohl bei schweren Manifestationen in hohen Dosen in Kombination mit Immunsuppressiva als auch in niedriger Dosis bei milden nicht lebensgefährlichen Manifestationen und zur Erhaltungstherapie gut bewährt. Bei sehr schweren Organmanifestationen z. B. Lupusnephritis werden die Immunsuppressiva sehr effektiv eingesetzt [17]. Trotz dieser Therapieoptionen ist man noch immer nicht in der Lage den SLE zu heilen! Aber die Überlebensrate konnte um ein wesentliches verlängert werden.

## 1.2 Antiphospholipid Syndrom

Das Antiphospholipid Syndrom (APS) wurde erstmals 1983 von Hughes beschrieben [22]. Damals wurde es definiert durch Thrombosen, rezidivierende Aborte, neurologische Manifestationen und Antiphospholipid-Antikörper. Im Laufe der folgenden Jahre kristallisierte sich immer mehr heraus, daß dieses Syndrom sich als Konstellation folgender Manifestationen beschreiben ließ: rezidivierende venöse oder arterielle Thrombosen, Thrombozytopenie, Aborte und wiederholt gemessene erhöhte Titer an Antiphospholipid-Antikörpern (APL-Ak) [20]. 1998 wurden die Kriterien für das APS überarbeitet [64], welches dazu geführt hat, daß die Thrombozytopenie aus der Definition des APS herausfiel (Tabelle 1.3). Demnach liegt ein APS vor, wenn mindestens ein klinisches und ein laborchemisches Kriterium vorhanden sind. Auch wenn das Vollbild dieser Erkrankung erstmals bei SLE-Patienten beschrieben worden ist, stellte sich schon bald heraus, daß die meisten der APS-Patienten keine oder sehr wenige der ARA-Kriterien erfüllen [61]. Von daher wurde kurz darauf das APS als eigenständige Erkrankung angesehen und als primäres APS (pAPS) bezeichnet [2]. Tritt es jedoch im Rahmen einer anderen Autoimmunerkrankung auf, so wird es als sekundäres APS (sAPS) angesehen. Am häufigsten ist das APS mit dem SLE vergesellschaftet. In der Literatur werden auch nach Jahren Übergänge vom pAPS zum SLE beschrieben [9]. Die Geschlechtsverteilung beim APS liegt mit 3-7:1 (w: m) nicht so hoch auf der Seite der Frauen wie beim SLE. Genauso wie beim SLE liegt eine krankhafte Produktion von Autoantikörpern vor.

Anfangs wurde eine paradoxe Erscheinung bei SLE-Patienten festgehalten: bei laborchemischen Testen trat eine verlängerte Gerinnung auf, wohingegen klinisch eine Thromboseneigung imponierte. Auch ein falsch-positiver VDRL-Luestest kennzeichnete diese Patienten. Später erkannte man, daß Antikörper, Lupus Antikoagulans (LA) genannt, die gegen einen Komplex aus Phospholipid und Plasmabestandteil gerichtet sind, zu dieser pathologischen Verlängerung der Gerinnungszeit führen.

Tabelle 1.3: Klassifikationskriterien für das Antiphospholipid-Syndrom [66]

klinische Kriterien	laborchemische Kriterien
Radiologisch oder histopathologisch gesicherte arterielle oder tiefe venöse Thrombosen oder Embolien	Zweimalig positiver Anticardiolipin-Antikörper-Nachweis mittels ELISA in einem Zeitintervall von mindestens 6 Wochen
rezidivierende Aborte morphologisch normaler Feten oder Säuglinge	Zweimalig positiver Lupus Antikoagulans-Nachweis in einem Zeitintervall von mindestens 6 Wochen

Antiphospholipid-Antikörper sind zwar für das APS typisch, aber sie treten auch bei anderen Erkrankungen ohne APS-Symptomatik auf, wie z.B. bei anderen rheumatischen Erkrankungen und bei Infektiösen Erkrankungen (Syphilis, HIV). Zu diesen Antiphospholipid-Antikörpern zählen die Anticardiolipin-Antikörper (ACL), die Anti-Phosphatidylserin-Antikörper, die Anti- $\beta_2$ -Glykoprotein I Antikörper ( $\beta_2$ GPI) und das Anti-Prothrombin. Da sie mit den Gerinnungsfaktoren um die Phospholipide konkurrieren, kommt es in vitro zu der beobachteten Verlängerung der Gerinnungszeit. In vivo liegt am Verletzungsort jedoch eine solch hohe Konzentration an Phospholipiden vor, daß es zu keinerlei Beeinträchtigung der Gerinnungsreaktion kommt.

Wie beim SLE ist auch beim APS die Therapie von der Klinik abhängig und nicht alleine vom Vorhandensein von Antiphospholipid-Antikörpern. Besondere Schwierigkeiten bereitet die Entscheidung über eine antikoagulative Therapie [34]. Da im Augenblick keine sicheren prädiktiven Parameter vorliegen, anhand derer entschieden werden kann, wer einer Antikoagulation bedarf und wer nicht, wird die Therapie von anderen Parametern maßgeblich beeinflusst:

- in welcher Gefäßprovinz hat sich ein Ereignis ereignet?
- wie häufig sind thromboembolische Ereignisse aufgetreten?
- wie schwer sind die Auswirkungen des Ereignisses?
- und welche sonstigen Begleiterkrankungen sind vorhanden?

Bei allen arteriellen Thrombosen bei bis dato blandem Verlauf werden Thrombozytenaggregationshemmer eingesetzt. Sind in der Vorgeschichte allerdings thromboembolische Ereignisse erhebbar, deren anderweitige Genese ausgeschlossen wurde, so wird eine konsequente, lebenslängliche intensive (INR >3,0) orale Antikoagulation durchgeführt, um weiteren Ereignissen vorzubeugen [27]. Bei Thrombosen im venösen Schenkel sind die Thrombozytenaggregationshemmer unwirksam, so daß dort mit Heparinen und Kumارين auf die plasmatische Gerinnung Einfluß genommen werden muß. In jedem Einzelfall muß - wie oben bereits erwähnt - die Indikation streng überprüft werden.

## 1.3 Thrombozyten

Man geht heute davon aus, daß alle hämatopoetischen Zellen von einer pluripotenten Stammzelle des Knochenmarkes abstammen. Von ihr ausgehend entwickeln sich die lymphoide und die myeloide Stammzelle, wobei die erstere für die Lymphozytäre und die letztere für die granulozytäre, erythrozytäre und megakaryozytäre Zellreihe verantwortlich ist. Durch stete Teilung des Zytoplasmas der Megakaryozyten im Knochenmark entstehen kernlose, glatte, diskoide Fragmente mit allen Zellorganellen und RNA-Resten: die Thrombozyten. Pro Megakaryozyt entstehen ungefähr 4.000 Thrombozyten. Im peripheren Blut eines Menschen zirkulieren normalerweise zwischen 150.000 und 400.000 Thrombozyten/ $\mu\text{l}$ . Bei den Thrombozyten handelt es sich um die kleinsten Blutpartikel mit einem Durchmesser von 1-2  $\mu\text{m}$ . Sie besitzen eine Lebensdauer von 7-10 Tagen. Danach werden sie vor allem im retikuloendothelialen System der Milz und der Leber abgebaut.

Ihre Aufgabe im menschlichen Kreislauf besteht in der Aufrechterhaltung der primären Blutstillung. Als stets aufmerksame Wächter zirkulieren sie von einander getrennt in nicht aktiviertem Zustand in engem Kontakt zum Endothel. Die Thrombozyten weisen jedoch keinen direkten Zell-Zell-Kontakt zum Endothel auf. Dieser wird durch die antithrombogenen Substanzen des Endothels verhindert sowie durch die jeweils negativ geladenen Zelloberflächen. Kommt es zu einem Gefäßschaden, welcher eine Aufhebung der endothelialen Integrität darstellt, so fallen die schützenden antithrombogenen Eigenschaften des Endothels aus, was in einer Thrombusbildung resultiert. Die Thrombusbildung erfolgt über mehrere Reaktionsschritte, auf die im Folgenden weiter eingegangen wird:

1. Thrombozytenadhäsion,
2. flächenhafte Ausbreitung der Thrombozyten,
3. Aktivierung der Thrombozyten,
4. Thrombozytenaggregation.

Die freigelegte subendotheliale Matrix stellt einen physiologischen Stimulus für die Thrombozyten zur Adhäsion als Monolayer an die defekte Stelle dar. Die Adhäsion wird durch diverse Rezeptoren mediiert, deren Zustand komplexen Regulationsmechanismen unterliegt. Diese Glykoproteine erlauben dem Thrombozyten eine Kommunikation mit seiner Umgebung. Sie befähigen ihn zu Zell-Zell- oder Zell-Substrat-Interaktionen. Die wichtigsten thrombozytenspezifischen Glykoproteinkomplexe sind das Glykoprotein Ib-V-IX (GPIb-V-IX) und das Glykoprotein IIb-IIIa (GPIIb-IIIa).

### 1.3.1 Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation

Eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion spielt der GPIb-IX-V-Komplex (Tabelle 1.4) [4].

Tabelle 1.4: Thrombozytenspezifische Glykoproteine

	GPIb-V-IX	GPIIb-IIIa	P-Selektin
CD-Klassifikation	CD 42b	CD 41a	CD 62p
Struktur	Ib $\alpha$ Ib $\beta$ V/IX	$\alpha$ IIb $\beta$ 3	Einzelstrang
Familie	leuzinreiche Glykoproteine	Integrine	Selektine
Molekulargewicht (MG)	GP Ib 170 kDa GP V 80 kDa GP IX 20 kDa	GP IIb 135 kDa GP IIIa 95 kDa	140 kDa
Anzahl der Rezeptorkopien/ Thrombozyt	20000-25000	40000-80000 häufigster Rezeptor an der Thrombozytenoberfläche	ruhender Thrombozyt: 800 aktivierter Thrombozyt: 10000-13000
Vorkommen	gleichmäßig verteilte, lineare Anordnung auf der Thrombozytenoberfläche [4]	Thrombozytenoberfläche $\alpha$ -Granula der Thrombozyten Endothelzellen Fibroblasten Leukozyten [28]	$\alpha$ -Granula der Thrombozyten Thrombozytenoberfläche Weibel-Palade-Bodies des Endothels
Ligand	VWF  Thrombin	Fibrinogen VWF Vitronektin Fibronektin Thrombospondin	Kohlenhydrate
Funktion	Adhäsion  Aktivierung durch Bindung von Thrombin	Aggregation Adhäsion bei hoher Strömungsgeschwindigkeit bidirektionale Signaltransduktion	Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion
klinisches Krankheitsbild bei Defekt	Bernard-Soulier-Syndrom	Thrombasthenie Glanzmann	?

Bei diesem Komplex handelt es sich um ein transmembranes leuzinreiches Glykoprotein, das aus mehreren Komponenten aufgebaut ist. Es besteht zum einen aus dem GPIIb-IX Heterodimer und zum anderen aus dem GPV. Beide zusammen bilden einen Komplex, der im Verhältnis 1:2 GPIIb-IX zu GPV zueinander steht. Das GPIIb-IX tritt im Verhältnis 1:1 auf. Es ist nichtkovalent miteinander verbunden. Die primäre und wichtigste Aufgabe dieses Rezeptorkomplexes ist die Bindung des Adhäsivproteins Von-Willebrand-Faktor (VWF). Bei einer Verletzung eines Gefäßes bindet der VWF an Kollagenkomponenten der Extrazellulärmatrix. Die Immobilisation des VWF führt zur Freilegung von Bindungsstellen für den GPIIb-IX-Komplex. Ohne die Bindung des VWFs an die subendotheliale Matrix kann keine Bindung des GPIIb-V-IX erfolgen.

Angeführt seien die zwei seltenen klinische Krankheitsbilder bei Defekt des jeweiligen Glykoproteins. Das komplette Fehlen oder die Funktionsunfähigkeit des GPIIb-V-IX-Komplexes führen zu dem nach seinen beiden Erstbeschreibern benannten, autosomal-rezessiv vererbten Bernard-Soulier-Syndrom. Bei dieser angeborenen Blutungsneigung binden die Thrombozyten den VWF nicht und können demzufolge nicht am Subendothel adhären. Eine stabile Thrombusbildung bleibt somit aus. Beim anderen Krankheitsbild handelt es sich um die Thrombasthenia Glanzmann, bei der der GPIIb-IIIa-Komplex defekt ist. Dieser Defekt führt dazu, daß die Thrombozyten kein Fibrinogen binden und nur reversible Thrombozytenaggregate bilden können. Die Folgen dieser angeborenen autosomal-rezessiv vererbten Blutungsneigung sind schwere Schleimhautblutungen.

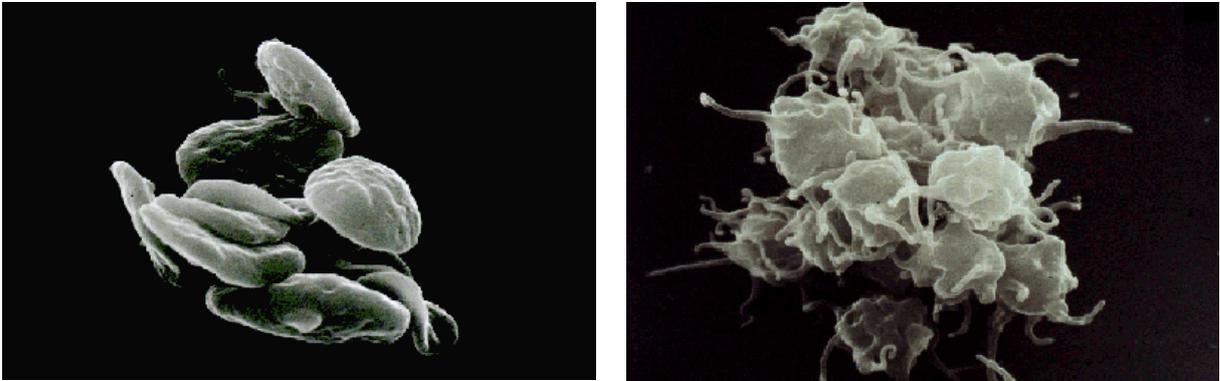
Die reversible VWF-GPIIb-Bindung ist durch eine hohe Dissoziationsrate gekennzeichnet. Dieser Prozeß des immer wieder neuen Anhaftens wiederholt sich auf der gesamten Strecke der Verletzung und führt zu einer Verlangsamung der Thrombozyten-Geschwindigkeit und induziert die Aktivierung des GPIIb-IIIa. Die Aktivierung ermöglicht die Entstehung einer irreversiblen Bindung zwischen dem VWF und dem aktivierten GPIIb-IIIa. Von besonderer Bedeutung ist diese Bindung, wenn hohe Strömungsgeschwindigkeiten vorliegen z.B. in kleinen Kapillaren, an Stenosen. Nur diese hochaffine Bindung ist stark genug eine stabile Interaktion zwischen VWF und Thrombozyt herzustellen. Ohne die vorhergehende Aktivierung des GPIIb-IIIa wäre diese Verbindung nicht möglich, da das nicht aktivierte GPIIb-IIIa nur eine Erkennungsspezifität für gebundenes Fibrin oder Fibrinogen aufweist.

Die Thrombozytenaktivierung induziert mehrere Ereignisse:

- die Umgestaltung des Thrombozyten von ihrer diskoiden zu einer amöboiden pseudopodientragenden Gestalt [28] (Abbildung 1.1),
- die Sekretion thrombozytären Inhaltsstoffe aus den  $\alpha$ -Granula und damit die Externalisation des P-Selektins und weiterer GPIIb-IIIa-Rezeptoren [1]
- Bindung löslicher Adhäsionsmoleküle.

Unter niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten verläuft die Adhäsion nicht über den VWF-GPIIb-Komplex, sondern unter der Beteiligung von Fibrinogen. Es bindet an den Endotheldefekt und ermöglicht durch die folgende Konformationsänderung die direkte Bindung des GPIIb-IIIa. Die primäre Aufgabe des GPIIb-IIIa liegt in der

Bindung seines wichtigsten Liganden, Fibrinogen, aber auch von VWF, Fibrin, Fibronektin und Vitronektin. Eine sekundäre Rolle kommt ihm bei der Thrombozytenadhäsion unter hohen Strömungsgeschwindigkeiten zu, wie bereits oben dargestellt.



**Abbildung 1.1 [19]:** ruhende und aktivierte Thrombozyten in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme; links ruhende diskoidale Form, rechts aktivierte pseudopodientragende Form

Das GPIIb-IIIa ist ein Calcium-abhängiges 1:1 Heterodimer aus der Familie der Integrine, das mit 40000 bis 80000 Kopien auf der Oberfläche der Thrombozyten vorhanden ist. Es stellt einen der häufigsten Rezeptoren auf der thrombozytären Oberfläche dar. Seinen Liganden kann es unter unterschiedlichen Bedingungen binden. Im ruhenden Zustand kann er gebundenes Fibrinogen oder Fibrin binden. Im aktivierten Zustand, der durch eine Konformationsänderung des GPIIb-IIIa-Komplexes gekennzeichnet ist, kann er gelöstes Fibrinogen und Fibrin sowie andere Liganden binden. Über die Bindung zum Fibrinogen können Thrombozyten irreversibel gebunden werden. Die Irreversibilität dieser Bindung kommt durch die besonders schnelle Veränderung der Zytoskelettorganisation zustande.

Bei der Aktivierung kommt es zur Freisetzung von Substanzen aus den intrazellulären Granula, die in der Zirkulation befindliche Thrombozyten rekrutieren. Die über das Fibrinogen und den VWF entstehenden Vernetzungen zwischen den einzelnen Thrombozyten bauen sich weiter aus, so daß Aggregate entstehen, deren Größe unter anderem von der Intensität der Sekretion der Thrombozyten abhängt. Die entstandenen Bindungen dienen der augenblicklichen Aggregation und damit der akuten Blutstillung.

Untersuchungen haben gezeigt, daß in älteren Thromben (ab 15 Minuten) die Zellinteraktionen nicht mehr zum Hauptteil durch GPIIb-IIIa vermittelt werden [43]. Statt dessen sind die Zellen untereinander durch P-Selektin verbunden. Es wird davon ausgegangen, daß die initiale Bindung über das GPIIb-IIIa der Überbrückung bis zur Externalisation des P-Selektins aus den  $\alpha$ -Granulae dient und dafür sorgen soll, daß die Thrombozyten sich nahe genug beieinander befinden, damit die Interaktion über P-Selektin überhaupt stattfinden kann. Die Größe und Stabilität der Thrombozytenaggregate wird im Wesentlichen durch das P-Selektin bestimmt [43].

Beim P-Selectin (CD62, GMP 140, PADGEM) handelt es sich um einen Angehörigen aus der Familie der Selektine (Tabelle 1.4). Zu dieser Familie gehören außer dem

P-Selektin noch das L-Selektin und das E-Selektin, die ebenfalls Zell-Zell-Interaktionen medieren.

P-Selektin wird auf den ruhenden Thrombozyten nur in geringem Maße exprimiert (ca. 800 Kopien/Thrombozyt). Sein Vorkommen ist nicht auf die Thrombozyten beschränkt, da es auch noch in den Weibel-Palade-Bodies der Endothelzellen vorkommt und zur Interaktion der Endothelzellen mit den Leukozyten beiträgt.

Der Speicherort in den Thrombozyten sind die  $\alpha$ -Granula. Nach Aktivierung des Thrombozyten verschmelzen innerhalb von Sekunden die Granula mit der Thrombozytenaußenmembran, so daß das P-Selektin nach Aktivierung mit ungefähr 10000 bis 13000 Molekülen an der Oberfläche nachweisbar ist. Dies ermöglicht, aktivierte Thrombozyten innerhalb eines gewissen Zeitintervalls zu identifizieren. Die maximale Expression des P-Selektin ist nach 10 Minuten erreicht. Danach verlieren die Thrombozyten das P-Selektin wieder [44].

Eine weitere Aufgabe des P-Selektins besteht in der Mediierung der Interaktion der Thrombozyten mit den Leukozyten und dort besonders mit den Monozyten und in geringerem Umfang mit den Neutrophilen. In Studien konnte gezeigt werden, daß der Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten eine wesentlich größere Bedeutung beizumessen ist, um Aussagen über den Aktivitätszustand der Thrombozyten zu treffen, als der alleinigen Meßbarkeit des P-Selektins an der Thrombozytenoberfläche. Monozyten-Thrombozyten-Aggregate sind ein wesentlich sensitiverer Marker für eine in vivo Aktivierung der Thrombozyten als das externalisierte P-Selektin alleine [45]. Damit haben die Monozyten-Thrombozyten-Aggregate das P-Selektin als Goldstandard für die Thrombozyten-Aktivierung abgelöst [45].

## 1.4 Zielsetzung

Wie in vorangehenden Kapiteln beschrieben, weisen SLE- und APS-Patienten gehäuft thromboembolische Ereignisse auf. Diese stellen heute noch immer vital bedrohliche Situationen dar, gegen die therapeutisch vorgegangen werden kann, nachdem sie sich manifestiert haben. Bisher kann allerdings noch nicht vorhergesagt werden, welcher Patient gefährdet ist, ein solches Ereignis zu erleiden. Retrospektive Studien haben gezeigt, daß ganz besonders Patienten mit hochtitrigen positiven IgG-Antiphospholipid-Antikörper-Titern ein erhöhtes Risikopotential besitzen.

Da allerdings Antiphospholipid-Antikörper nicht obligat zu Thrombosen oder Embolien führen, stellt sich das Problem einer Prophylaxe. Eine antithrombotische Primärprophylaxe – wie sie bei diesen Patienten durchzuführen wäre –, ist mit erheblichen Risiken für Nebenwirkungen verbunden. Demzufolge werden immer wieder Versuche unternommen, sensitivere und spezifischere Kriterien für die Definition von Risikopatienten zu erarbeiten.

Vor diesem Hintergrund sind an drei Kollektiven (Normalprobanden, SLE- und sAPS-Patienten) die hier folgenden Untersuchungen durchgeführt worden:

- Messung der Epitopendichte thrombozytenspezifischer Glykoproteine, des P-Selektins und die Bindungsrate des Fibrinogens: lassen sich spezifische Oberflächenprofile für jedes Kollektiv erarbeiten?
- Bestimmung der Epitopendichten unter unterschiedlichen Therapieregimen: liegen unterschiedliche Oberflächenprofile bei einem Kollektiv unter verschiedenen Therapien vor?
- Epitopendichte und thromboembolische Ereignisse: besteht ein Zusammenhang?
- Messung der Aggregation von Thrombozyten und Leukozyten: unterscheiden sich die Kollektive in der Aggregatbildung?
- Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate unter unterschiedlichen Therapieregimen: zeigen sich Unterschiede im Aggregationsverhalten unter verschiedenen Therapien?
- Thrombozyten-Aggregate und embolische Ereignisse: zirkulieren vermehrt Aggregate bei Patienten mit anamnestischen thrombotischen Ereignissen?

Anhand dieser Marker sollen Aussagen über den Aktivitätszustand des Thrombozyten in den unterschiedlichen Kollektiven getroffen werden.

## 2 Probanden, Material und Methoden

### 2.1 Probandenkollektiv

Die untersuchten Probanden waren Gesunde, SLE- und APS-Patienten. Sowohl die SLE- als auch die APS-Patienten mußten für die Aufnahme in die Studie die jeweiligen Klassifikationskriterien erfüllen.

#### 2.1.1 Probanden und Probandendaten

Untersucht wurden 261 Probanden, die im Rahmen einer Lupus-Familienstudie einer Blutentnahme eingewilligt hatten. Die Probanden lassen sich in 3 Kollektive aufteilen (Tabelle 2.1). 113 gesunde Männer und Frauen bestehend aus Angehörigen der Patienten, Schülerinnen und Schüler der Krankenpflegeschule der Universität Düsseldorf sowie Mitarbeiter des Institutes wurden untersucht. Es wurden 148 Patienten rekrutiert, die mindestens 4 von 7 der 1982 überarbeiteten ARA-Kriterien erfüllen [61]. Sie definieren das Probandenkollektiv der SLE-Patienten. 33 dieser Patienten wiesen Symptome auf, die sie nach den 1998 definierten Kriterien als sAPS-Patienten klassifizierten [64]. Sie wurden aus dem Kollektiv der SLE-Patienten ausgegliedert und bilden ein eigenständiges Kollektiv. In die Untersuchung wurden Patienten integriert, die klar klassifizierbar waren. Aufgenommen wurden ambulante Patienten mit allen Verlaufs- und Komplikationsformen des SLEs und sAPSs und mit den unterschiedlichsten Therapiekonstellationen sowie unterschiedlich langer Therapiedauer.

Tabelle 2.1: Übersicht über die Probanden

Kollektive	Gesunde	SLE	sAPS
Anzahl	113 Probanden	115 Probanden	33 Probanden
Geschlechtsverteilung	w: 89 m: 24	w: 97 m: 18	w: 24 m: 9
Altersmedian	44,0 Jahre	35,0 Jahre	39,0 Jahre
minimales Alter	12 Jahre	15 Jahre	20 Jahre
maximales Alter	88 Jahre	78 Jahre	72 Jahre
ACL-positiv		22	26
ACL-negativ		72	6
ACL-Status nicht determiniert	113	21	1
$\beta_2$ GPI-positiv		7	23
$\beta_2$ GPI-negativ		70	8
$\beta_2$ GPI-Status nicht determiniert	113	38	2
Immunsuppressive Therapie	0	27	9
Malariamittel	0	19	4
Immunsuppressive und antimalarische Therapie	0	27	4
Antiaggregation / Antikoagulation	0	17 ASS  1 Phenprocoumon	16 ASS  1 Clopidogrel 11 Phenprocoumon

## 2.2 Blutentnahme

Die Blutentnahmen fanden unter standardisierten Bedingungen statt. Zwischen 8 und 12 Uhr wurde den Probanden nach 30 minütigem Ruhen Blut aus der leicht gestauten Vena mediana cubiti durch Punktion mit einem 18 G Butterfly entnommen. Die mit Citrat (1:10) antikoagulierten 4,5 ml peripheren Vollblutes wurden nach Entnahme innerhalb von 2 Stunden verarbeitet, um eine artifizielle Aktivierung der Thrombozyten auszuschließen. Zusätzlich zum Citratröhrchen wurden noch Serum- und Plasmaproben in den beiden Patientenkollektiven gewonnen, um weitere Parameter (ACL-Titer und  $\beta_2$ GPI) zu bestimmen. Der ACL-Titer wurde mittels ELISA der Firma Pharmacia & Upjohn Diagnostics (Freiburg, Deutschland) bestimmt. Wiederholte Werte über 15 GPL werden als pathologisch erachtet und als ACL-positiv gewertet.

$\beta_2$ GPI wurde ebenfalls mit einem Test von Pharmacia & Upjohn Diagnostics (Freiburg, Deutschland) bestimmt. Wiederholte Messungen über 8 GPL werden als pathologisch und damit  $\beta_2$ GPI positiv erachtet.

### **2.3 Versuchsprotokoll für die Probenaufbereitung der Epitopendichte und der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate**

Bevor das aufgestellte Protokoll (Abbildung 2.1) entstand, wurde in Vorversuchen (nicht gezeigt) die optimale Konzentration für jeden Versuch austitriert. Die im folgenden Diagramm verwendeten Angaben erwiesen sich als die besten im Hinblick auf ein optimales Antikörper-Thrombozyten- bzw. Antikörper-Leukozyten-Bindungsverhältnis.

#### **2.3.1 Präparation zur Bestimmung der Epitopendichte**

100  $\mu$ l Natriumcitrat antikoaguliertem Vollblut wurden 400  $\mu$ l PBS zugegeben. 20  $\mu$ l dieses verdünnten Blutes wurden entnommen. Es erfolgte die Zugabe von entweder 10  $\mu$ l PBS oder 10  $\mu$ l Stimulus (TRAP-6 30  $\mu$ M). Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die stimulierten und unstimulierten Oberflächenproteine mit entweder 10  $\mu$ l CD41-PE und 6  $\mu$ l CD62-FITC oder mit 6  $\mu$ l CD42b-PE und 0.5  $\mu$ l Fibrinogen-FITC markiert. Die Reaktion wurde nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln durch Lagerung auf Eis gestoppt, nachdem 1 ml kaltes PBS addiert worden war. Die Messung mittels Flow-Cytometers erfolgte innerhalb von einer Stunde.

#### **2.3.2 Präparation zur Bestimmung der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate**

100  $\mu$ l Natriumcitrat antikoaguliertem Vollblut wurden 900  $\mu$ l PBS zugegeben. 20  $\mu$ l dieses verdünnten Blutes wurden entnommen und die Antikörper dazugegeben. Es wurden in je 2 Reagenzgläser 5  $\mu$ l CD42 und 5  $\mu$ l CD3 oder 5  $\mu$ l CD42 und 5  $\mu$ l CD45 pipettiert. Nach 15 minütiger Inkubationszeit im Dunkeln bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von entweder 10  $\mu$ l TRAP-6 (30  $\mu$ Mol) zur Stimulation oder 10  $\mu$ l PBS zum Abgleichen des Volumens. Nach abermaliger Inkubation wurde 1 ml kaltes PBS addiert, und die Reaktion durch Lagerung auf Eis gestoppt. Innerhalb der darauffolgenden Stunde fand die Messung mittels FACSort<sup>®</sup> statt.

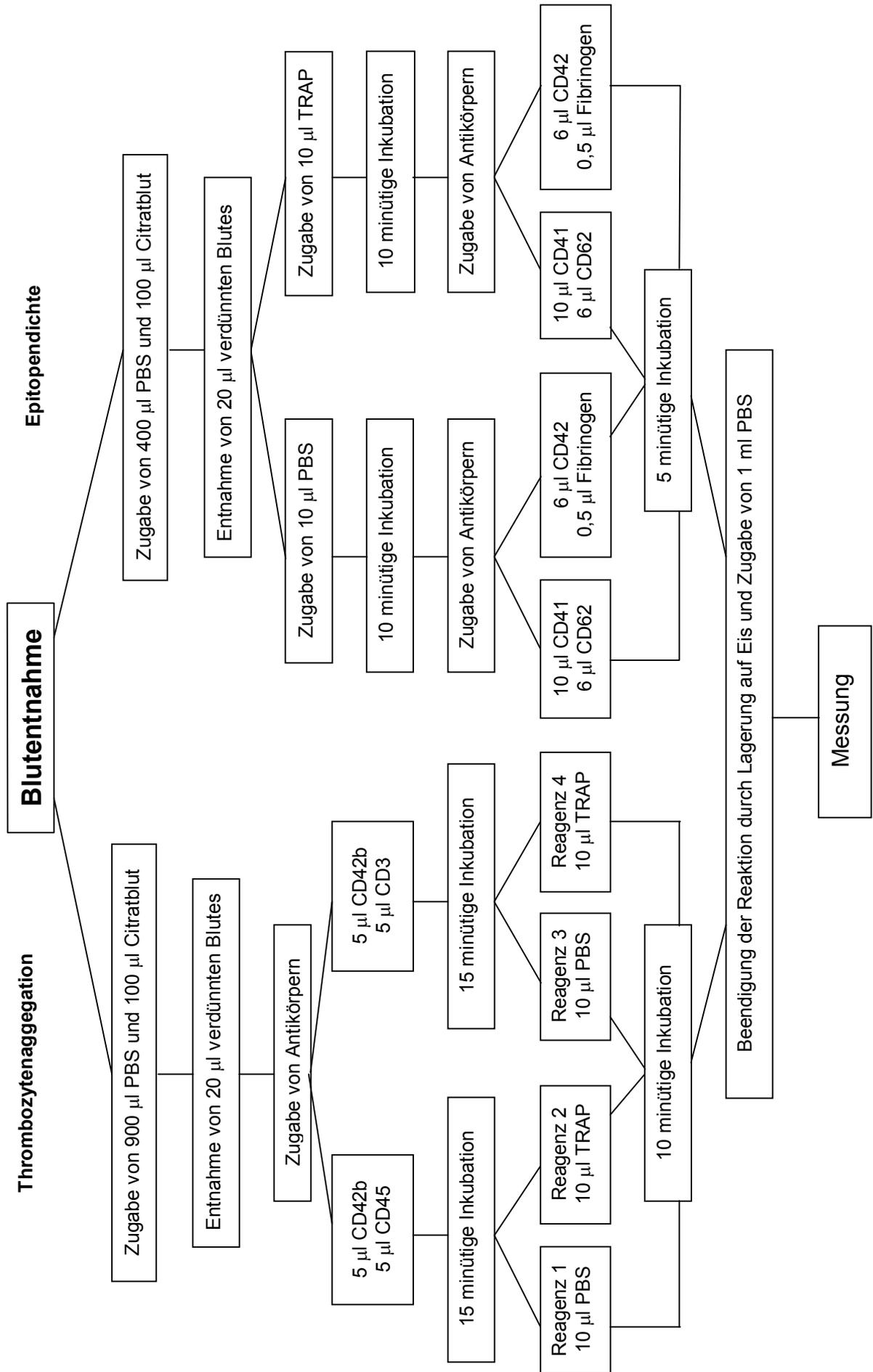


Abbildung 2.1: Versuchsprotokoll

### 2.3.3 Materialien für die Versuche

monoklonale Antikörper	Klon	Markierung	Hersteller
CD3	UCHT1	PC5 FITC	Coulter-Immunotech Krefeld, Germany
CD41a (gpIIb/IIIa)	P2	PE	Coulter-Immunotech Krefeld, Germany
CD42b (gpIb)	SZ2	PE	Coulter-Immunotech Krefeld, Germany
CD45	2D1	PerCP	Coulter-Immunotech Krefeld, Germany
CD62p (GMP-140)	CLB-Thromb/6	FITC	Coulter-Immunotech Krefeld, Germany
Fibrinogen		FITC	Dako Glostrup, Denmark
TRAP-6 (Thrombin receptor activating peptide)			Bachem Biochemica Heidelberg, Germany

## 2.4 Grundlagen der Flow-Cytometrie

Voraussetzung für die Analyse von Zellen im Flow-Cytometer sind standardisierte Präparationsverfahren, nach denen die zu untersuchenden Zellsuspensionen hergestellt werden. Um Störfaktoren so klein wie möglich zu halten und somit die Untersuchungsmethoden reproduzierbar zu machen, werden Präparationsprotokolle angewandt.

Das verwendete FACSort<sup>®</sup> Flow-Cytometer generiert mittels eines luftgekühlten Argon-Lasers Anregungslicht der Wellenlänge 488 nm. Für die obig beschriebenen Versuche wurden monoklonale Antikörper verwendet, die mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Phycerythrin (PE) oder Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) konjugiert sind und alle durch Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt werden. Diese Konjugate erzeugen Fluoreszenz, wobei jedes Konjugat sein eigenes Emissionsspektrum aufweist: FITC bei 525 nm, PE bei 578 nm und PerCP bei 680 nm. So können bei Doppeltmarkierungen gleichzeitig mehrere Informationen gewonnen werden. Die erzeugte Fluoreszenz wird mittels eines Kanals erfaßt, durch einen Photomultiplier verstärkt und in ein elektrisches Signal transformiert. Jedes untersuchte Partikel ergibt ein elektrisches Signal, das in einem Histogramm als Punkt festgehalten wird. Dementsprechend entstehen im Laufe einer Messung Punktwolken, die der Ansammlung von Partikeln mit ähnlichen Eigenschaften entsprechen.

## 2.5 Datenanalysen am Flow-Cytometer

Die Datenanalyse am Flow-Cytometer erfolgte sowohl für die Epitopendichte-Bestimmung als auch für die Thrombozytenaggregate mit CellQuest® Software (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA). Pro Einzelprobe wurden entweder 5000 Ereignisse oder 60 Sekunden lang Ereignisse gemessen. Als erstes wurde die gewünschte Zellenpopulation identifiziert und in einem Diagramm als Punktwolken dargestellt.

### 2.5.1 Datenanalyse der Epitopendichte am Flow-Cytometer

In einem ersten Histogramm (Abbildung 2.2 A:) werden auf der Abszisse der FSC logarithmisch und auf der Ordinate die FL2 ebenfalls logarithmisch aufgetragen. Zur Identifikation der gewünschten Population wird jeweils der Oberflächenmarker herangezogen, dessen Dichte am höchsten ist. Dies ist je nach Ansatz entweder CD 41 oder CD42. Entlang der Abszisse lagern sich Ereignisse ab, die durch eine geringe FL2-Fluoreszenz gekennzeichnet und unterhalb der R1 Region gelegen sind. Sie werden als Zelldebris deklariert und nicht weiter bei der sich anschließenden Auswertung berücksichtigt. Im hohen Fluoreszenzbereich der Ordinate liegen zwei unterschiedlich große Punktwolken (a und b), die den Thrombozyten entsprechen. Die Thrombozyten werden von einer Region (R1) umgeben, die erlaubt, weitere Diagramme aus den so eingekreisten Daten zu generieren.

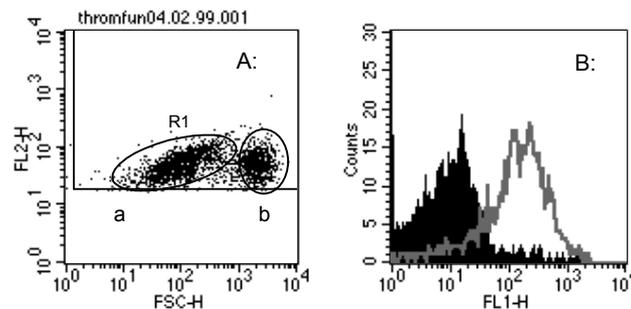
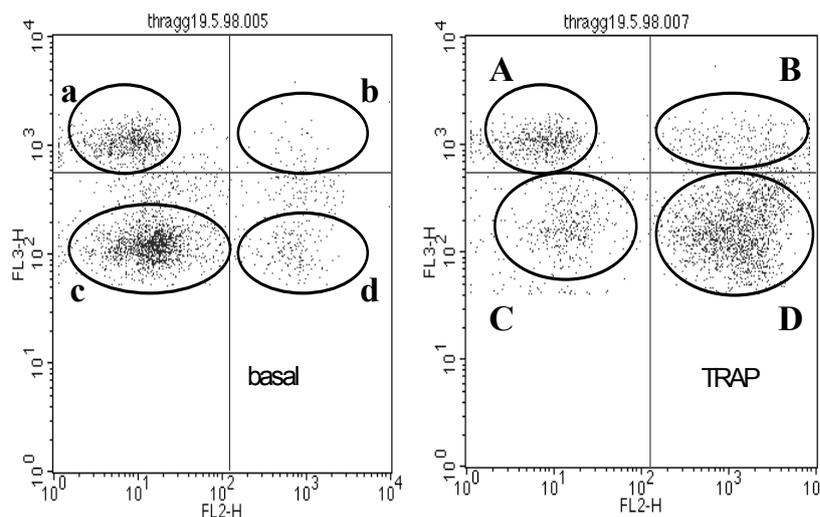


Abbildung 2.2: Darstellung der Epitopendichteanalyse; A: Darstellung der CD 41 positiven Zellen, B: Darstellung der CD 62 positiven Zellen aus A

Aus dieser Thrombozytenregion werden zwei jeweils eindimensionale Parameterhistogramme erstellt. In dem einen wird die FL1 logarithmisch vertikal und die Anzahl der Ereignisse horizontal abgetragen wie in Abbildung 2.2 B: veranschaulicht. In einem weiteren Histogramm (nicht dargestellt) werden auf der Abszisse die FL2 logarithmisch und auf der Ordinate die Ereignisse angezeigt. Mittels der Software werden aus den beiden zuletzt genannten Histogrammen die mittlere Anzahl der Ereignisse errechnet und angegeben. Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für die weiteren statistischen Berechnungen.

### 2.5.2 Datenanalyse der Thrombozytenaggregate am Flow-Cytometer

Als erstes erfolgte eine lineare Darstellung des FSC auf der Abszisse und des SSC auf der Ordinate in einem Zweiparameter-Punkthistogramm. Die unterschiedlichen Zellpopulationen wurden so nach ihrer Größe (Abszisse) und Granularität (Ordinate) dargestellt. In diesem Histogramm wurde das Gebiet der mittleren Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Leukozytenpopulation eingerahmt, das durch einen großen Zeldurchmesser gekennzeichnet und im rechten unteren Quadranten zu finden ist. Nur die darin enthaltenen Zellen sollten einer weiteren Analyse zugeführt werden. Im darauffolgenden Histogramm wurden die Fluoreszenzen logarithmisch gegeneinander aufgetragen. Die FL1 wurde horizontal, die FL2 vertikal abgetragen. Anhand der sich so aufteilenden Population konnte erneut eine Differenzierung vorgenommen werden. Auf der Abszisse wurden die CD 45 oder CD 3 positiven Zellen abgebildet, und auf der Ordinate kamen die CD 42 positiver Zellen zur Darstellung. Von Interesse sollten die Zellen sein, die eine hohe Expression an CD 42 haben, da es bei dieser Untersuchung um die Darstellung der Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate geht. Die so identifizierten Zellen wurden in einem folgenden Diagramm doppellogarithmisch abgebildet: FL2 Abszisse, FL3 Ordinate. Das Abbildung 2.3 veranschaulicht dies für die CD 45 positiven Zellen. Im linken Diagramm sind die Zellpopulationen im basalen Zustand dargestellt (a-d), im rechten handelt es sich um die gleichen Zellpopulationen im stimulierten Zustand (A-D).



**Abbildung 2.3:** Darstellung der Zellen mit CD 45- und CD 42-Expression unter basalen (a-d) und unter stimulierten (A-D) Bedingungen (a und A: Lymphozyten, b und B: Lymphozyten-Aggregate, c und C: Granulo- und Monozyten, d und D: Granulo- und Monozyten-Aggregate)

Anhand dieser Darstellung ergibt sich eine Aufteilung in unterschiedliche Populationen. In der Ansicht ergeben sich jeweils 4 Populationen (a-d und A-D) mit unterschiedlich hohen Fluoreszenzen. Werden in dieses Diagramm eine Horizontale und eine Vertikale gelegt, die im Lot aufeinander stehen mit ihrem Schnittpunkt in der Mitte des Diagramms, so entsteht eine 4-Felder-Statistik, in der die unterschiedlichen Populationen voneinander getrennt sind, wie dies bereits der Fall ist in Abbildung 2.3.

Im linken oberen Quadranten (a oder A) kommen Zellen mit einer hohen CD 45 oder CD 3 (nicht abgebildet) Fluoreszenz und einer geringen CD 42 Expression zu Liegen. Es handelt sich bei den CD 45 positiven Zellen um Lymphozyten und bei den CD 3 positiven um T-Lymphozyten. Bei den Zellen, die eine geringere CD 45 oder CD 3 Fluoreszenz aufweisen, handelt es sich bei den CD 45 positiven um Granulozyten oder Monozyten (c und C) und bei den CD 3 positiven um Lymphozyten. In den rechten Quadranten (b und d sowie B und D) liegen die jeweiligen Ereignisse mit Positivität für Leukozyten und Thrombozyten, denn diese Zellen weisen eine doppelpositive Markierung auf und sind damit als Aggregate der beiden Zellpopulationen anzusehen. Von jedem Quadranten wurde der Anteil der darin enthaltenen Zellen angegeben. In einem separaten Schritt wurde der prozentuale Anteil der Aggregate an der dazugehörigen Gesamtpopulation mittels einer Quadrantenstatistik ausgerechnet.

## 2.6 statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels StatView Version 5.01. Zuerst wurden die Verteilungseigenschaften der einzelnen Kollektive durch Darstellungen der Häufigkeitsverteilung in Histogrammen untersucht. Wegen der nicht normalverteilten Daten (Abbildung 3.1) schlossen sich die Bestimmung des Medians und der mittleren Abweichung des Medians (MAD) an, da diese Ausreißern gegenüber unempfindlich sind. Des Weiteren wurden zur Feststellung von Unterschieden in den Abweichungen der Mediane der unterschiedlichen Gruppen der Mann-Whitney U Test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von  **$p < 0,05$**  definiert. In den Tabellen sind diese Werte **fettgedruckt**. Wenn  $p < 0,01$  ist, wird in den folgenden Kapiteln von einem sehr signifikanten Wert gesprochen, bei  $p < 0,001$  von einem höchst signifikanten Wert. Sind die Werte nicht signifikant, weisen sie aber dennoch in eine Richtung, so wird bei einem  $p < 0,20$  von einem Trend gesprochen, der als stark bezeichnet wird, wenn  $p < 0,10$  ist. Trends sind in den Tabellen unterstrichen gekennzeichnet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Epitopdichtebestimmung der thrombozytären Oberflächenmarker in den Kollektiven

In den drei Kollektiven (APS-Patienten, Normalprobanden und SLE-Patienten) wurde auf den Thrombozyten die Dichteverteilung der Glykoproteine IIb-IIIa (CD 41a) und Ib (CD 42b), des P-Selektins (CD 62) und die Bindung des Fibrinogens untersucht. Die Ergebnisse werden in den folgenden Unterpunkten einzeln dargestellt.

#### 3.1.1 Glykoprotein IIb-IIIa

Zur Identifikation der thrombozytären Population wurde die Dichteverteilung des thrombozytenspezifischen Oberflächenproteins IIb-IIIa bestimmt. Bei der Darstellung der Meßwerte in nach Kollektiven getrennten Histogrammen ergibt sich die Verteilung (Abbildung 3.1) unter basalen Bedingungen.

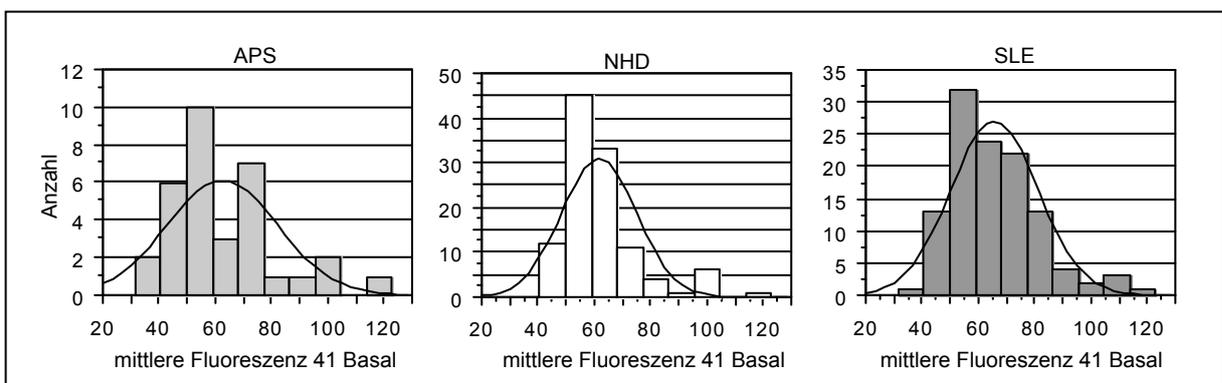
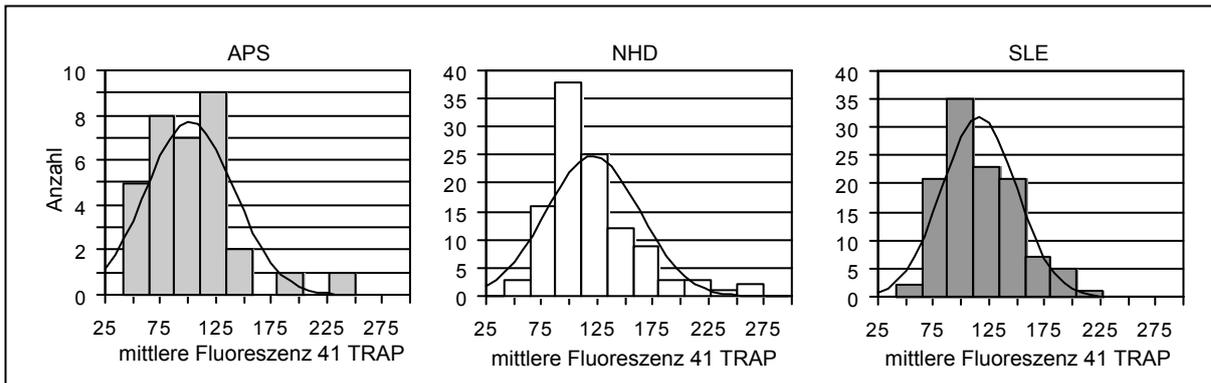


Abbildung 3.1: Histogramme der drei Kollektive zu CD 41 unter basalen Bedingungen

Bei dem Vergleich der eingezeichneten Gaußschen Normalverteilung (schwarze Linie) mit dem Histogramm fällt die Abweichung der Daten von der normalverteilten Kurve auf, wie dies bei experimentellen Versuchen in biologischen Systemen häufig der Fall ist. Dieser Verteilungstyp ergibt sich für alle Untersuchungen in allen Probandenkollektiven, wie es die Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2 exemplarisch zeigen.



**Abbildung 3.2: Histogramme der drei Kollektive zu CD 41 unter Stimulation mit TRAP**

Einen Gesamtüberblick über die Mediane gibt die Tabelle 3.1. Wie daraus hervorgeht, ergibt sich basal bei den Normalprobanden ein Median von 58,89. Davon nicht zu unterscheiden sind die APS-Patienten, bei denen der Median bei 58,51 liegt. Geringfügig höher fällt der Median bei den SLE-Patienten mit 64,87 aus. Unter Stimulation steigen die Mediane aller Kollektive erwartungsgemäß an. Der höchste Median wird von den Normalprobanden mit 110 erreicht, gefolgt von den SLE- und schließlich von den APS-Patienten.

**Tabelle 3.1: Mediane der drei Kollektive zu CD 41 unstimuliert und stimuliert**

Kollektive	APS	NHD	SLE
Anzahl	33	113	115
<b>basal</b>			
Median	58,51	58,89	64,87
Abweichung des Medians	11,38	5,97	9,63
<b>TRAP</b>			
Median	97,73	110,16	108,38
Abweichung des Medians	22,10	19,91	23,15

In der Abbildung 3.3 lässt sich die graphische Darstellung der Mediane mit den eingetragenen Signifikanzen erkennen. Liegt die Signifikanz bei  $p < 0,05$  wird diese in die Graphik eingetragen. Ein signifikanter Unterschied ergibt sich bei den basalen Werten nur für die Normalprobanden verglichen mit den SLE-Patienten. Unter Aktivierung unterscheiden sich die Normalprobanden von den APS-Patienten und die APS- von SLE-Patienten signifikant.

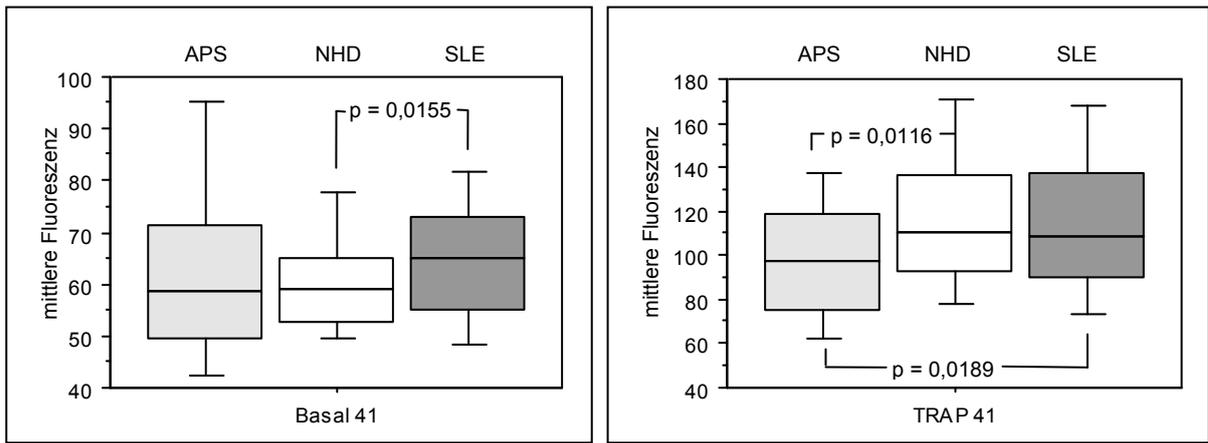


Abbildung 3.3: graphische Darstellung der Mediane der mittleren Fluoreszenz mit den Signifikanzen (links unstimuliert, rechts stimuliert)

Einen Überblick über die graphisch nicht angegebenen Signifikanzen gibt die Tabelle 3.2.

Tabelle 3.2: Darstellung der Signifikanzen zu CD 41

	basal	TRAP
NHD vs APS	0,6019	<b>0,0116</b>
NHD vs SLE	<b>0,0155</b>	0,6076
APS vs SLE	<u>0,1355</u>	<b>0,0189</b>

### 3.1.2 Glykoprotein Ib

Bei der Auswertung der Daten des thrombozytenspezifischen Oberflächenmarkers Glykoprotein Ib (CD 42) ergeben sich die im folgenden abgebildeten Ergebnisse (Abbildung 3.4).

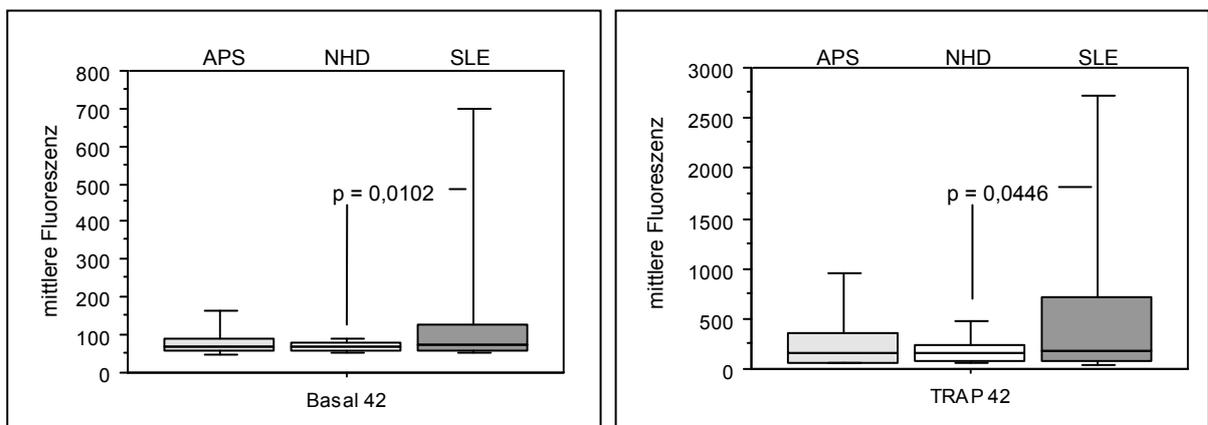


Abbildung 3.4: graphische Darstellung der Mediane zu CD 42 mit eingezeichneten Signifikanzen

Wie aus der Abbildung 3.4 hervorgeht, kommen besonders bei den SLE-Patienten viele Ausreißer vor. Aus diesem Grund ist die errechnete Signifikanz (Tabelle 3.4) von  $p < 0,01$  basal und  $p < 0,05$  unter Stimulation zwischen den Normalprobanden und den SLE-Patienten mit Skepsis zu betrachten, auch wenn es sich bei dem durchgeführten statistischen Test um einen robusten handelt. Die Mediane liegen basal zwischen 70 und 72 mit einer mittleren Abweichung des Medians von 11 bis 19 (Tabelle 3.3). Der niedrigste Median basal wird von den Normalprobanden erreicht, gefolgt von den APS-Patienten. Die SLE-Patienten führen den höchsten Wert sowohl unter basalen als auch unter stimulierten Bedingungen. Die Normalprobanden und APS-Patienten weisen annähernd die gleichen stimulierten Werte auf. Unter Stimulation liegen die Mediane zwischen 149 und 176 mit einer mittleren Abweichung des Medians von 80 bis 120. Signifikante Unterschiede in den Medianen gibt es unter basalen sowie stimulierten Bedingungen zwischen den Normalprobanden und den SLE-Patienten. Eine Tendenz zum Trend zeigt sich bei der Unterscheidung der Mediane der APS- und SLE-Patienten.

**Tabelle 3.3: Darstellung der Mediane zu CD 42**

Kollektive	APS	NHD	SLE
Anzahl	33	113	115
<b>basal</b>			
Median	70,53	68,99	72,41
Abweichung des Medians	15,08	10,92	19,21
<b>TRAP</b>			
Median	149,19	149,57	175,95
Abweichung des Medians	91,61	79,76	119,56

**Tabelle 3.4: Darstellung der Signifikanzen zu CD 42**

	basal	TRAP
NHD vs APS	0,5228	0,5477
NHD vs SLE	<b>0,0102</b>	<b>0,0446</b>
APS vs SLE	0,2266	0,4322

### 3.1.3 Fibrinogen

Bei der Auswertung der Daten zeigte sich auch hier dasselbe Phänomen, wie bei den Daten des Glykoproteins Ib. Auch hier liegen erhebliche Ausreißer bei den Werten basal und stimuliert bei den SLE-Patienten vor (Abbildung 3.5).

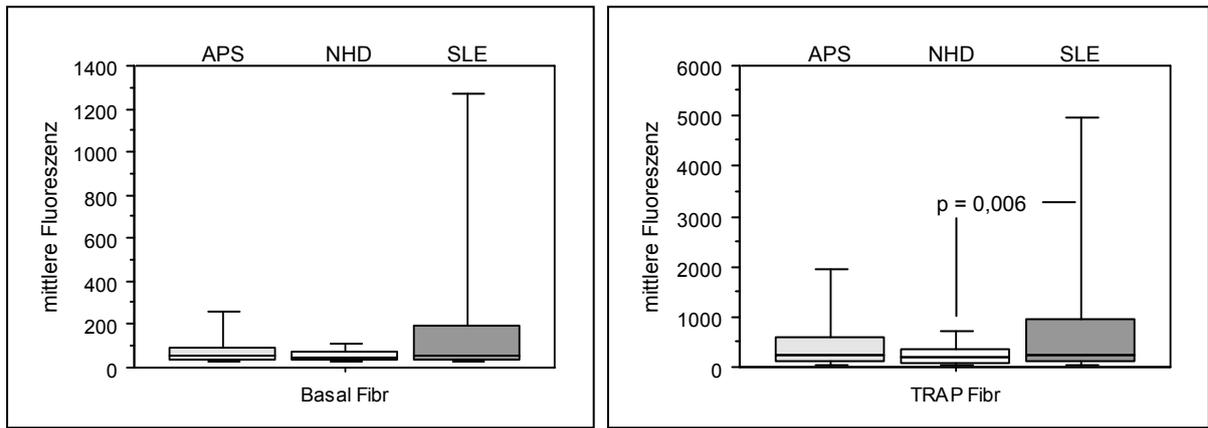


Abbildung 3.5: Darstellung der Mediane zu Fibrinogen

Die Mediane (Tabelle 3.5) liegen basal zwischen 48 und 55 mit einer mittlere Abweichung des Medians von 15 bis 28. Sowohl bei den basalen Werten als auch bei den TRAP stimulierten ergibt sich folgende Medianabfolge der Kollektive Normalprobanden < APS-Patienten < SLE-Patienten. Wie erwähnt werden die Ergebnisse der SLE-Patienten wesentlich durch die hohe Anzahl von Ausreißern beeinflusst. Unter Stimulation liegen die Werte der Kollektive zwischen 199 und 255 mit mittleren Abweichungen der Mediane von 115 bis 200.

Tabelle 3.5: Darstellung der Mediane zu Fibrinogen

Kollektive	APS	NHD	SLE
Anzahl	33	113	115
<b>basal</b>			
Median	52,82	48,31	55,45
Abweichung des Medians	22,49	14,81	28,42
<b>TRAP</b>			
Median	243,56	199,07	255,12
Abweichung des Medians	176,27	115,14	199,52

Bei der Untersuchung der Mediane auf Unterschiede ergibt sich eine Differenz für die Paarung Normalprobanden mit SLE-Patienten von  $p < 0,01$  unter TRAP (Tabelle 3.6). Ein starker Trend liegt bei demselben Kollektivvergleich auch unter basalen Bedingungen vor. Bei der Beurteilung dieser Signifikanzen dürfen die Ausreißer der SLE-Patienten nicht vergessen werden. Zwischen den APS-Patienten und den Normalprobanden zeigt sich unter TRAP eine Tendenz zum Trend.

Tabelle 3.6: Darstellung der Signifikanzen zu Fibrinogen

	basal	TRAP
NHD vs APS	0,4092	0,2412
NHD vs SLE	<u>0,0717</u>	<b>0,0060</b>
APS vs SLE	0,5386	0,4458

### 3.1.4 P-Selektin

Das P-Selektin wurde bestimmt, um Aussagen über den Aktivierungszustand der Thrombozyten zu erhalten. Dabei ergaben sich die in Abbildung 3.6 dargestellte Ergebnisse.

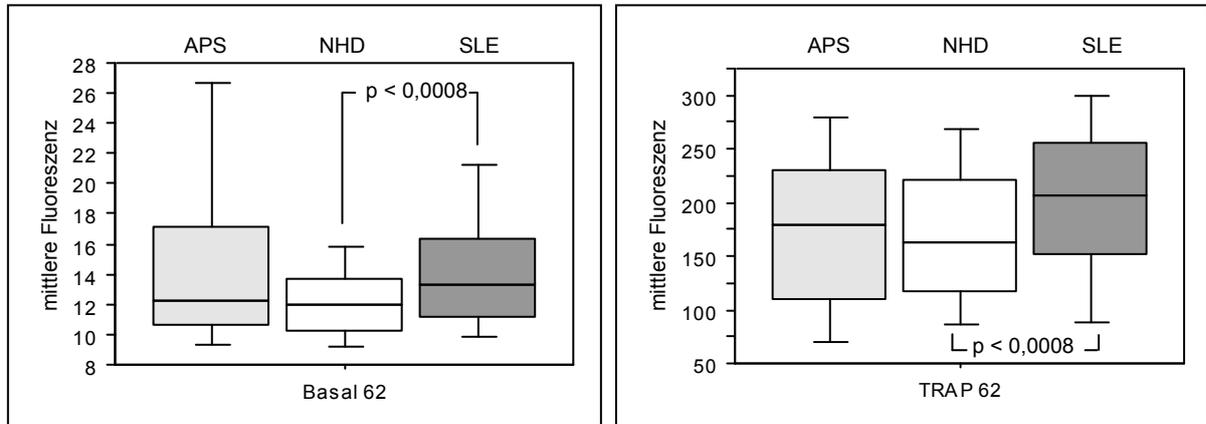


Abbildung 3.6: Darstellung der Mediane zu CD 62

Die Mediane schwanken zwischen 12,0 und 13,2 basal und 163 und 208 unter Stimulation (Tabelle 3.7). Die mittlere Abweichung des Medians liegen basal zwischen 1,7 und 2,3 und stimuliert zwischen 49 und 61. Die höchsten Medianwerte wurden basal und stimuliert wieder in der Gruppe der SLE-Patienten gemessen, die niedrigsten bei den Normalprobanden.

Tabelle 3.7: Darstellung der Mediane zu CD 62

Kollektive	APS	NHD	SLE
Anzahl	33	113	115
<b>basal</b>			
Median	12,21	12,03	13,24
Abweichung des Medians	1,68	1,73	2,34
<b>TRAP</b>			
Median	178,87	163,35	207,51
Abweichung des Medians	61,13	48,78	49,82

Ein signifikanter Unterschied mit  $p < 0,01$  ergibt sich für den Vergleich von Normalprobanden mit den SLE-Patienten basal und stimuliert (Tabelle 3.8). Bei dem Vergleich der basalen Werte für die Normalprobanden und die APS-Patienten zeigt sich eine Tendenz zu einem Trend. Bei den APS-Patienten verglichen mit den SLE-Patienten liegt ein Trend unter Stimulation vor.

Tabelle 3.8: Darstellung der Signifikanzen zu CD 62

	basal	TRAP
NHD vs APS	0,2459	0,5651
NHD vs SLE	<b>0,0008</b>	<b>0,0008</b>
APS vs SLE	0,4795	0,1553

### 3.1.5 Subgruppenanalysen

Neben der Untersuchung der Oberflächenmarker wurden noch weitere laborchemische (ACL-Titer,  $\beta_2$ GPI) sowie klinische Daten (Angaben zur Manifestation der Erkrankung und zur Therapie) gewonnen. Daraus ergab sich die Möglichkeit, die Ergebnisse der Auswertung der Oberflächenmarker auf gewisse Fragestellungen hin zu analysieren. Analysiert wurden folgende Fragen:

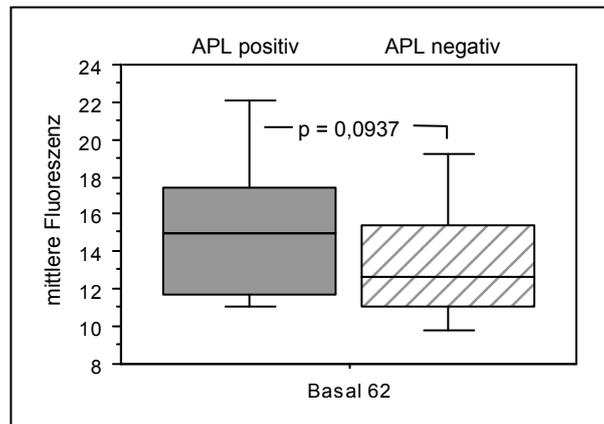
- welchen Zusammenhang gibt es zwischen APL-Antikörpern und der Oberflächenexpression der Marker? (Kapitel 3.1.5.1)
- sind APS-Patienten mit stattgefundenen Thrombosen durch ein spezifisches Profil gekennzeichnet? (Kapitel 3.1.5.2)
- welchen Einfluß haben Medikamente?
  - welche Auswirkungen haben Thrombozytenaggregationshemmer (ASS) oder Antikoagulanzen (Marcumar) auf die Expression der Marker bei APS-Patienten? (Kapitel 3.1.5.3.1)
  - welche Auswirkungen haben Immunsuppressiva und Malariamittel bei SLE-Patienten? (Kapitel 3.1.5.3.2)

#### 3.1.5.1 Antiphospholipid-Antikörper-Status und Oberflächenmarker

Bei einer Vielzahl der SLE- und APS-Patienten ist bei der Blutentnahme parallel Blut zur Bestimmung des Antikörperstatus abgenommen worden, so daß eine gemeinsame Betrachtung von Antikörpervorkommen und Oberflächenmarker vorgenommen werden konnte. Als Antiphospholipid-Antikörper wurden das Anticardiolipin und das Anti- $\beta_2$ -Glykoprotein I bestimmt. Es wurde eine Einteilung in APL-Antikörper positiv und negativ vorgenommen. Als APL-Ak positiv werden solche Patienten bezeichnet, die entweder positiv für ACL oder  $\beta_2$ GPI oder beide sind. Anschließend werden die Mediane der unterschiedlichen Gruppen vergleichend betrachtet. Dabei ergibt sich für den Vergleich der APL-positiven und -negativen SLE-Patienten beim P-Selektin basal ein starker Trend (Tabelle 3.9) zum Unterschied (Abbildung 3.7), der sich schon alleine bei der Betrachtung der Mediane abzeichnet (Tabelle 3.10).

**Tabelle 3.9: Darstellung der Signifikanzen zu allen Oberflächenmarkern aufgeteilt nach APL-Antikörper-Status bei den APS- und SLE-Patienten**

	SLE-APL positiv vs SLE-APL negativ	SLE-APL positiv vs APS-APL positiv
<b>basal</b>		
CD 41	0,4433	<u>0,1239</u>
CD 42	0,8458	0,4514
CD 62	<u>0,0937</u>	<u>0,1822</u>
Fibrinogen	0,7228	0,7306
<b>TRAP</b>		
CD 41	0,6554	<u>0,0852</u>
CD 42	0,9180	0,5613
CD 62	0,9281	0,3223
Fibrinogen	0,3782	0,2917



**Abbildung 3.7: graphische Darstellung der APL-positiven und -negativen SLE-Patienten zu CD 62 basal**

**Tabelle 3.10: Darstellung der Mediane zu allen Oberflächenmarkern aufgeteilt nach APL-Antikörper-Status**

Kollektive	SLE - APL negativ	SLE - APL positiv	APS - APL positiv
Anzahl	58	20	27
<b>basal</b>			
CD 41	65,29	63,57	52,85
CD 42	69,46	68,32	70,53
CD 62	12,63	14,98	12,17
Fibrinogen	52,76	59,31	52,82
<b>TRAP</b>			
CD 41	106,05	115,81	95,76
CD 42	228,72	182,67	177,51
CD 62	211,52	218,47	192,02
Fibrinogen	262,43	391,80	261,19

Ein Trend ist beim Vergleich der APL-positiven SLE- und APS-Patienten für das CD 41 basal und stimuliert zu verzeichnen, bei dem die SLE-Patienten jeweils einen höheren Median aufweisen (Abbildung 3.8).

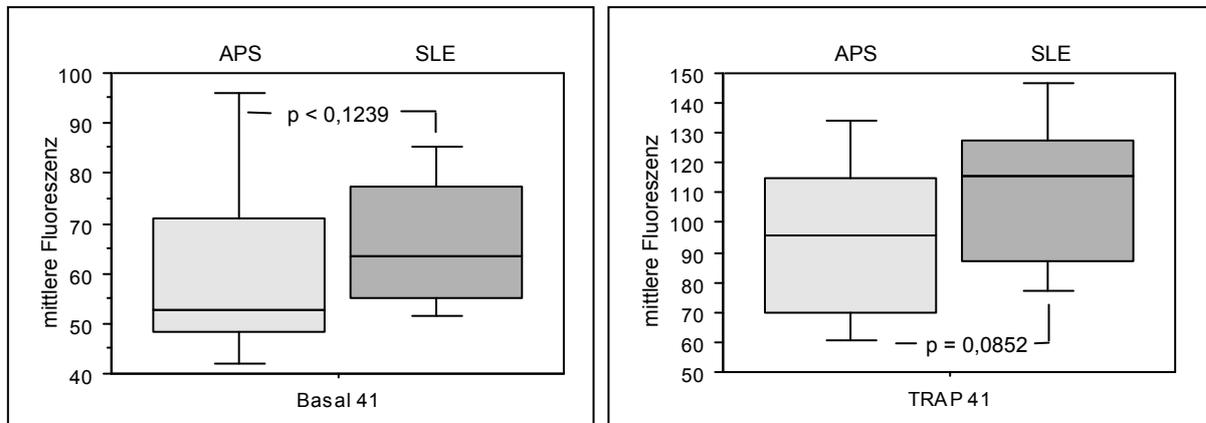


Abbildung 3.8: graphische Darstellung der APL-positiven SLE- und der APS-Patienten zu CD 41 unter basalen und stimulierten Bedingungen

### 3.1.5.1.1 Anticardiolipin-Antikörper- und $\beta_2$ -Glykoprotein I Antikörper-Status bei SLE-Patienten und Oberflächenmarker

Im Folgenden wurde eine Unterteilung der APL-positiven Kollektive aus dem vorangehenden Kapitel nach dem vorhandenen Antikörper-Status vorgenommen. Bei den SLE-Patienten liegt eine ungleiche Verteilung für die ACL-Antikörper vor. Für die geringe Anzahl an Patienten mit ACL-Antikörpern zeigt sich ein beinahe signifikanter Wert für die Unterscheidung für CD 62 basal (Tabelle 3.11 und Abbildung 3.9 links), wobei der Median für die ACL-positiven erhöht ist im Vergleich zu den negativen. Ein Trend ist für CD 41 unter Stimulation zu verzeichnen, bei dem der Median für die ACL-negativen höher ausfällt als für die positiven.

Tabelle 3.11: Darstellung der Mediane und Signifikanzen für SLE-Patienten aufgeteilt nach ACL-Status

	ACL positiv	ACL negativ	Signifikanz
Anzahl	22	72	
<b>basal</b>			
CD 41	63,57	65,42	0,7310
CD 42	74,20	71,25	0,6488
CD 62	15,87	13,00	0,0577
Fibrinogen	63,08	53,64	0,7143
<b>TRAP</b>			
CD 41	104,93	108,38	0,1985
CD 42	195,59	233,25	0,8303
CD 62	227,05	209,87	0,5737
Fibrinogen	404,59	269,47	0,6878

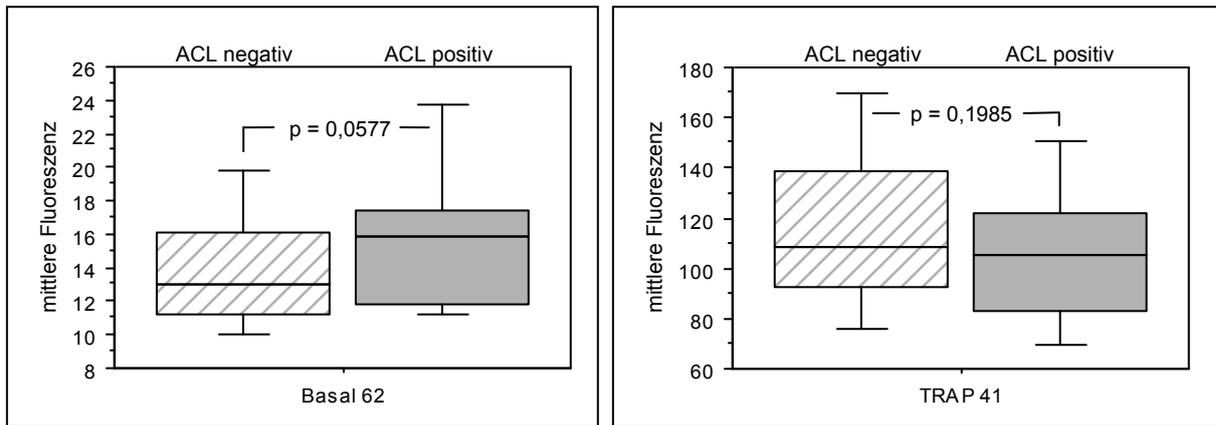


Abbildung 3.9: graphische Darstellung der Mediane der ACL-positiven und -negativen SLE-Patienten zu CD 62 basal und CD 41 stimuliert

In Tabelle 3.12 sind die SLE-Patienten nach ihrem  $\beta_2$ -Glykoprotein I Status dargestellt. Für alle basalen Medianvergleiche ergeben sich Unterschiede.  $\beta_2$ -Glykoprotein I positive Patienten besitzen für alle Oberflächenmarker höhere Mediane als Antikörper negative Patienten. Signifikante Unterschiede werden für die basalen Mediane des CD 41 und CD 62 erzielt. Unter Stimulation liegen bei diesen Oberflächenmarkern starke Trends zur Signifikanz vor. Unter Stimulation liegen die Mediane bei den Antikörper-negativen höher, ausgenommen der des CD 41. Auf die Trendentwicklung der beiden anderen Oberflächenmarker ist nicht weiter einzugehen, da bei diesen erhebliche Ausreißer vorlagen.

Tabelle 3.12: Darstellung der Mediane und Signifikanzen für SLE-Patienten aufgeteilt nach dem  $\beta_2$ -Glykoprotein I Status

	$\beta_2$ GPI positiv	$\beta_2$ GPI negativ	Signifikanz
Anzahl	7	70	
<b>basal</b>			
CD 41	79,00	64,84	<b>0,0030</b>
CD 42	92,91	67,65	<u>0,1593</u>
CD 62	16,23	12,55	<b>0,0247</b>
Fibrinogen	68,15	52,75	0,2050
<b>TRAP</b>			
CD 41	134,92	104,26	<u>0,0760</u>
CD 42	183,59	228,62	0,6432
CD 62	149,36	214,84	<u>0,0626</u>
Fibrinogen	254,73	271,97	0,7201

### 3.1.5.1.2 Anticardiolipin-Antikörper- und $\beta_2$ -Glykoprotein I Antikörper-Status bei APS-Patienten und Oberflächenmarker

Wie es für SLE-Patienten mit einem sekundären APS zu erwarten ist, weisen ein Großteil der APS-Patienten ACL-Antikörper auf. Die Mediane der ACL-positiven liegen für alle Oberflächenmarker basal bis auf das Fibrinogen niedriger als für die negativen. Unter basalen Bedingungen gibt es keinen Unterschied der Mediane bei vergleichender Betrachtung. Unter Stimulation führen die ACL-positiven die höchsten Werte für CD 42, CD 62 und Fibrinogen an. Trends werden für die Marker CD 42, CD 62 und Fibrinogen gefunden.

**Tabelle 3.13: Darstellung der Mediane und Signifikanzen der APS-Patienten aufgeteilt nach ACL-Status**

	ACL positiv	ACL negativ	Signifikanz
Anzahl	26	6	
<b>basal</b>			
CD 41	53,70	59,14	0,6292
CD 42	70,96	73,08	0,7721
CD 62	12,19	14,81	0,5623
Fibrinogen	53,68	50,54	0,7354
<b>TRAP</b>			
CD 41	96,75	114,84	0,3106
CD 42	177,81	63,72	0,0911
CD 62	201,72	104,09	0,1475
Fibrinogen	271,18	100,72	0,1007

Auch die Unterteilung der APS-Patienten nach dem  $\beta_2$ -Glykoprotein I zeigt einen hohen Anteil an positiven (Tabelle 3.14). Diese zeichnen sich durch hohe Mediane für die Oberflächenmarker CD 41, CD 62 und Fibrinogen aus. Die Unterschiede in den Medianen sind basal jedoch nicht ausgeprägt genug. Unter Stimulation weisen die  $\beta_2$ -Glykoprotein I positiven die höheren Mediane für das CD 42, CD 62 und Fibrinogen gegenüber den negativen auf. Für diese Mediane liegen auch Signifikanzen vor, oder wie es für das CD 62 der Fall ist, ein starker Trend.

**Tabelle 3.14: Darstellung der Mediane und Signifikanzen für APS-Patienten aufgeteilt nach dem  $\beta_2$ -Glykoprotein I Status**

	$\beta_2$ GPI positiv	$\beta_2$ GPI negativ	Signifikanz
Anzahl	23	8	
<b>basal</b>			
CD 41	66,21	58,57	0,4983
CD 42	71,38	73,08	0,7520
CD 62	12,58	11,84	0,4428
Fibrinogen	54,54	42,33	0,2991
<b>TRAP</b>			
CD 41	99,34	101,60	0,7520
CD 42	227,17	76,63	0,0339
CD 62	211,42	104,09	0,0863
Fibrinogen	281,17	74,90	0,0148

### 3.1.5.2 Thrombosen bei APS-Patienten und Oberflächenmarker

Anamnestisch ließen sich bei 14 von 45 Patienten Thrombosen in der Vorgeschichte erheben. Von Interesse war es, herauszufinden, ob sich die Patienten mit thrombotischen Ereignissen von denjenigen ohne thrombotische Ereignisse im Hinblick auf die Oberflächenmarker unterschieden. Wie aus der Tabelle 3.15 hervorgeht, sind die Fallzahlen sehr gering. Dennoch zeichnet sich bei den Signifikanzen basal beim CD 42 eine Tendenz zu einem Trend ab, die anhand von größeren Fallzahlen verifiziert werden müßte. Demnach weisen Patienten ohne anamnestische oder aktuell klinische Hinweise auf ein thrombotisches Ereignis einen niedrigeren Basalwert für den Median auf als solche mit erlittenem Ereignis. Generell läßt sich feststellen, daß die Mediane basal für CD 41, CD 42 und CD 62 für die Patienten mit stattgefundenen thrombotischen Ereignissen höher ausfallen als diejenigen ohne thrombotische Komplikation. Unter Stimulation werden Trends für CD 42 und Fibrinogen erzielt. Dort weisen die Patienten ohne Ereignisse die höheren Werte auf.

**Tabelle 3.15: Darstellung der Mediane und Signifikanzen für alle Oberflächenmarker aufgeteilt nach thrombotischem oder nicht thrombotischem Ereignis**

	keine Thrombose	Thrombose	Signifikanz
Anzahl	16	14	
<b>basal</b>			
CD 41	55,74	64,16	0,7395
CD 42	66,29	78,82	0,2444
CD 62	12,02	13,45	0,4543
Fibrinogen	53,68	51,92	0,9668
<b>TRAP</b>			
CD 41	93,05	109,80	0,8353
CD 42	215,88	109,44	0,1050
CD 62	212,86	146,54	0,2617
Fibrinogen	305,04	167,51	0,1834

### 3.1.5.3 Einfluß der Medikation auf die Oberflächenmarker

Bei den APS-Patienten wurde die Auswirkung der antiaggregatorischen und antikoagulatorischen Therapie ergründet. Bei der einigermaßen großen Gruppe der SLE-Patienten bot es sich an, Vergleiche für die unterschiedlichen Therapien anzustellen, die die Patienten erhielten.

#### 3.1.5.3.1 Thrombozytenaggregationshemmer und Antikoagulanzen

Bei den APS-Patienten wurden zu dem Zeitpunkt der Untersuchung 27 Patienten antiaggregatorisch oder antikoagulatorisch behandelt. Es wurden drei Untergruppen gebildet, bei denen die erste ohne jegliche antiaggregatorische oder antikoagulatorische Medikation war, die zweite erhielt Acetylsalicylsäure und die dritte Phenprocoumon, wobei die Dosis der Medikation bei der Betrachtung der Daten keinerlei Berücksichtigung fand. Bezüglich der Mediane (Tabelle 3.16) ergeben sich mehr oder weniger große Unterschiede für die Oberflächenmarker.

**Tabelle 3.16: Darstellung der Mediane unter keiner, antiaggregatorischer und antikoagulatorischer Therapie**

	keine Therapie	Acetylsalicylsäure	Phenprocoumon
Anzahl	5	16	11
<b>basal</b>			
CD 41	52,29	69,03	52,85
CD 42	63,88	78,82	70,53
CD 62	10,65	12,81	12,58
Fibrinogen	39,09	69,20	52,82
<b>TRAP</b>			
CD 41	90,34	109,80	97,73
CD 42	116,32	278,58	102,56
CD 62	138,91	168,42	214,29
Fibrinogen	94,85	479,70	164,31

Wegen der zugrundeliegenden Verteilungen der Daten mit erheblichen Ausreißern für CD 42 stimuliert und Fibrinogen basal und stimuliert, wie es in den vorhergehenden Kapiteln (3.1.1, 3.1.2, 3.1.3 und 3.1.4) dargestellt worden ist, sollen nur die Aussagen zu den Oberflächenmarker CD 41 und CD 62 basal und stimuliert und CD 42 basal ihre Berechtigung finden. Bei der Betrachtung der Mediane besitzen die Patienten mit Acetylsalicylsäure-Therapie die höchsten Mediane mit Ausnahme für des P-Selektins unter Stimulation. Bei der vergleichenden Betrachtung der Paarung keine Therapie versus Acetylsalicylsäure findet man unter basalen sowie stimulierten Bedingungen eine Tendenz zum Trend für das CD 41. Beim CD 62 fällt unter Stimulation ein Trend auf. Bei der Paarung keine Therapie versus Phenprocoumon liegt basal ein starker Trend vor, der unter Stimulation schwächer wird.

**Tabelle 3.17: Darstellung der Signifikanzen für alle Oberflächenmarker nach den unterschiedlichen Therapien**

	keine Antikoagulation vs Acetylsalicylsäure	keine Antikoagulation vs Phenprocoumon	Phenprocoumon vs Acetylsalicylsäure
<b>basal</b>			
CD 41	0,2155	0,6917	0,3001
CD 42	0,4574	0,4615	0,5212
CD 62	0,2831	0,0791	0,7672
Fibrinogen	0,5633	0,3955	0,4015
<b>TRAP</b>			
CD 41	0,2477	0,6917	0,7672
CD 42	<u>0,0575</u>	0,6917	<u>0,0934</u>
CD 62	0,1864	0,1567	0,7298
Fibrinogen	0,0258	0,2818	<u>0,0543</u>

### 3.1.5.3.2 Immunsuppressiva und Malariamittel

Zur Analyse des Einflusses der Immunsuppressiva und der Malariamittel auf die Oberflächenmarker sind die SLE-Patienten in vier unterschiedliche Gruppen eingeteilt worden:

1. weder immunsuppressive noch antimalarische Therapie
2. alleinig immunsuppressive Therapie
3. immunsuppressive und antimalarische Therapie
4. rein antimalarische Therapie.

Auch hier fand die Dosierung der Medikation keinerlei Berücksichtigung. In der Gruppe der immunsuppressiven Therapie wurden folgende Wirkstoffe subsummiert: Cortison, Ciclosporin A, Cyclophosphamid, Azathioprin, Mycophenolatmofetil. Bei der antimalarischen Medikation begrenzten sich die Wirkstoffklassen auf das Hydroxychloroquin und das Chloroquin. Bei den sich anschließenden Auswertungen ergaben sich die in Tabelle 3.18 dargestellten Mediane.

**Tabelle 3.18: Darstellung der Mediane unter den unterschiedlichen Therapieregimen**

Therapie	keine	Immun	Immun + Malaria	Malaria
Anzahl	9	27	27	19
<b>basal</b>				
CD 41	67,42	63,42	65,26	65,37
CD 42	91,01	70,35	72,41	64,88
CD 62	16,03	12,55	12,53	12,00
Fibrinogen	67,37	87,59	51,61	49,47
<b>TRAP</b>				
CD 41	113,33	100,71	108,37	115,63
CD 42	259,80	194,83	181,75	205,64
CD 62	199,10	204,24	194,09	226,04
Fibrinogen	244,05	293,65	268,35	250,99

Im Weiteren sollen nur die Rezeptoren CD 41 und CD 62 betrachtet werden. Für diese gilt, daß die basalen Medianwerte ohne Therapie oberhalb derer mit Therapie liegen. Des Weiteren läßt sich konstatieren, daß die wirksamste Suppression der Rezeptorexpression vor allem für das P-Selektin basal unter der alleinigen Malariatherapie erzielt wird. Dies spiegelt sich im signifikanten Unterschied wieder (Tabelle 3.20). Einen Überblick über die Signifikanzen geben die Tabelle 3.19 und Tabelle 3.20.

**Tabelle 3.19: Darstellung der Signifikanzen unter den unterschiedlichen Therapieregimen für die Paarungen: Immunsuppression versus Immunsuppression + Malariamittel, Immunsuppression versus Malariamittel sowie Immunsuppression + Malariamittel versus Malariamittel**

	Immun vs Immun + Malaria	Immun vs Malaria	Immun + Malaria vs Malaria
<b>basal</b>			
CD 41	0,8355	0,8759	0,9378
CD 42	0,9655	0,2893	0,3431
CD 62	0,4728	0,3263	0,3604
Fibrinogen	0,7753	0,3318	0,9200
<b>TRAP</b>			
CD 41	0,3547	0,6001	0,9023
CD 42	0,9105	0,9023	0,9200
CD 62	0,5858	0,2240	<b>0,0391</b>
Fibrinogen	0,8831	0,5619	0,5105

**Tabelle 3.20: Darstellung der Signifikanzen unter den unterschiedlichen Therapieregimen für folgende Paarungen: keine Therapie versus Immunsuppression, keine Therapie versus Immunsuppression + Malariamittel sowie keine Therapie versus Malariamittel**

	keine vs Immun	keine vs Immun + Malaria	keine vs Malaria
<b>basal</b>			
CD 41	0,3151	0,3708	0,2281
CD 42	0,7285	0,4539	<b>0,0463</b>
CD 62	<u>0,1707</u>	<b>0,0185</b>	<b>0,0054</b>
Fibrinogen	0,9854	0,5963	0,2684
<b>TRAP</b>			
CD 41	0,1824	0,3515	0,3132
CD 42	0,8983	0,8123	0,6759
CD 62	0,8408	0,8123	0,2477
Fibrinogen	0,6479	0,8123	0,7492

Tendenzen zu einem Unterschied werden beim CD 41 basal (keine Therapie versus Malariamittel) gesehen. Auch unter Stimulation läßt sich ein Trend dieses Rezeptors beim Vergleich (keine Therapie versus Immunsuppression) verzeichnen. Eindeutige Aussagen lassen sich jedoch am Besten zum P-Selektin treffen, denn dort sind unter basal Bedingungen neben einem Trend (keine Therapie versus Immunsuppression), signifikante (keine Therapie versus Immunsuppression + Malariamittel) und hochsignifikante Werte (keine Therapie versus Malariamittel) erzielt worden. Des Weiteren haben sich unter Stimulation Tendenzen zum Trend bei keine Therapie versus Malariamittel und Immunsuppression versus Malariamittel ergeben. Eine Signifikanz wird beim Vergleich der Therapieregime Immunsuppression und Malariamittel versus Malariamittel erreicht.

Die Wirkung der Antimalariatherapie sowie der Kombination aus Immunsuppression + Malariamittel ist der Ausgangspunkt für eine Kontemplation der unterschiedlichen Wirkstoffe der Malariamittel in diesen beiden Subgruppen.

### 3.1.5.3.2.1 Unterschiede zwischen Hydroxychloroquin und Chloroquin

In die Auswertung dieser Subgruppe gingen Patienten ein, die entweder eine antimalarische Monotherapie oder eine Kombinationstherapie (immunsuppressiv und antimalarisch) erhielten. Es stellt sich heraus, daß unter antimalarischer Monotherapie eine effektivere suppressive Wirkung auf alle Rezeptoren basal und für CD 41, CD 62 und Fibrinogen unter Stimulation vom Hydroxychloroquin als vom Chloroquin ausgeht (Tabelle 3.21).

**Tabelle 3.21: Darstellung der Mediane und Signifikanzen aller Oberflächenmarker unter Monotherapie mit Chloroquin oder Hydroxychloroquin**

	Chloroquin	Hydroxychloroquin	Signifikanz
Anzahl	11	8	
<b>basal</b>			
CD 41	70,86	56,84	<u>0,1604</u>
CD 42	66,29	64,48	0,8044
CD 62	12,71	11,18	<b>0,0258</b>
Fibrinogen	56,59	45,34	0,9342
<b>TRAP</b>			
CD 41	120,95	103,44	<u>0,1864</u>
CD 42	205,64	217,68	0,8688
CD 62	237,99	223,64	0,2831
Fibrinogen	255,23	223,33	0,5633

Die Mediane unter Hydroxychloroquin liegen immer unterhalb derer des Chloroquins. Beachtenswert ist dabei besonders die Signifikanz ( $p < 0,05$ ) für das P-Selektin unter basalen Bedingungen. Für CD 41 basal und aktiviert läßt sich ein Trend feststellen und beim stimulierten CD 62 eine Tendenz zum Trend. Bei der Betrachtung der Mediane für CD 41 und CD 62 des Therapieregimes Immunsuppression + Malariamittel fällt auf, daß die Mediane beim Hydroxychloroquin höher ausfallen als beim Chloroquin (Tabelle 3.22), wobei diese wiederum höher ausfallen als diejenigen unter Hydroxychloroquin-Monotherapie (Tabelle 3.21).

Tabelle 3.22: Darstellung der Mediane und der Signifikanzen aller Oberflächenmarker unter Kombinationstherapie von Immunsuppressivum und Malariamittel

	Chloroquin	Hydroxychloroquin	Signifikanz
Anzahl	16	9	
<b>basal</b>			
CD 41	64,65	70,80	0,6104
CD 42	73,14	58,08	0,7341
CD 62	12,92	13,24	0,7771
Fibrinogen	53,42	39,90	0,8208
<b>TRAP</b>			
CD 41	114,36	111,73	0,6506
CD 42	164,75	494,46	0,4969
CD 62	203,56	200,95	0,9549
Fibrinogen	265,45	817,06	0,4280

Zusammenfassend lassen sich zum Kapitel 3.1.5 folgende Kernaussagen treffen:

- APL-Antikörper positive SLE-Patienten weisen einen höheren Median für CD 62 auf als APL-Antikörper negative
- SLE-Patienten, die entweder ACL-positiv oder  $\beta_2$ -Glykoprotein I positive sind, weisen einen höheren Median auf für das CD 62 basal als die negativen und unterscheiden sich von ihnen. Für die  $\beta_2$ -Glykoprotein I positiven gilt dies auch unter Stimulation und für CD 41
- APS-Patienten, die antiaggregatorisch behandelt werden, unterscheiden sich im Hinblick auf die CD 62-Expression nicht von denen, die nicht behandelt werden. Ein Unterschied wurde in der CD 62-Expression beim Vergleich von keiner Therapie und Antikoagulation festgestellt.
- bei den SLE-Patienten läßt sich unter Therapie für das CD 62 basal ein niedrigerer Wert des Oberflächenmarkers erkennen. Die beste Wirkung geht von einer antimalarischen Monotherapie aus, die gefolgt wird von der Kombinationstherapie aus Immunsuppression und Malariamittel. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, daß eine Kombination von Immunsuppressivum und Chloroquin einer mit Hydroxychloroquin vorzuziehen ist. Die Immunsuppressiva scheinen den Benefit der Hydroxychloroquin-Monotherapie aufzuheben. Eine Monotherapie mit Immunsuppressiva hat eine geringere Wirkung auf den Rezeptor als die anderen Therapieregime.

## 3.2 Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate in den Kollektiven

Bei den Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten wurde in den Kollektiven der Nachweis der Aggregate bei den Lymphozyten, den T-Lymphozyten und den Granulo- und Monozyten erfaßt und der Anteil der Aggregate an der jeweiligen Gesamtpopulation errechnet.

### 3.2.1 Thrombozyten-Lymphozyten-Aggregate (TLA)

Die basale Rate der TLA liegt bei den Normalprobanden bei 2,56 Ereignissen und bei den SLE-Patienten bei 2,58, die der APS-Patienten mit 2,07 leicht darunter (Abbildung 3.10 und Tabelle 3.23). Unter Stimulation mit TRAP vervielfachen die SLE-Patienten den Anteil der Aggregate mit einem Median von 11,27. Bei den beiden anderen Kollektiven findet nur ein Anstieg um den Faktor 3 statt.

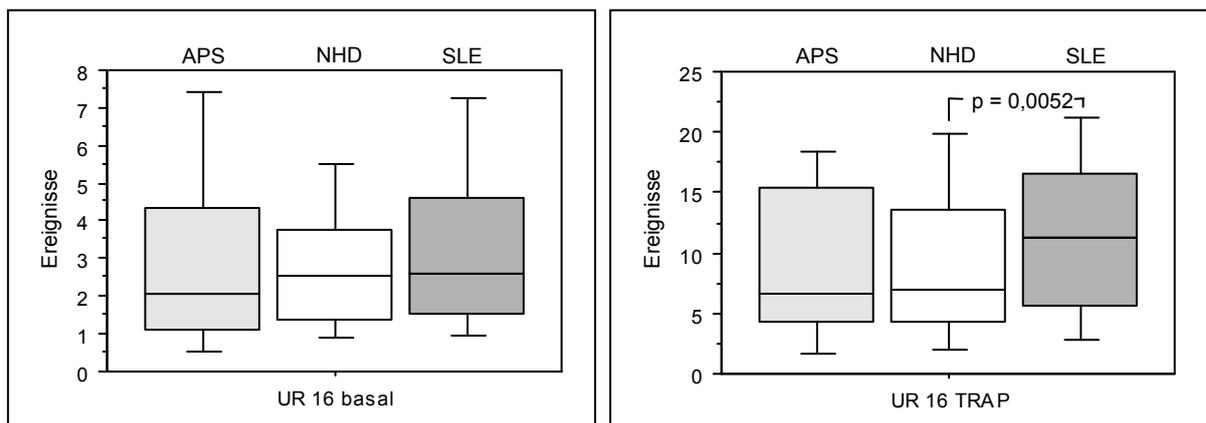


Abbildung 3.10: graphische Darstellung der Median und Signifikanzen der TLA basal und stimuliert

Tabelle 3.23: Darstellung der Mediane der TLA

Kollektive	APS	NHD	SLE
Anzahl	33	113	115
<b>basal</b>			
Median	2,07	2,56	2,58
Abweichung des Medians	1,13	1,20	1,41
<b>TRAP</b>			
Median	6,68	7,00	11,27
Abweichung des Medians	4,85	4,33	5,54

Ein Unterschied zwischen den Medianen findet sich zwischen den Normalprobanden und den SLE-Patienten unter Stimulation (Tabelle 3.24). Unter Stimulation zeigen

sich ein starker Trend und basal ein Trend zum Unterschied zwischen den APS-Patienten und den SLE-Patienten.

**Tabelle 3.24: Darstellung der Signifikanzen der TLA**

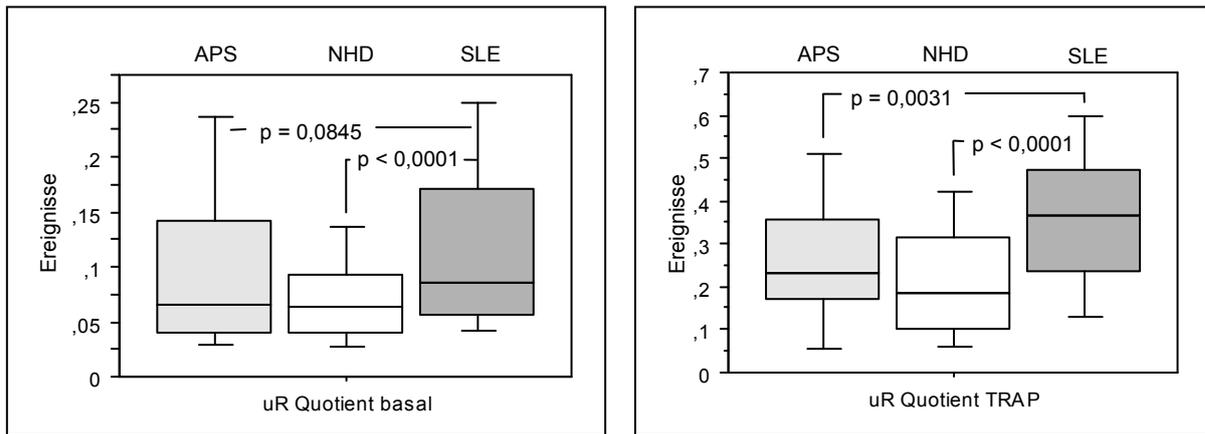
	<b>basal</b>	<b>TRAP</b>
NHD vs APS	0,4389	0,9593
NHD vs SLE	0,2428	<b>0,0052</b>
APS vs SLE	<u>0,1923</u>	<u>0,0731</u>

### 3.2.1.1 Anteile der TLA an der Gesamtpopulation der Lymphozyten

Um zu erfahren, wie hoch der Anteil der TLA an der Gesamtpopulation der Lymphozyten ist, wurde der prozentuale Anteil der Aggregate ermittelt. Er liegt für die SLE-Patienten mit 8,5 % basal am höchsten, gefolgt von den APS-Patienten mit 6,6 %, die sich nicht von den Normalprobanden mit 6,4 % unterscheiden (Tabelle 3.25 und Abbildung 3.11). Die SLE-Patienten weisen einen Anteil von 36,6 % auf, die APS-Patienten von 23,4 % und die Normalprobanden von 18,5 %. Werden die prozentualen Anstiege betrachtet, so fällt die größte Zunahme bei den SLE-Patienten um ungefähr 28 % auf. Die beiden anderen Kollektive weisen einen geringeren prozentualen Zuwachs auf, der bei den APS-Patienten bei 16 % und bei den Normalprobanden bei 12 % liegt.

**Tabelle 3.25: Darstellung der Mediane des Anteils der TLA an der gesamten Lymphozytenpopulation**

Kollektive	APS	NHD	SLE
Anzahl	33	113	115
	<b>basal</b>		
Median	0,066	0,064	0,085
Abweichung des Medians	0,030	0,027	0,037
	<b>TRAP</b>		
Median	0,234	0,185	0,366
Abweichung des Medians	0,109	0,098	0,114



**Abbildung 3.11:** graphische Darstellung der Mediane und Signifikanzen der Anteile der TLA an der Gesamtpopulation der Lymphozyten basal und stimuliert

In Tabelle 3.26 zeigen sich hochsignifikante Werte basal und stimuliert für den Unterschied der Mediane der Normalprobanden zu den SLE-Patienten. Weitere Unterschiede liegen für die APS-Patienten und die SLE-Patienten vor, die signifikant unter Stimulation sind und basal einen starken Trend zeigen. Bei den Normalprobanden und den APS-Patienten liegt unter Stimulation ebenfalls ein Trend vor.

**Tabelle 3.26:** Darstellung der Signifikanzen des Anteils der TLA an der gesamten Lymphozytenpopulation

	basal	TRAP
NHD vs APS	0,3690	<u>0,1021</u>
NHD vs SLE	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
APS vs SLE	<u>0,0845</u>	<b>0,0031</b>

### 3.2.2 Thrombozyten-T-Lymphozyten-Aggregate (TTLA)

Der höchste Median für die TTLA liegt unter unstimulierten Bedingungen bei den SLE-Patienten mit 5,26 vor (Tabelle 3.27 und Abbildung 3.12). Die APS-Patienten weisen basal den niedrigsten Wert mit 3,23 auf. Die Normalprobanden liegen zwischen den beiden Patientenkollektiven mit 4,84. Unter Stimulation nehmen bei allen Kollektiven die Anzahl der TTLA zu, wobei sie bei den SLE- und den APS-Patienten auf annähernd das 4fache (20,00 bzw. 12,33) ansteigen. Bei den Normalprobanden findet nur eine Verdopplung des Ausgangswertes auf 10,53 statt.

Tabelle 3.27: Darstellung der Mediane der TTLA

Kollektive	APS	NHD	SLE
Anzahl	33	113	115
<b>basal</b>			
Median	3,23	4,84	5,26
Abweichung des Medians	1,59	2,57	3,27
<b>TRAP</b>			
Median	12,33	10,53	20,00
Abweichung des Medians	5,58	6,30	8,23

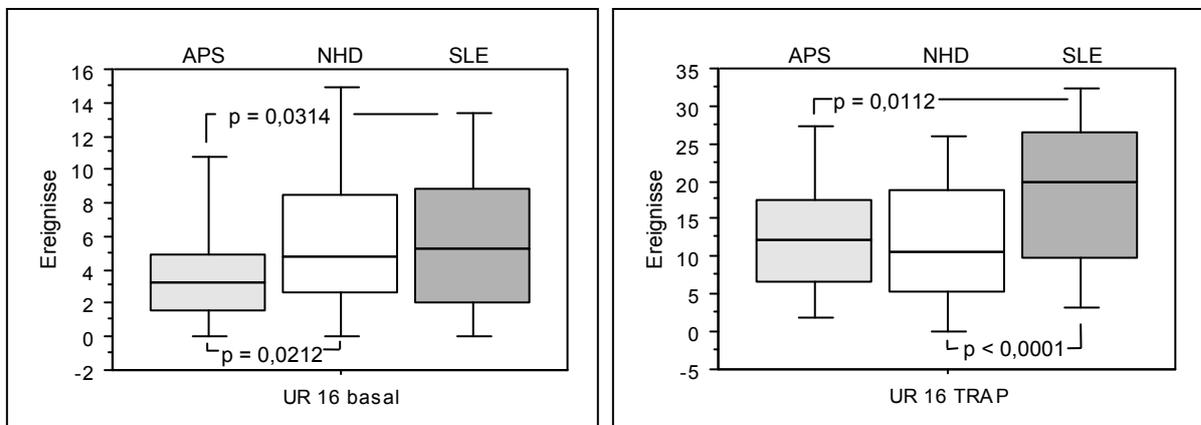


Abbildung 3.12: graphische Darstellung der Mediane und der Signifikanzen der TTLA basal und stimuliert

Bei den Medianen zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Normalprobanden und den SLE-Patienten unter Stimulation. Signifikanzen ergeben sich unter Stimulation und basal zwischen den SLE- und APS-Patienten. Ein Unterschied liegt basal zwischen den Normalprobanden und den APS-Patienten vor.

Tabelle 3.28: Darstellung der Signifikanzen der TTLA

	basal	TRAP
NHD vs APS	0,0212	0,3389
NHD vs SLE	0,9717	<0,0001
APS vs SLE	0,0314	0,0112

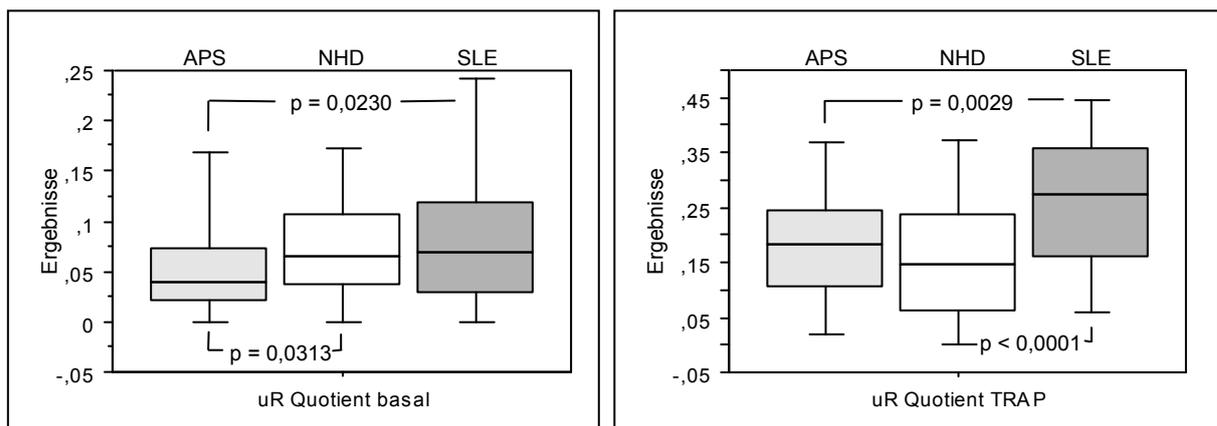
### 3.2.2.1 Anteil der TTLA an der Gesamtpopulation der T-Lymphozyten

Wie aus der Tabelle 3.29 und der Abbildung 3.13 hervorgehen, besitzen die APS-Patienten den geringsten Anteil an TTLA basal (3,9 %). Die Normalprobanden und die SLE-Patienten weisen annähernd denselben Median auf (6,5 % versus 6,9 %).

Unter Stimulation fächert sich das Feld auf. Die SLE-Patienten weisen den höchsten Anteil an TTLA mit 27,5 % und legen damit um 20,6 % zu. Genau wie sie verdreifachen die APS-Patienten ihren Anteil an TTLA unter Stimulation, dies entspricht einer Zunahme um 14 %. Die Normalprobanden verdoppeln nur die TTLA und erreichen bei 8 % Zunahme den geringsten Wert unter Stimulation.

**Tabelle 3.29: Darstellung der Mediane des Anteils der TTLA an der Gesamtpopulation der T-Lymphozyten**

Kollektive	APS	NHD	SLE
Anzahl	33	113	115
<b>basal</b>			
Median	0,039	0,065	0,069
Abweichung des Medians	0,021	0,034	0,043
<b>TRAP</b>			
Median	0,182	0,147	0,275
Abweichung des Medians	0,073	0,088	0,103



**Abbildung 3.13: graphische Darstellung des Anteils der TTLA an der Gesamtpopulation der T-Lymphozyten**

Ein hochsignifikanter Unterschied liegt unter Stimulation zwischen den Normalprobanden und den SLE-Patienten vor (

Tabelle 3.30). Weitere signifikante Werte werden für die Unterschiede basal und stimuliert zwischen den SLE- und den APS-Patienten und außerdem für die Unterscheidung von Normalprobanden und APS-Patienten basal erreicht.

Tabelle 3.30: Darstellung der Signifikanzen des Anteils der TTLA an der Gesamtpopulation der T-Lymphozyten

	basal	TRAP
NHD vs APS	<b>0,0230</b>	0,2561
NHD vs SLE	0,8606	<b>&lt;0,0001</b>
APS vs SLE	<b>0,0313</b>	<b>0,0029</b>

### 3.2.3 Thrombozyten-Granulozyten-Monozyten-Aggregate (TGMA)

Bei dem Vergleich der TGMA aus der Tabelle 3.31 und der Abbildung 3.14 zeigen sich relativ identische Basalwerte für die APS-Patienten mit 10,56 und die Normalprobanden mit 10,18. Von ihnen heben sich die SLE-Patienten deutlich ab. Ihr Median liegt mit 14,85 darüber. Unter Stimulation weisen die SLE-Patienten ebenfalls den höchsten Median mit 46,38. Mit fast identischen Werten liegen die beiden anderen Kollektive mit 34,89 für die APS-Patienten und 33,6 für die Normalprobanden unterhalb dem der SLE-Patienten. Generell läßt sich unter Stimulation für alle Kollektive eine Zunahme um den Faktor 3 feststellen.

Tabelle 3.31: Darstellung der Mediane für die TGMA

Kollektive	APS	NHD	SLE
Anzahl	33	113	115
<b>basal</b>			
Median	10,56	10,18	14,85
Abweichung des Medians	5,00	5,59	6,09
<b>TRAP</b>			
Median	34,89	33,60	46,38
Abweichung des Medians	12,57	9,02	10,02

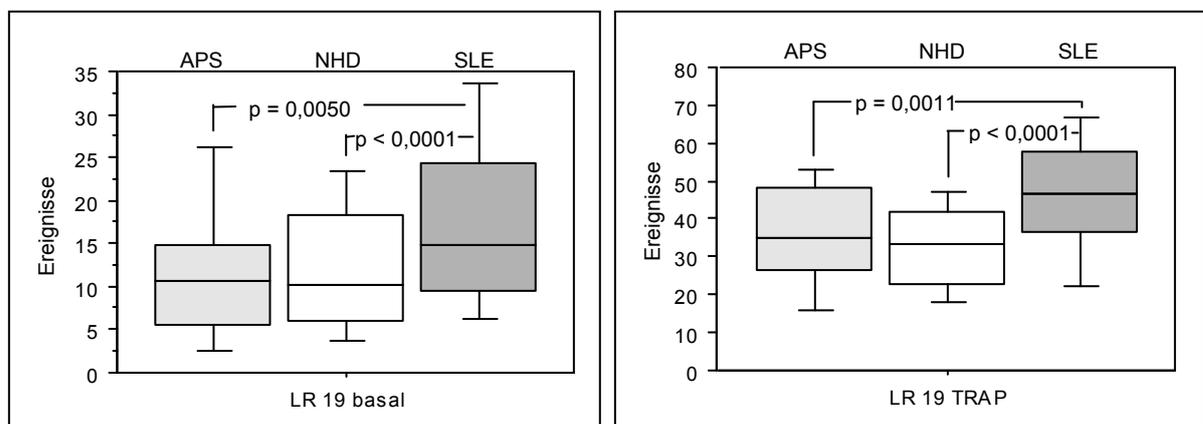


Abbildung 3.14: graphische Darstellung der Mediane und der Signifikanzen für TGMA basal und stimuliert

Hochsignifikante Werte werden für den Vergleich der Normalprobanden mit den SLE-Patienten unter basalen wie stimulierten Bedingungen erzielt. Signifikante Unterschiede der Mediane liegen für die Paarung APS- und SLE-Patienten basal und stimuliert vor.

**Tabelle 3.32: Darstellung der Signifikanzen für die TGMA**

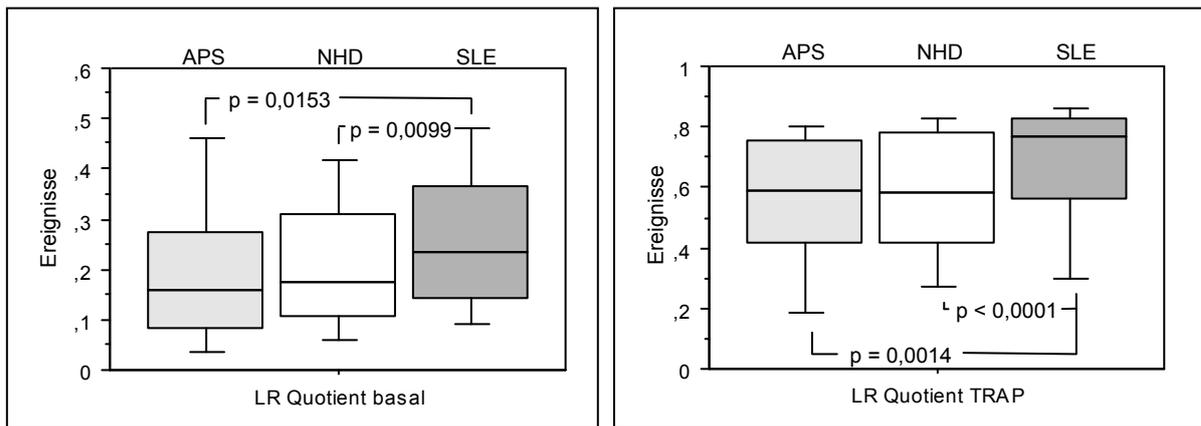
	basal	TRAP
NHD vs APS	0,6751	0,3204
NHD vs SLE	<0,0001	<0,0001
APS vs SLE	0,0050	0,0011

### 3.2.3.1 Anteil der TGMA an der Gesamtpopulation der Granulo- und Monozyten

Die Quotienten der TGMA zeichnen den Trend nach, der sich bei den TGMA gezeigt hat. Die SLE-Patienten liegen unter basalen (23,4 %) wie auch unter stimulierten Bedingungen (76,9 %) über denen der beiden anderen Gruppen (Tabelle 3.33 und Abbildung 3.15). Unter basalen Bedingungen weisen die APS-Patienten den niedrigsten Wert mit 15,7 % auf. Die Normalprobanden liegen mit 17,5 % leicht darüber. Die Normalprobanden weisen den geringsten Wert mit 58,5 % auf, die APS-Patienten liegen unwesentlich darüber mit 58,7 %. Bei den APS-Patienten und den Normalprobanden liegt ein Zuwachs von ca. 40 % vor, der von den SLE-Patienten liegt mit 53,5 % am höchsten.

**Tabelle 3.33: Darstellung der Mediane des Anteils der TGMA an der Gesamtpopulation der Granulo- und Monozyten**

Kollektive	APS	NHD	SLE
Anzahl	33	113	115
	<b>basal</b>		
Median	0,157	0,175	0,234
Abweichung des Medians	0,082	0,095	0,108
	<b>TRAP</b>		
Median	0,587	0,585	0,769
Abweichung des Medians	0,169	0,189	0,082



**Abbildung 3.15:** Darstellung der Mediane und Signifikanzen für den Anteil der TGMA an der Gesamtpopulation der Granulo- und Monozyten basal und stimuliert

Ein hochsignifikanter Unterschied zeigt sich unter Stimulation zwischen den Normalprobanden den SLE-Patienten (Tabelle 3.34). Basal liegt bei dieser Paarung nur ein signifikanter Unterschied vor. Weitere Signifikanzen ergeben sich für den Vergleich von APS- und SLE-Patienten basal und stimuliert.

**Tabelle 3.34:** Darstellung der Signifikanzen des Anteils der TGMA an der Gesamtpopulation der Granulo- und Monozyten

	basal	TRAP
NHD vs APS	0,3919	0,6670
NHD vs SLE	<b>0,0099</b>	<b>&lt;0,0001</b>
APS vs SLE	<b>0,0153</b>	<b>0,0014</b>

### 3.2.4 Subgruppenanalysen

Auch im Zusammenhang mit den Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten bot es sich an, die bei den Oberflächenmarkern untersuchten Fragestellungen auf die Aggregate zu übertragen.

#### 3.2.4.1 Antiphospholipid-Antikörper-Status und die Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate

In die Betrachtung des APL-Antikörper-Status sind alle positiven und negativen SLE-Patienten sowie die positiven APS-Patienten einbezogen worden. Dabei ergeben sich basal und stimuliert bei den APS-Patienten sowohl für die absoluten Werte der unterschiedlichen Aggregate als auch für deren Quotienten die niedrigsten Werte, außer für die TLA und den Quotienten der TLA (Tabelle 3.35). Bei den APL-positiven SLE-Patienten liegen mit zwei Ausnahmen erhöhte Werte im Vergleich zu den negativen vor, nämlich die TTLA basal und die TLA stimuliert. Die positiven SLE-Patienten stellen sich als das Kollektiv mit den höchsten Medianen für die Aggregate dar. Bei

den Differenzen der Quotienten läßt sich feststellen, daß die größten Unterschiede im Zuwachs der Anzahl der Aggregate für die TLA und die TGMA von den APL-negativen Patienten erreicht werden (30 % und 62 %). Die niedrigsten werden von den APS-Patienten mit 21 % für die TLA und 15 % für die TTLA erzielt. Der Unterschied für die TGMA zwischen den APS- und den SLE-Patienten beträgt nur 2 % (47 % versus 45 %). Unter Berücksichtigung der Medianwerte lassen sich für die APL-negativen Steigerungen um den Faktor 6 für die TLA und 4 für die TTLA und TGMA errechnen. Die Steigerungsraten der APL-positiven liegen darunter, wobei die der positiven SLE-Patienten für die TLA (3fach) und die TGMA (2,7fach) geringer ausfallen als diejenigen der APS-Patienten (4- und 3,3fach). Bei den TTLA weisen die APL-positiven SLE-Patienten mit annähernd einer Verfünffachung von allen 3 Kollektiven die größte Zunahme vor.

**Tabelle 3.35: Darstellung der Mediane für alle Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate und deren Quotienten aufgeteilt nach dem APL-Antikörper-Status**

Kollektive	SLE - APL negativ	SLE - APL positiv	APS - APL positiv
Anzahl	58	20	27
<b>basal</b>			
TLA	1,93	3,17	2,37
Quotient TLA	0,07	0,14	0,08
TTLA	4,45	4,37	3,30
Quotient TTLA	0,05	0,07	0,04
TGMA	11,64	21,03	10,98
Quotient TGMA	0,16	0,34	0,17
<b>TRAP</b>			
TLA	11,51	10,09	9,53
Quotient TLA	0,36	0,38	0,29
TTLA	19,09	20,98	13,50
Quotient TTLA	0,26	0,32	0,19
TGMA	48,86	57,38	36,21
Quotient TGMA	0,78	0,79	0,64

Bei der Analyse der Unterschiede (Tabelle 3.36) ergeben sich basal Signifikanzen für die TLA und deren Quotient sowie die TGMA und deren Quotient zwischen den negativen und den positiven SLE-Patienten. Trends zeichnen sich für diese Gruppierung basal für den TTLA Quotienten und stimuliert für die TGMA ab. Signifikante Unterschiede zwischen den APL-Positiven erreichen sowohl basal als auch stimuliert die TGMA und deren Quotient und der TTLA Quotient unter Stimulation. Trends liegen für diese für die Quotienten der TLA basal und stimuliert sowie für den Quotienten der TTLA basal und die TTLA stimuliert vor. Angesichts der vielen signifikanten Ergebnisse bietet es sich an, weitere Untersuchungen zu den APL-Antikörper

positiven Patienten vorzunehmen und diese in die unterschiedlichen Antikörpergruppen einzuteilen.

**Tabelle 3.36: Darstellung der Signifikanzen für alle Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate und deren Quotienten aufgeteilt nach dem APL-Antikörper-Status**

	SLE-APL positiv vs SLE-APL negativ	SLE-APL positiv vs APS-APL positiv
<b>basal</b>		
TLA	<b>0,0475</b>	0,4380
Quotient TLA	<b>0,0080</b>	<u>0,1058</u>
TTLA	0,3423	0,2727
Quotient TTLA	<u>0,1552</u>	<u>0,1436</u>
TGMA	<b>0,0006</b>	<b>0,0010</b>
Quotient TGMA	<b>0,0044</b>	<b>0,0064</b>
<b>TRAP</b>		
TLA	0,7952	0,7396
Quotient TLA	0,4328	<u>0,0512</u>
TTLA	0,5514	<u>0,1131</u>
Quotient TTLA	0,2599	<b>0,0291</b>
TGMA	<u>0,1209</u>	<b>0,0018</b>
Quotient TGMA	0,4718	<b>0,0060</b>

### 3.2.4.1.1 Anticardiolipin-Antikörper- und $\beta_2$ -Glykoprotein I Antikörper-Status bei SLE-Patienten

Bei der weiteren Unterteilung der APL-positiven SLE-Patienten nach ihrem Antikörper-Status zeigt sich bei den ACL-positiven ein wesentlich höheres Ausfallen der Median basal wie stimuliert gegenüber den ACL-negativen (Tabelle 3.37). Die ACL-negativen weisen die höchsten faktoriellen Anstiege der Mediane auf. Prozentual liegt dies nur für die TLA (29 % versus 27 %) und die TGMA (58 % versus 45 %) vor, wobei bei den letztgenannten ein besonders großer Unterschied von 13 % besteht. Für die TLA verfünffachen die ACL-negativen fast ihren Median, wogegen die ACL-positiven ihn verdreifachen. Bei den prozentualen Anstiegen dieser Paarung stellt sich nur eine Differenz von 2 % ein (27 % bei den ACL-positiven versus 29 % bei den ACL-negativen). Bei den TTLA kommt es seitens der ACL-positiven zu einer Verdreifachung des Basalwertes, was einem prozentualen Anstieg um 24 % entspricht. Die ACL-negativen erzielen für die TTLA eine Vervierfachung ihres Medians, schneiden aber wegen des geringeren Anteils an TTLA unter Stimulation im prozentualen Zuwachs mit 21 % geringfügig schlechter ab. Die TGMA legen um den Faktor 2 bei den ACL-positiven und um annähernd 4 bei den negativen zu. Prozentual gesehen liegt für die ACL-positiven ein geringerer Zuwachs mit 45 % versus 58 % bei den negativen vor.

Tabelle 3.37: Darstellung der Mediane und der Signifikanzen der ACL-positiven und -negativen SLE-Patienten

	ACL positiv	ACL negativ	Signifikanz
Anzahl	22	72	
<b>basal</b>			
TLA	3,85	2,36	<b>0,0345</b>
Quotient TLA	0,15	0,08	<b>0,0021</b>
TTLA	6,34	4,67	<u>0,1321</u>
Quotient TTLA	0,10	0,06	<u>0,0658</u>
TGMA	26,69	12,72	<b>&lt;0,0001</b>
Quotient TGMA	0,35	0,19	<b>0,0003</b>
<b>TRAP</b>			
TLA	11,87	11,59	0,4584
Quotient TLA	0,42	0,37	<b>0,0465</b>
TTLA	21,11	19,09	0,6243
Quotient TTLA	0,33	0,27	0,3612
TGMA	60,06	47,21	<b>0,0042</b>
Quotient TGMA	0,80	0,77	<u>0,0507</u>

Signifikante Unterschiede der Gruppen ergeben sich für: die TLA basal und deren Quotient basal und stimuliert, die TGMA basal (hochsignifikant) und stimuliert und für deren Quotient basal, der unter Stimulation einen starken Trend zum Unterschied zeigt. Für die basalen Mediane der TTLA und deren Quotient liegt ein Trend bzw. ein starker Trend vor.

Bei der Analyse der  $\beta_2$ -Glykoprotein I positiven und negativen SLE-Patienten bietet sich ein ähnliches Bild wie bei der obigen Fragestellung. Im Basalwertebereich weisen die  $\beta_2$ -Glykoprotein I positiven zahlenmäßig höhere Werte auf als die negativen. Unter Stimulation dominieren die negativen mit ihren Medianen für die TLA und die TGMA und deren jeweiligen Quotienten. Bei der Betrachtung der Steigerungen unter Stimulation weisen die negativen die höchsten Zunahmen. Für die TTLA und TGMA verzeichnen sie einen Zuwachs um ca. das Vierfache ihres Ausgangswertes. Bei den TLA legen sie um den Faktor 5 zu, die positiven hingegen nur knapp um den Faktor 2. Bei den prozentualen Anstiegen nehmen die Mediane der negativen deutlich mehr zu als die der positiven (29 %, 22 % und 59 % versus 19 %, 13 % und 29 %).

**Tabelle 3.38: Darstellung der Mediane und der Signifikanzen der  $\beta_2$ -Glykoprotein I positiven und negativen SLE-Patienten**

	$\beta_2$ GPI positiv	$\beta_2$ GPI negativ	Signifikanz
Anzahl	7	70	
<b>basal</b>			
TLA	5,43	2,15	<u>0,0693</u>
Quotient TLA	0,15	0,08	<u>0,0825</u>
TTLA	7,14	4,35	<u>0,0616</u>
Quotient TTLA	0,17	0,05	<u>0,0873</u>
TGMA	20,65	12,86	<u>0,1563</u>
Quotient TGMA	0,34	0,20	0,2877
<b>TRAP</b>			
TLA	10,00	11,51	0,4050
Quotient TLA	0,34	0,37	0,3950
TTLA	24,13	19,81	0,3298
Quotient TTLA	0,30	0,27	0,5007
TGMA	42,95	50,83	<u>0,0958</u>
Quotient TGMA	0,63	0,79	<u>0,0523</u>

Bei den Signifikanzen zeigt sich ein Trend bei den TGMA basal. Starke Trends zum Unterschied liegen bei den TLA und den TTLA und deren Quotienten basal und den TGMA und deren Quotient stimuliert vor.

#### 3.2.4.1.2 Anticardiolipin-Antikörper- und $\beta_2$ -Glykoprotein I Antikörper-Status bei APS-Patienten

Wie bei den SLE-Patienten wurden auch die APS-Patienten nach ihren Antikörper-Status eingeteilt und untersucht. Dabei ergibt sich, wie bei den SLE-Patienten ein höherer Ausfall der Mediane für die ACL-positiven, mit Ausnahme für den Quotient der TTLA unter Stimulation für den Parität vorliegt. Unterschiede im faktoriellen Zuwachs liegen für die TTLA und weniger stark ausgeprägt für die TGMA vor. Bei den TTLA weisen die negativen einen Anstieg um den Faktor 8 auf, die ACL-positiven um den Faktor 4. Bei den TGMA besteht ein geringer Unterschied mit 3,3 bei den positiven versus 3,6 bei den negativen. Die größten prozentualen Anstiege werden von den ACL-positiven erreicht mit 21 % für die TLA versus 14 % und 47 % für die TGMA versus 35 %. Für die TTLA fällt der prozentuale Zuwachs auf der Seite der negativen mit 17 % höher aus verglichen mit 15 % bei den positiven.

Tabelle 3.39: Darstellung der Mediane und der Signifikanzen der ACL-positiven und -negativen APS-Patienten

	ACL positiv	ACL negativ	Signifikanz
Anzahl	26	6	
<b>basal</b>			
TLA	2,37	1,11	<u>0,0666</u>
Quotient TLA	0,08	0,05	0,3590
TTLA	3,30	1,30	<u>0,1924</u>
Quotient TTLA	0,04	0,02	0,2369
TGMA	10,98	8,09	0,3590
Quotient TGMA	0,17	0,10	<u>0,1345</u>
<b>TRAP</b>			
TLA	9,53	4,30	<u>0,0535</u>
Quotient TLA	0,29	0,19	<u>0,0740</u>
TTLA	13,50	10,94	0,4398
Quotient TTLA	0,19	0,19	0,8092
TGMA	36,21	28,82	0,4118
Quotient TGMA	0,64	0,45	<u>0,1007</u>

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Tabelle 3.40 ergibt sich eine fast deckungsgleiche Befundkonstellation wie bei der Darstellung Tabelle 3.39. An erster Stelle der Mediane stehen die der  $\beta_2$ -Glykoprotein I positiven APS-Patienten. Nur unter Stimulation fallen die Mediane der  $\beta_2$ -Glykoprotein I negativen für die TTLA und deren Quotient höher aus als bei den positiven. Beim Vergleich der Zuwachsrates liegen so gut wie keine Unterschiede für die TLA vor (3,5 und 3,4). Ein enormer Unterschied liegt dagegen bei der Rate der TTLA vor. Die negativen legen um den Faktor 15 zu, die positiven um 4. Bei den TGMA erweist sich der Unterschied mit 3,5 als nicht so ausgeprägt für die  $\beta_2$ -Glykoprotein I positiven und 4,4 für die negativen. Die prozentualen Anstiege liegen annähernd gleich mit denen der ACL-positiven bzw. -negativen. Die positiven sind in der Zunahme der TLA mit 24 % versus 14 % und für die TGMA 48 % versus 36 % den  $\beta_2$ -Glykoprotein I negativen überlegen, die bei den TTLA den größeren Zuwachs mit 19 % versus 14 % verzeichnen.

Tabelle 3.40: Darstellung der Mediane und der Signifikanzen der  $\beta_2$ -Glykoprotein I positiven und negativen APS-Patienten

	$\beta_2$ GPI positiv	$\beta_2$ GPI negativ	Signifikanz
Anzahl	23	8	
<b>basal</b>			
TLA	2,46	1,35	<u>0,1141</u>
Quotient TLA	0,09	0,05	0,2062
TTLA	3,45	1,02	<b>0,0378</b>
Quotient TTLA	0,04	0,01	<u>0,1304</u>
TGMA	11,01	6,49	0,2405
Quotient TGMA	0,17	0,09	<u>0,1141</u>
<b>TRAP</b>			
TLA	8,61	4,56	<u>0,1141</u>
Quotient TLA	0,33	0,19	<u>0,0579</u>
TTLA	12,33	15,10	0,4983
Quotient TTLA	0,18	0,20	0,8923
TGMA	39,05	28,82	<u>0,1041</u>
Quotient TGMA	0,65	0,45	<u>0,0642</u>

### 3.2.4.2 Thrombosen bei APS-Patienten und die Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate

Die Patienten mit erlittener Thrombose weisen basal höhere Mediane für die TLA und deren Quotient sowie die TTLA auf und unter Stimulation für die Quotienten der TLA und TTLA und die TTLA. Die Patienten ohne thrombotisches Ereignis liegen mit ihrem Median am höchsten für die TLA stimuliert und die TGMA und deren Quotient jeweils basal und stimuliert. Für den Quotienten der TTLA fallen die Ergebnisse gleich aus. Bei den Zuwachsraten gibt es kein eindeutiges Verteilungsmuster. Die Patienten ohne Thrombose zeichnen sich durch einen höheren faktoriellen Anstieg bei den TLA (3,9 versus 3,1) aus. Die Vervielfältigung der Aggregate unter Stimulation fällt für die APS-Patienten mit Thrombose bei den TTLA mit einer annähernden Vervielfachung und den TGMA mit 3,6 höher aus als für die Patienten ohne okkludierendes Ereignis (3,7 und 3,2). Die prozentualen Differenzen der Zunahme der Aggregate weichen bei den TLA und den TTLA nicht wesentlich voneinander ab (15 % und 14 % bzw. 16 % und 15 %). Ein Unterschied zeigt sich bei den TGMA, die bei den blanden Patienten zu einem höheren Prozentsatz (47 %) gebildet werden als die der Patienten mit Status nach Thrombose (40 %).

**Tabelle 3.41: Darstellung der Mediane und Signifikanzen aufgeteilt nach thrombotischen und nicht thrombotischen Ereignissen**

	keine Thrombose	Thrombose	Signifikanz
Anzahl	16	14	
<b>basal</b>			
TLA	1,88	2,06	0,9337
Quotient TLA	0,05	0,08	0,6625
TTLA	3,05	4,00	0,2444
Quotient TTLA	0,04	0,04	0,6625
TGMA	11,61	8,94	0,2987
Quotient TGMA	0,17	0,12	0,3604
<b>TRAP</b>			
TLA	7,30	6,35	>0,9999
Quotient TLA	0,20	0,24	0,5329
TTLA	11,21	15,55	0,2361
Quotient TTLA	0,18	0,19	0,4057
TGMA	36,97	32,03	0,2987
Quotient TGMA	0,64	0,52	0,2444

Es ergeben sich keinerlei Hinweise auf einen vorliegenden signifikanten Unterschied der beiden untersuchten Gruppen.

### 3.2.4.3 Einfluß der Medikation auf die Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate

Da sich bei der Untersuchung der Epitopendichteverteilung unter dieser Fragestellung Unterschiede herausgestellt haben, wurde diese Fragestellung auch noch einmal für die Aggregate aufgegriffen.

#### 3.2.4.3.1 Thrombozytenaggregationshemmer und Antikoagulanzen

Generell fällt auf, daß die APS-Patienten ohne Therapie mit Ausnahme für den Quotienten der TLA die geringsten Mediane aufweisen.

Tabelle 3.42: Darstellung der Mediane unter keiner, antiaggregatorischer und antikoagulatorischer Therapie

	keine Therapie	Acetylsalicylsäure	Phenprocoumon
Anzahl	5	16	11
<b>basal</b>			
TLA	1,95	2,31	2,07
Quotient TLA	0,07	0,08	0,04
TTLA	1,64	3,36	3,23
Quotient TTLA	0,03	0,04	0,04
TGMA	7,41	10,45	12,53
Quotient TGMA	0,10	0,15	0,18
<b>TRAP</b>			
TLA	2,44	7,58	8,54
Quotient TLA	0,06	0,31	0,25
TTLA	9,09	13,50	16,67
Quotient TTLA	0,15	0,18	0,23
TGMA	20,59	39,87	31,93
Quotient TGMA	0,37	0,63	0,63

Die höchsten Werte werden unter Acetylsalicylsäure-Therapie für die TLA und die TTLA basal, für den Quotienten der TLA basal und stimuliert und für die TGMA stimuliert erreicht. Unter Antikoagulation liegen hohe Mediane für die TGMA und deren Quotient basal, unter Stimulation für die TLA sowie die TTLA und den Quotient der TTLA vor. Bei den prozentualen Differenzen liegen die größten Zuwächse jeweils bei den therapierten Kollektiven vor. Die Acetylsalicylsäure behandelten Patienten besitzen hohe Anstiege für die TLA (23 %) und die TGMA (48 %) im Vergleich zu den Antikoagulierten (21 % und 45 %). Bei den TTLA zeigen die Antikoagulierten eine höhere Zunahme von 19 % verglichen mit 14 %.

Tabelle 3.43: Darstellung der Signifikanzen unter keiner, antiaggregatorischer und antikoagulatorischer Therapie

	keine Antikoagulation vs Acetylsalicylsäure	keine Antikoagulation vs Phenprocoumon	Phenprocoumon vs Acetyl- salicylsäure
<b>basal</b>			
TLA	0,4574	0,7770	0,4592
Quotient TLA	0,4328	0,8651	0,3237
TTLA	<u>0,0905</u>	0,2127	0,7298
Quotient TTLA	0,2831	0,3079	0,9803
TGMA	0,3637	0,5332	0,8435
Quotient TGMA	0,2477	0,6504	0,9410
<b>TRAP</b>			
TLA	<u>0,0986</u>	<u>0,1567</u>	0,8823
Quotient TLA	<b>0,0258</b>	<u>0,1262</u>	0,9214
TTLA	<u>0,0758</u>	<u>0,1004</u>	0,4897
Quotient TTLA	0,2477	<u>0,1926</u>	0,9214
TGMA	<u>0,0693</u>	<u>0,1262</u>	0,5873
Quotient TGMA	<u>0,1167</u>	0,1926	0,9214

Als signifikanter Unterschied liegt nur einer zwischen antiaggregierten und nicht therapierten für den Quotienten der TLA unter Stimulation vor.

### 3.2.4.3.2 Immunsuppressiva und Malariamittel

Die Ergebnisse der Tabelle 3.44 zeigen, daß die SLE-Patienten ohne antimalarische und / oder immunsuppressive Therapie bis auf einige Ausnahmen (basal der TGMA Quotient, stimuliert die TLA, die TGMA und deren Quotient) die geringsten Mediane aufweisen.

Bei dem Vergleich der Mediane Tabelle 3.45 ergibt sich für die SLE-Patienten ohne Therapie und denen aus den unterschiedlichen Therapieregimen ein signifikantes Ergebnis für den Quotienten der TLA beim Vergleich mit den Immunsupprimierten. Als signifikant ist der Unterschied der TLA unter Stimulation zu bezeichnen. Wegen der fehlenden Unterschiede der Basalwerte zwischen den nicht und den antimalarisch behandelten SLE-Patienten wird auf eine weitergehende Untersuchung aufgeteilt nach den Wirkstoffen verzichtet.

Tabelle 3.44: Darstellung der Mediane unter unterschiedlichen Therapieregimen

Therapie	keine	Immun	Immun + Malaria	Malaria
Anzahl	9	27	27	19
<b>basal</b>				
TLA	1,64	4,22	2,15	2,54
Quotient TLA	0,06	0,12	0,12	0,07
TTLA	3,88	6,99	5,07	2,75
Quotient TTLA	0,04	0,08	0,07	0,04
TGMA	15,89	19,20	16,59	12,31
Quotient TGMA	0,18	0,32	0,22	0,20
<b>TRAP</b>				
TLA	9,26	14,88	7,14	15,37
Quotient TLA	0,32	0,42	0,37	0,38
TTLA	20,45	23,67	12,57	20,96
Quotient TTLA	0,24	0,32	0,22	0,27
TGMA	46,29	51,35	53,58	49,59
Quotient TGMA	0,70	0,79	0,77	0,81

Tabelle 3.45: Darstellung der Signifikanzen unter den unterschiedlichen Therapieregimen

	keine vs Immun	keine vs Immun + Malaria	keine vs Malaria
<b>basal</b>			
TLA	<u>0,1264</u>	0,3956	0,2684
Quotient TLA	<b>0,0300</b>	<u>0,1034</u>	0,6055
TTLA	<u>0,1173</u>	0,5125	0,7122
Quotient TTLA	<u>0,0968</u>	0,2357	0,9804
TGMA	<u>0,1994</u>	0,5473	0,7122
Quotient TGMA	0,3854	0,6454	0,9804
<b>TRAP</b>			
TLA	<u>0,0542</u>	0,8595	<b>0,0085</b>
Quotient TLA	<u>0,1311</u>	0,5711	<u>0,1099</u>
TTLA	0,4063	0,3858	0,4757
Quotient TTLA	0,2906	0,9854	0,3252
TGMA	0,4503	0,3392	0,7492
Quotient TGMA	0,2271	0,6970	<u>0,1335</u>

Werden die unterschiedlichen Therapieregime miteinander verglichen, so ergeben sich für den Vergleich der alleinigen immunsuppressiven Therapie mit der

Kombinationstherapie aus Immunsuppression und Malariamittel Signifikanzen für die TLA und die TTLA, beide unter Stimulation. Bei der abschließenden Betrachtung der Signifikanzen aus der Gruppe der Kombinationstherapie verglichen mit der antimalarischen Monotherapie lassen sich Signifikanzen und Trends aufzeigen. Signifikante Werte liegen vor für die Quotienten der TLA und der TTLA basal sowie für die TLA und TTLA stimuliert. Trends weisen die TTLA basal, die TGMA basal und stimuliert und die Quotienten der TTLA und TGMA unter Stimulation auf.

**Tabelle 3.46: Darstellung der Signifikanzen unter den unterschiedlichen Therapieregimen**

	Immun vs Immun + Malaria	Immun vs Malaria	Immun + Malaria vs Malaria
<b>basal</b>			
TLA	0,1714	0,2232	0,4480
Quotient TLA	0,4996	0,0097	0,0395
TTLA	0,1634	0,0022	0,1186
Quotient TTLA	0,5106	0,0030	0,0319
TGMA	0,5331	0,0274	0,1556
Quotient TGMA	0,3410	0,1181	0,6257
<b>TRAP</b>			
TLA	0,0059	0,9633	0,0011
Quotient TLA	0,1557	0,1293	0,4611
TTLA	0,0362	0,8272	0,0143
Quotient TTLA	0,1113	0,7046	0,1107
TGMA	0,3963	0,3701	0,1264
Quotient TGMA	0,5737	0,3520	0,1934

## 4 Diskussion

Untersucht wurde in drei Kollektiven (Normalprobanden, SLE- und APS-Patienten) die Epitopendichteverteilung von thrombozytären Aktivitätsmarkern sowie die Aggregatbildung mit Leukozyten. Die Versuche sind im Hinblick auf eine bessere Charakterisierung der SLE- und APS-Patienten im Vergleich zu einem Normalprobandenkollektiv durchgeführt worden. Da die beiden Patientenkollektive von rezidivierenden thromboembolischen Komplikationen heimgesucht werden, war es das Ziel mittels des thrombozytären in vitro-Profiles (Epitopendichte und Aggregation) eine bessere Risikostratifizierung der Patienten vornehmen zu können.

Die durchgeführten Untersuchungen zur Epitopendichteverteilung sowie der Aggregatbildung zwischen Thrombozyten und den Leukozytenpopulation (Lymphozyten, T-Lymphozyten und Granulo-Monozyten) ergeben, daß signifikante Unterschiede der SLE-Patienten zu den beiden anderen Kollektiven (Normalprobanden und APS-Patienten) in beiden Versuchsreihen nachweisbar sind.

### 4.1 P-Selektin als Aktivitätsparameter für Thrombozyten

Das P-Selektin ist ein geeigneter Parameter, um die Aktivierung der Thrombozyten auch bei den SLE-Patienten nachzuweisen. P-Selektin ist ein Oberflächenprotein, das nach Aktivierung mittels Degranulation aus intrazytoplasmatischen Pools der Thrombozyten externalisiert wird [1]. Dies bietet die Möglichkeit, innerhalb einer gewissen Latenz aktivierte Thrombozyten zu erfassen. Unter basalen wie stimulierten Bedingungen unterscheiden sich die SLE-Patienten von den Normalprobanden signifikant ( $p = 0,0008$  basal und stimuliert). Die SLE-Patienten weisen eine höhere Expression des P-Selektins auf, und damit eine erhöhte thrombozytäre Aktivierung, die ihren Ausdruck in einer generell gesteigerten Aggregatbildung findet. Bei der weiteren Untersuchung der SLE-Patienten stellt sich heraus, daß besonders die APL-positiven Patienten hohe Werte aufweisen und sich signifikant von den APL-negativen unterscheiden (sowohl für das P-Selektin als auch für die Aggregatbildung). Somit hat bei den SLE-Patienten der Antiphospholipid-Antikörper-Status einen signifikanten Einfluß auf die thrombozytäre Aktivität. Untersuchungen zu einem Zusammenhang zwischen APL-Ak-Titer und der P-Selektin-Expression zeigen keinerlei Korrelation (Ergebnisse wurden nicht dargestellt).

Die APL-Ak werden in der Literatur immer wieder als Erklärung für eine thrombozytäre Aktivierung angeführt [32], so daß erwartet worden war, daß wegen der klinisch rezidivierenden Embolieereignisse bei den APS-Patienten eine Aktivierung der Thrombozyten vorliegen müßte und deren Werte zwischen oder oberhalb derer der SLE-Patienten und der Normalprobanden liegen müßten. Die Werte der APS-Patienten unterscheiden sich nur selten von den beiden anderen Kollektiven. Grund hierfür kann die geringe Stichprobengröße sein, aber auch Unterschiede in der

Pathophysiologie der beiden Erkrankungen bzw. deren Interaktion beim sekundären APS. Die APL-Ak allein können jedoch nicht die Erklärung sein, denn sonst müßten die APS-Patienten ebenfalls eine thrombozytäre Aktivierung aufweisen. Somit müssen noch andere Einflußgrößen die Versuchsergebnisse beeinflusst haben, die hier nicht erfaßt worden sind.

In der Literatur gibt es kontroverse Darstellungen bezüglich einer vermehrten Expression des P-Selektins bei SLE-Patienten. Die Hypothese einer höheren Epitopendichte des P-Selektins und damit einer thrombozytären Aktivierung bei den SLE-Patienten wird durch die Ergebnisse von Joseph et al nicht bestätigt [24]. Aufgrund der protokollarisch identischen Methoden könnten diese unterschiedlichen Aussagen durch die Kollektive, medikamentöse Einflüsse oder die Krankheitsaktivität erklärt werden. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Normalprobanden und SLE-Patienten) sind bei Nagahama beschrieben, die methodologisch identisch vorgegangen sind [49]. Sie stellten ebenfalls, trotz eines relativ kleinen Probandenkollektives von 22 SLE-Patienten, einen signifikanten Unterschied in der P-Selektin-Expression fest. Aus ihrer Arbeit geht hervor, daß SLE-Patienten mit hohen Spiegel an löslichen Thrombomodulin deutlich erhöhte Werte für das P-Selektin aufweisen. Sie sehen einen Zusammenhang der Zytokinbalance (erhöhte lösliche Thrombomodulin-Expression), der erhöhten Expression an P-Selektin und den systemischen wie auch vaskulären Schäden, die beim SLE auftreten. Da durch diese vaskulären Schäden Mediatoren aus den verletzten Endothelzellen freigesetzt werden und darunter auch Thrombozyten aktivierende Substanzen vorhanden sind und durch die Verletzung das prothrombogene Profil der Endothelien frei liegt, führt dies zu einer Aktivierung. Die Mediatoren sind in vitro schon anwesend und könnten so die Unterschiede der Ergebnisse der SLE-Patienten zu den beiden anderen Kollektiven und besonders zu den APS-Patienten erklären.

Auch für die APS-Patienten sind in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf das P-Selektin beschrieben worden. Die Arbeitsgruppe um Fanelli hat in Versuchen die Expression des P-Selektins und des CD 63 bei Patienten mit einem primären APS (pAPS) untersucht [13]. Sie stellten entgegengesetzte Ergebnisse zu den hier niedergeschriebenen für das P-Selektin bei den APS-Patienten fest. Ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,01$ ) lag für das P-Selektin zwischen den pAPS und den Normalprobanden bei Fanelli vor. Unterschiede zu dieser Arbeit ergeben sich erstens in der angewandten Methode, zweitens im untersuchten Kollektiv und drittens in der Stichprobenzahl. Die Arbeitsgruppe arbeitete mit plättchenreichem Plasma. Diese Methode kann bedingt durch die Aufreinigung zu einer artifiziellen Aktivierung der Thrombozyten führen, welches die Expression der Oberflächenmarker beeinflusst. Das angewandte in vitro Verfahren der durchflußzytometrischen Untersuchung von Thrombozyten in Vollblut mittels spezifischer monoklonaler Antikörper wird als das direkte Verfahren angesehen, das in vitro zu der geringsten Aktivierung der Thrombozyten führt, da kein Zentrifugieren oder Aufreinigen nötig ist [46]. Somit ermöglicht diese sehr schonende durchflußzytometrische Methode eine gute Erfassung des Aktivierungszustandes der Thrombozyten. Ein weiterer Unterschied liegt bei den Probanden: Fanellis Arbeitsgruppe vergleicht pAPS und Normalprobanden. Bei unseren Kollektiven handelt es sich um Patienten mit einem sAPS.

Unter der Annahme, daß die zugrunde liegende Pathologie für das pAPS die gleiche wie die für das sAPS sein sollte, wären relativ ähnliche Ergebnisse bei der primären sowie sekundären Form der Erkrankung für die Expression dieses Oberflächenmarkers zu erwarten. Als ein weiterer zu berücksichtigender Punkt ist die Anzahl der Patienten zu beachten, die bei Fanelli klein ausfällt: 16 Patienten.

Auch die Arbeitsgruppe um Joseph [23] und um Shechter [59] untersuchten die Aktivierung und den Umsatz der Thrombozyten bei pAPS und stellten fest, daß die pAPS sich von einem Normalprobandenkollektiv bezüglich der P-Selektin-Expression voneinander nicht unterschieden. Sie haben bis auf geringfügige Unterschiede ein ähnliches Protokoll zur Untersuchung benutzt, wie das hier verwandte. Bis auf das unterschiedliche Probandenkollektiv (primäre statt sekundäre APS-Patienten), das in der Stichprobenzahl etwas geringer ausfällt als das untersuchte, zeigen die Untersuchungen dieselben Ergebnisse, so daß davon auszugehen ist, daß die verwendete Methode wesentlich für die Resultate verantwortlich ist.

Unter physiologischen Bedingungen ist bei den APS-Patienten keine vermehrte Expression des thrombozytären P-Selektins erfaßbar und keine thrombozytäre Aktivierung feststellbar. Trotz der unauffälligen P-Selektin-Expression ist nicht auszuschließen, daß sich die Thrombozyten der APS-Patienten in einem erhöhten Aktivierungszustand befinden. Anlaß dazu geben die Resultate von Michelson, die belegen, daß in der Zirkulation befindliche degranulierte Thrombozyten das auf der Thrombozytenoberfläche exprimierte P-Selektin schnell an die Umgebung abgeben [44]. Das lösliche P-Selektin wiesen sie im Plasma nach und zeigten, daß sich die Thrombozyten nach dem Verlust des P-Selektins weiterhin in einem funktions-tüchtigen Zustand im Blutkreislauf befinden. In unseren Versuchen wurde das lösliche P-Selektin nicht mitbestimmt, so daß ein Rückschluß auf eine vorliegende Aktivität nicht erfolgen kann. Bei den Untersuchungen von Joseph sind ebenfalls erhöhte Plasma-P-Selektin-Spiegel bei den pAPS nachgewiesen worden [23]. Somit wäre es möglich, daß trotz normaler thrombozytärer P-Selektin-Expression von einer Aktivierung der Thrombozyten der APS-Patienten ausgegangen werden kann. Allerdings darf nicht vergessen werden, daß das lösliche P-Selektin nicht alleine von den Thrombozyten stammt. Es kann auch von den Weibel-Palade-Bodies der Endothelzellen innerhalb kürzester Zeit externalisiert und an die Zirkulation abgegeben werden [26]. Allerdings ließen sich dann nicht erhöhte Werte für das CD 63 messen, welches als ein Anzeichen einer Thrombozytenaktivierung zu werten ist, wie es bei Joseph und Mitarbeitern der Fall war [23]. Laut Joseph kommt neben der Abgabe des P-Selektins an das Plasma auch die Bildung von Aggregaten mit den weißen Blutzellen [31] als Erklärungsansatz für die normalen Basalwerte des P-Selektins in Betracht. Da in der vorliegenden Abhandlung die Aggregatbildung mit den unterschiedlichen Leukozytenpopulationen (Lymphozyten, T-Lymphozyten und Granulo-Monozyten) untersucht wurde, und keine erhöhten Werte für die APS-Patienten festgestellt werden können, muß davon ausgegangen werden, daß diese Annahme ohne weiteres nicht haltbar ist. Demzufolge muß es andere Erklärungen für die normalen Basalwerte für das P-Selektin und die Aggregate der APS-Patienten geben. Eine Überlegung zu den normalen P-Selektin-Werten wäre, daß durch die sofortige Aktivierung der Thrombozyten in der Zirkulation das P-Selektin externalisiert wird und

sich auf einigen Thrombozyten in extrem erhöhter Dichte befindet, wogegen es auf anderen bereits aktivierten Thrombozyten wegen der Abgabe ans Plasma bereits nicht mehr meßbar ist. Ein weiterer Grund für die normalen P-Selektin Werte der APS-Patienten wäre, wie oben erwähnt, die artifiziell veränderte Umgebung in der der Versuch stattfindet, der die in vivo Situation nur bruchstückhaft widerspiegeln kann und damit wesentliche Faktoren vollkommen vernachlässigt.

Erhöhte P-Selektin-Werte sind auch bei anderen Erkrankungen beschrieben worden, unter anderem bei Diabetes, Sepsis, ARDS, Apoplex und Arteriosklerose. Da sich bei SLE-Patienten eine beschleunigte Arteriosklerose ausbilden kann, könnten die erhöhten P-Selektin-Werte als Indikatoren einer einsetzenden Arteriosklerose gedeutet werden, die eventuell als Indikator für kardiovaskuläre Komplikationen für das Ausmaß der Arteriosklerose dienen könnten.

Als sensitiverer Marker für die Thrombozytenaktivierung in vivo als das P-Selektin gilt die Ausbildung von Aggregaten [45]. Der Nachweis über die Bildung heterotypischer Aggregate zwischen Thrombozyten und Leukozyten -mediert über das P-Selektin [58]- wurden in in vitro Versuchen geführt [5] und bei SLE- und APS-Patienten erhoben [24]. Angesichts der erhöhten Werte für das P-Selektin bei den SLE-Patienten, das für eine erhöhte Aktivierung der zirkulierenden Thrombozyten spricht, bildet sich die Bereitschaft ab, mit anderen Zellen in Kontakt zu treten und somit heterotypische Aggregate in erhöhtem Maße auszubilden. Dies gilt für die SLE-Patienten, bei denen sich vermehrt TLA und TGMA nachweisen lassen. Bei der Ausbildung der Aggregate gilt für die SLE-Patienten ebenfalls, daß bei Vorhandensein von APL-Ak wesentlich höhere Raten an Thrombozyten-Aggregaten nachgewiesen werden. Aussagen über APL-Ak und Thrombozytenaggregate finden sich bei Wiener und Kollegen [65], die bei vorhandenen ACL-Antikörpern eine ACL-Komplex medierte Thrombozytenaggregation in vitro demonstrieren konnten. Diese Feststellung deckt sich mit den Ergebnissen, daß unter ACL bei SLE-Patienten TLA und TGMA vermehrt vorkommen.

Unterschiede zu Daten bezüglich der Ausbildung der Aggregate ergeben sich in der Literatur im Hinblick auf die verglichenen Kollektive. Während bei Joseph keine Unterschiede zwischen den SLE-Patienten mit oder ohne sekundären APS für die Granulo- und Monozyten-Aggregate nachgewiesen werden konnten [24], unterscheiden sich diese Kollektive bei den vorliegenden Untersuchungen bei gemeinsamer Betrachtung der Granulo-Monozyten-Aggregate signifikant ( $p < 0,01$ ) voneinander. Die SLE-Patienten mit sekundärem APS (im Ergebnisteil als APS-Patienten bezeichnet) zeigen in unseren Ergebnissen keinen Unterschied zu den Normalprobanden. Demzufolge läge von Seiten der hier untersuchten APS-Patienten eher ein Ergebnis vor, wie es vergleichbar dem der pAPS-Patienten aus der Studie um Joseph für die Granulozyten-Aggregate der Fall ist. Setzt man also die sAPS-Patienten mit den pAPS-Patienten gleich, so müßten sich ähnliche Ergebnisse für alle weiteren untersuchten Formen der Aggregate ergeben. Allerdings zeigt sich bei der anschließenden Betrachtung der Monozyten-Aggregate, daß dort die Resultate nicht übereinstimmen. Eine mögliche Erklärung liegt darin, daß die Kollektive unterschiedlich sind und somit das Verhalten ihrer Aggregate nicht miteinander vergleichbar ist. Beim

Vergleich der Lymphozyten-Aggregate liegen übereinstimmende Resultate vor. APS-Patienten weisen ein geringeres Niveau bezüglich der Aggregatbildung auf als die SLE-Patienten. Eine Aussage bezüglich der APS-Patienten verglichen mit den Normalprobanden wird dort nicht getroffen. Bei der Betrachtung der Aggregate der SLE-Patienten fällt auf, daß am meisten TGMA gebildet werden. TLA werden zu einem wesentlich geringeren Teil gebildet. Dies deckt sich mit Aussagen zur Aggregatbildung zwischen Leukozyten und immobilisierten Thrombozyten [30]. Beachtenswert ist auch, daß die SLE-Patienten am meisten Aggregate sowohl basal als auch unter Stimulation ausbilden und da ebenfalls ein hohes Auftreten des P-Selektins aufweisen. Bei diesen Werten unterscheiden sie sich immer hochsignifikant von den Normalprobanden.

Zusammenfassend liegt somit eine vermehrte Ausbildung der Aggregate bei den SLE-Patienten bedingt durch die thrombozytäre Aktivierung vor.

## 4.2 Thromboembolische Ereignisse

Eine der Zielsetzungen war es herauszufinden, ob sich ein Unterschied in der Dichteverteilung der Oberflächenmarker oder dem Aggregationsverhalten bei stattgehabtem venösem thrombotischem Ereignis bei den APS-Patienten ergibt. Das APS-Patientenkollektiv mit thrombotischem Ereignis wurde dabei Patienten ohne venösem Ereignis gegenübergestellt. In der Gruppe ohne venöses Ereignis wurden sowohl solitäre arterielle Embolien als auch Ereignisse in beiden Stromgebieten (arteriell und venös) sowie Aborte subsummiert. Es ergaben sich keinerlei Unterschiede in den Kollektiven. Da es sich bei allen Kollektiven um vasookklusive Ereignisse handelt, kann es durchaus sein, daß diese sich nicht unterscheiden. Zum Anderen lag zum Zeitpunkt der Untersuchungen bei keinem der Patienten ein aktuelles vasookklusives Ereignis vor. Es kann sein, daß zum Zeitpunkt eines thromboembolischen Ereignisses durchaus eine vermehrte Expression des P-Selektins vorliegt und eine vermehrte Aggregatbildung. Dies läßt sich aber anhand der erhobenen Daten nicht belegen und ist von daher rein spekulativ.

## 4.3 Beobachtungen unter medikamentöser Therapie

Die Untersuchungen zur Epitopendichteverteilung und Aggregatbildung wurden an Patientenkollektiven vorgenommen, die bereits unter Therapie waren. Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob sich unter den verschiedenen Therapien bei APS-Patienten oder SLE-Patienten Unterschiede im Epitopenprofil und in der Ausbildung heterotypischer Aggregate ergeben.

Bei den APS-Patienten wurde nach Unterschieden der Expression der Oberflächenproteine und der Ausbildung von Aggregaten unter einer antiaggregatorischen

Therapie mittels Aspirin, der antikoagulatorischen Therapie mit Phenprocoumon und einigen unbehandelten Patienten gesucht. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen zeigt sich für keinen der Oberflächenmarker ein signifikanter Unterschied. Auch wenn diese Ergebnisse auf sehr kleinen Stichproben beruhen, sind sie konform mit denen in der Literatur publizierten Resultaten [24]. Opara und Mitarbeiter konnten zeigen, daß es unter Zugabe von NSAR trotz vorhandener APL-Antikörperkomplexe zu einer Reduktion der Thromboxan B<sub>2</sub> Synthese kommt und damit ein stabiler Metabolit der Thrombozytenaktivierung nicht mehr meßbar ist. [53] Bedingt durch die Hemmung der Cyclooxygenase hat dies allerdings nur einen Einfluß auf die Thromboxansynthese, jedoch nicht auf die Expression der Rezeptoren, die aus den  $\alpha$ -Granulae freigesetzt werden. Demzufolge kann eine antithrombozytäre Therapie mit Acetylsalicylsäure, wie sie einige der APS-Patienten haben, nicht als Ursache für die normalen Werte gelten.

Bei den kleinen Stichproben bildet sich basal kein Unterschied in der Aggregation ab. Unter Stimulation zeigen sich bei den antiaggregatorisch behandelten Patienten eine signifikant höhere Aggregation mit Lymphozyten bei den Quotienten. Worauf dies beruht bleibt unklar. Unter Stimulation weisen alle anderen Aggregatpopulationen höhere Mediane als die Unbehandelten auf. Signifikanzen ergeben sich hierbei jedoch nicht, welches eventuell auf die bereits erwähnte geringe Stichprobengröße zurückzuführen ist. Andererseits liegen Berichte vor, daß diese Therapien keinerlei Auswirkung auf die Oberflächenmarker besitzen. Demzufolge ist auch kein Unterschied zwischen den Behandelten und den Nicht-Behandelten bedingt durch antiaggregatorische oder antikoagulatorische Medikamente zu erwarten.

Bei den SLE-Patienten konnte im Gegensatz zu bereits publizierten Daten [12] unter der Monotherapie mit Malariamitteln keine verminderte Expression des Glykoproteins IIb-IIIa nachgewiesen werden. Dies kann mehrere Gründe haben. In *in vitro* Versuchen läßt sich die *vivo*-Komplexität nicht nachstellen, so daß Einflüsse, die *in vivo* vorliegen, in den *in vitro* Versuchen außenvor bleiben. Zum anderen wurde beim Hydroxychloroquin eine dosisabhängige Wirkungsweise festgestellt, wobei Konzentrationen von 25  $\mu\text{g/ml}$  als ausreichend ermittelt wurden [12], um eine TRAP oder APL-induzierte Aktivierung vollkommen zu unterdrücken. Welche Plasmakonzentration bei den behandelten SLE-Patienten vorliegt, ist nicht gemessen worden.

Eine erniedrigte P-Selektin-Expression bei den behandelten SLE-Patienten konnte in der Auswertung der Daten registriert werden, die bei der Monotherapie mit Malariamitteln besonders stark ausfällt und signifikant ist. Bei der Subgruppenanalyse nach antimalarischen Wirkstoffen als Monotherapie zeigen die mit Hydroxychloroquin behandelten Patienten einen niedrigeren Median hinsichtlich der mittleren Expressionsdichte des P-Selektins auf den Thrombozyten ( $p = 0,0258$ ).

Ob diese Befunde ursächlich eine Auswirkung der Therapie mit Malariamittel sind, kann mit den durchgeführten Analysen weder be- noch widerlegt werden. Feststellen läßt sich nur, daß unter antimalarischer Monotherapie Werte erzielt werden, die sich von der Aktivierung von den Normalprobanden nicht unterscheiden. Demzufolge wäre dies auch ein Ansatz, der die retrospektiv erhobenen Daten aus den Studien von Petri [56] und Wallace [63] im Hinblick auf eine protektive Wirkung der

Malariamittel unterstützt. Werden die erzielten Ergebnisse nach den unterschiedlichen Wirkstoffen (Hydroxychloroquin und Chloroquin) unterteilt, so scheint sich eine bessere Wirksamkeit des Hydroxychloroquins bei der Monotherapie zu ergeben. Unter dieser Monotherapie werden die niedrigeren Meßwerte für die Aktivierungsmarker erreicht. Eine weitere Studie könnte diese Aussage erneut belegen und ebenfalls die Krankheitsaktivität der Patienten sowie den Medikamentenspiegel in die Betrachtung miteinbeziehen. Bei dem vorliegenden Kollektiv zeigte sich keinerlei Korrelation zwischen dem Komplementverbrauch und der verabreichten Medikation und der Aktivierungsmarkerexpression (Daten nicht dargestellt).

Bei der Aggregatbildung wurde ebenfalls recherchiert, ob bei SLE-Patienten unter unterschiedlichen Therapien Veränderungen der Aggregatbildung vorliegen, wie sie bei der Oberflächenmarkerexpression vorhanden sind. Darauf aufbauend wäre zu erwarten, daß sich diese Tatsache auf die Aggregatbildung auswirkt, da das P-Selektin als Marker für die Thrombozytenaktivität gilt.

Die Patienten ohne Therapie liegen meistens mit dem Median unterhalb der Therapierter, welches sich durch eine fehlende Krankheitsaktivität erklären läßt. Möglich ist auch eine zu geringe Anzahl an nicht behandelten Patienten, die es verhindert, daß signifikante Unterschiede entstehen. Vergleicht man das Kollektiv der immunsuppressiv mit dem der antimalarisch behandelten, so fallen im basalen Zustand signifikante Unterschiede bei der Aggregatbildung mit allen leukozytären Populationen auf, wobei die antimalarisch behandelten Patienten deutlich niedrigere Werte aufweisen als die immunsuppressiv behandelten. Diese Unterschiede können zum Einen auf die Wirkung der Medikamente oder auf die verbleibende Restaktivität des SLE zurückzuführen sein, die in den Kollektiven unterschiedlich sein könnte. Unter Stimulation zeigen sich keine Unterschiede in der Aggregatbildung.

Bei der Betrachtung der Aggregate der Patienten mit einer Kombinationstherapie aus Immunsuppressivum und Malariamittel versus einer alleinigen antimalarischen Therapie zeigt sich bei den Aggregaten mit den unterschiedlichen Leukozytenpopulationen durchaus ein Trend, bei einigen sogar ein signifikanter Unterschied, der auch unter Stimulation vorliegt. Die Kombinationstherapie scheint der alleinigen antimalarischen Therapie unterlegen zu sein, weil sie zu einer wesentlich geringeren Reduktion der Aggregatbildung führt. Die Monotherapie mit Malariamitteln scheint zu einer Reduktion der Aggregate mit den T-Lymphozyten und Granulo- und Monozyten zu führen unter der Voraussetzung, daß die Krankheitsaktivität in allen Kollektiven gleich ist. Demzufolge müßte angenommen werden, daß eine Therapie mit Malariamitteln einen Benefit für die Verhinderung der aggregatorischen Tendenz der Thrombozyten der SLE-Patienten darstellt, wie es bereits von einigen Autoren vermutet wurde [56], [63]. Bisweilen wird davon ausgegangen, daß sich der inhibitorische Effekt des Chloroquins in vitro auf aktivierte Thrombozyten über die intrathrombozytäre Phospholipase A(2) auswirkt [51]. Auch wenn der genaue Mechanismus bis dato nicht aufgeklärt ist, ist dennoch in in vivo Versuchen an narkotisierten Ratten nachgewiesen worden, daß es unter Chloroquin zu einer verminderten Ausbildung von Thrombozyten-Aggregaten kommt [54]. Dort wurde auch die Hypothese unterstützt, daß Chloroquin bei Hyperreagibilität der Thrombozyten sowie zur Prävention

von Thrombosen seinen Nutzen finden könnte. Mit Erfolg wurde bei totaler Hüftendoprothese Hydroxychloroquin zur Prävention von Thrombosen eingesetzt [35].

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine Charakterisierung der unterschiedlichen Kollektiven mittels der Epitopendichteverteilung und der Aggregatbildung nicht möglich ist. Die SLE-Patienten aber zeichnen sich durch eine thrombozytäre Aktivierung aus, die sich durch eine hohe P-Selektin-Expression sowie eine vermehrte Aggregation ausdrückt. SLE-Patienten mit positiven APL-Aktivierung weisen dabei eine höhere thrombozytäre Aktivität auf als die negativen. Gezeigt werden konnte auch, daß die medikamentöse Behandlung mittels Malariamitteln zu einer Reduktion der P-Selektin-Expression führt. APS-Patienten unterscheiden sich hinsichtlich der thrombozytären Aktivierung und Aggregation nicht vom Normalprobandenkollektiv.

#### 4.4 Unschlüssige Daten

Bei der Auswertung und Interpretation der Daten der Epitopendichte zeigen sich sowohl für das Glykoprotein Ib als auch für das Fibrinogen Schwierigkeiten. Die Auswertung des Glykoproteins Ib, das für die Adhäsion der Thrombozyten verantwortlich ist, wird durch erhebliche Ausreißer bei den APS-Patienten sowie bei den SLE-Patienten erschwert. Der statistisch robuste Mann-Whitney U Test ergibt signifikante Unterschiede der SLE-Patienten von den Normalprobanden ( $p = 0,0102$  basal und  $p = 0,0446$  stimuliert). Im Gegensatz zu publizierten Daten ergeben sich in allen drei Kollektiven Anstiege der Expression unter Stimulation, wogegen in der Literatur immer von initial abnehmenden Dichten die Rede ist bedingt durch die calciumabhängige Internalisierung nach Aktivierung durch Thrombin [18], [52]. Bei genauerer Betrachtung der Kollektive fällt auf, daß sich nicht alle Patienten einheitlich verhalten. Einige Probanden regulieren ihren Rezeptor unter Stimulation herauf, andere herunter. Dies ist nicht an einzelne Versuchsdurchgänge gekoppelt und auch nicht an einzelne Patienten. Bei einigen Patienten wurden wiederholt Messungen durchgeführt (diese Daten sind im Ergebnisteil nicht dargestellt), und dabei wurde kein einheitliches Verhalten des Rezeptors unter Stimulation bei demselben Patienten festgestellt. Auch zeigt sich, daß ein Patient unter basalen Bedingungen einen Wert innerhalb der Abweichung des Medians aufweisen und unter Stimulation einen weit vom Median entfernten Wert aufweisen kann oder umgekehrt. Eine mögliche Erklärung zu diesem Phänomen wäre, daß an Tagen mit vielen zu messenden Proben die Zeit bis zur Messung unterschiedlich lang ausgefallen ist. Wegen der nicht durchgeführten Fixierung der Proben bestünde die Möglichkeit, daß nach initialer Internalisierung das Glykoprotein Ib wieder sukzessive an die Thrombozytenoberfläche zurückkehrt [18]. Die Internalisierung ist ein Vorgang, der innerhalb von 2-5 Minuten abgeschlossen ist. Die Reexpression an der Thrombozytenoberfläche ist nach 30-60 Minuten beendet [18]. Es könnte durchaus sein, daß dieser physiologische Mechanismus die hier erhaltene unschlüssige Datenlage erklären könnte.

## 5 Literaturverzeichnis

- [1] Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. Molecular Mechanisms of Platelet Adhesion and Activation. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 91-105
- [2] Asheron RA. A "primary" antiphospholipid syndrome? *J Rheumatol*, 1988; 15: 1742-1746
- [3] Bernard J, Soulier J-Patient. Sur une nouvelle variété de dystrophie thrombocytaire Hémorragipare congénitale. *Semaine des Hôpitaux de Paris* 1948; 24: 3217-3223
- [4] Berndt MC, Ward CM, Luca de M, et al. The Molecular Mechanism Of Platelet Adhesion. *Aust NZ J Med* 1995; 25: 822-830
- [5] Celi A, Lorenzet R, Furie B, et al. Platelet-leukocyte-endothelial cell interaction on blood vessel wall. *Semin Hematol* 1997; 34: 327-335
- [6] Classen M, Diehl V, Kochsiek K. *Innere Medizin*. Classen, M. (Hrsg.). 3. Aufl. München; Wien; Baltimore. Verlag Urban und Schwarzenberg. 1994
- [7] Clementson KJ. Platelet Activation: Signal Transduction Via Membrane Receptors. *Thromb Haemost* 1995; 74(1): 111-116
- [8] Derksen RHW, Gmelig-Meijling FHJ, de Groot PhG. Primary antiphospholipid syndrome evolving into systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1996; 5: 77-80
- [9] Derksen RHW, Gmelig-Meijling FHJ, Groot de PhG. Case Report Primary antiphospholipid syndrome evolving into systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1986; 5: 77-80
- [10] Drug therapies In Klippel JH, Dieppe PA (eds) *Rheumatology*, Mosby, St. Louis, London 1994; 6.6.3
- [11] Esmon NL, Smirnov MD, Esmon CT. Thrombogenic mechanisms of antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 1997; 78 (1): 79-82
- [12] Espinola RG, Pierangeli SS, Ghara AE, et al. Hydroxychloroquine reverses platelet activation induced by human IgG antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 2002; 87: 518-522
- [13] Fanelli A, Bergamini C, Rapi S, et al. Flow cytometric detection of circulating activated platelets in primary antiphospholipid syndrome. Correlation with thrombocytopenia and anticardiolipin antibodies. *Lupus* 1997; 6: 261-267
- [14] Fijnheer R, Frijns CJM, Korteweg J. The origin of p-selectin as a circulating plasma protein. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1081-1085
- [15] G. Schmitz, G. Rothe, A. Ruf et al. European working group on clinical cell analysis: consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost* 1998; 79: 88-96
- [16] Galli M, Barbui T, Antiphospholipid antibodies and thrombosis: strength of association. *The Hamatology journal* 2003; 4, 180-186

- [17] Gräfenstein K. Klinische Rheumatologie: Diagnostik - Klinik – Behandlung; [Leitfaden und Atlas für Klinik und Praxis] / K. Gräfenstein. – 3. Aufl. – Landsberg/Lech: ecomed, 1997, S. 319-320
- [18] Han Y, Nurden A, Combrie R, Pasquet JM. Redistribution of glycoprotein Ib within platelets in response to protease-activated receptors 1 and 4: roles of cytoskeleton and calcium. *Thromb Haemost* 2003; 1 (10): 2206-2215
- [19] <http://www.plateletpage.md>. M. R. Mueller Universität Wien
- [20] Huges GRV, Harris EN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986; 13: 486-489
- [21] Hughes GRV. The antiphospholipid syndrome: ten years on. *Lancet* 1993; 342: 341-344
- [22] Hughes GRV. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *Br. Med J* 1983; 187: 1088-1089
- [23] Joseph JE, Donohoe S, Harrison P, et al. Platelet activation and turnover in the primary antiphospholipid syndrome. *Lupus* 1998; 7: 333-340
- [24] Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, et al. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *British Journal of Haematology* 2001; 115: 451-459
- [25] Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, et al. Platelet activation markers and the primary antiphospholipid syndrome (PAPS). *Lupus* 1998; 7 (Suppl 2): 48-51
- [26] Kansas GS. Selectins and their ligands: current concept and controversies. *Blood* 1996; 88 (9): 3259-3287
- [27] Khamashta MA, Cuadrado MJ, Mujic F, et al. The Management of Thrombosis in the Antiphospholipid-Antibody Syndrome. *NEJM* 1995; 15; 332: 993-997
- [28] Kunicki TJ. Platelet membrane glycoproteins and their function: An overview. *Blut* 1989; 59: 30-34
- [29] Lahita, Robert G. Systemic lupus erythematosus 1998 3th ed. Harcourt Publishers Ltd. S. xix
- [30] Lalor P, Nash GB. Adhesion of leucocytes to immobilized platelets. *British Journal of Haematology* 1995; 89: 725-732
- [31] Lehr HA, Olofsson AM, Carew TE, et al. P-Selectin mediates the interaction of circulating leucocytes with platelets and microvascular endothelium in response to oxidized lipoprotein in vivo. *Laboratory Investigation* 1994; 71; 3: 380-386
- [32] Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *NEJM* 2002; 346: 752-763
- [33] Lockshin MD. Pathogenesis of the antiphospholipid antibody syndrome. *Lupus* 1996; 5: 404-408

- [34] Lockshin MD. Which patients with antiphospholipid antibody should be treated and how? *Rheum Dis Clin North Am* 1993; 19: 235-247
- [35] Loudon JR. *Am J Med* 1988; 85 (4A): 57-61
- [36] Macchi L, Rispoli P, Ciofent-Sanchez G, et al. Anti-platelet antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and the primary antiphospholipid antibody syndrome: their relationship with the observed thrombocytopenia. *British Journal of Haematology* 1997; 98: 336-341
- [37] Manger K, Manger B, Repp R, et al. Definition of risk factors for death, end stage renal disease and thromboembolic events in a monocentric cohort of 338 patients with systemic lupus erythematosus. *Am Rheum Div* 2002; 61: 1065-70
- [38] Marc C. Hochberg, Updating the American College of Rheumatology Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 1997; 40 (9), 1725, (Letter)
- [39] Martinuzzo ME, Forastiero RR, Carreras LO. Anti  $\beta_2$  glycoprotein I antibodies: detection and association with thrombosis. *Br J Haematol* 1995; 89: 397-402
- [40] McCabe M, Jennings LK. *Platelet Protocols*. Academic Press 1999 p. 7
- [41] McEver RP. Leucocyte interactions mediated by selectins. *Thromb Haemost* 1991; 61: 80-87
- [42] Meroni et al. Antiphospholipid antibodies and endothelial cells: an unending story. *Lupus* 1995; 4: 169-171
- [43] Merten M, Thiagarajan P. P-Selectin Expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation* 2000; 102: 1931-1936
- [44] Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, et al. In vivo tracking of platelets: Circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 11877-11882
- [45] Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, et al. Circulating Monocyte-Platelet Aggregates are a more sensitive Marker of in vivo platelet activation than the platelet surface P-selectin . *Circulation* 2001; 104: 1533-1537
- [46] Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87: 4925-4936
- [47] Mills JA. Systemic Lupus Erythematosus. *NEJM* 1994; 330 (26): 1871-1879
- [48] Müller-Berghaus G., Pötzsch B. *Hämostaseologie Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik*, 1999 Springer, S. 30
- [49] Nagahama M, Nomura S, Ozaki Y, et al. Platelet activation markers and soluble adhesion molecules in patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 2001; 33 (2): 85-94
- [50] Nojima J, Suehisa E, Kuratsune H, et al. Platelet activation induced by combined effects of anticardiolipin and lupus anticoagulant IgG antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost* 1999; 81: 436-441

- [51] Nosal R, Jascinova V; Danihelova E. Chloroquine: a multipotent inhibitor of human platelets in vitro. *Thromb Res* 2000; 98 (5): 411-421
- [52] Nurden A, Cazes E, Bihour C et al. Confirmation that GP Ib-IX complexes have a reduced surface distribution on platelets activated by thrombin and TRAP-14-mer peptide. *Br J Haematol* 1995; 90 (3): 645-654
- [53] Opara R, Robbins DL, Ziboh VA. Cyclic-AMP agonists inhibit antiphospholipid/beta2-glycoprotein I induced synthesis of human platelet thromboxane A2 in vitro. *J Rheumatol* 2003; 30 (1): 55-59
- [54] Osim E, Mudzuzu B, Musabayane CT, et al. In vivo effects of chloroquine on platelet aggregation in anesthetized rats. *Haematologica* 1999; 84 (1): 92-93
- [55] Out HJ, de Groot PG, van Vliet M, et al. Antibodies to platelets in patients with antiphospholipid antibodies. *Blood* 1991; 77: 2655-2659
- [56] Petri M, Hochberg M, Hellmann D, et al. Incidence of and predictors of thrombotic events in SLE: protective role of hydroxychloroquine. *Arthritis Rheum* 1992; 35 (suppl 9): 54
- [57] Pierangeli SS, Corden-Stanfield M, Liu X et al. Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation* 1999; 99: 1997-2002
- [58] Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, et al. Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood. *Blood* 1991; 78: 1730-1737
- [59] Shechter Y, Tal Y, Greenberg A, et al. Platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9 (7): 653-657
- [60] Specker Ch, Perniok A, Brauckmann U, et al. Detection of cerebral microemboli in APS – Introducing a novel investigation method and implications of analogies with the carotid artery disease. *Lupus* 1998; 7 (2): 75-80
- [61] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271–1277
- [62] Van Laar JM, Tyndall A. Intense immunosuppression and stem-cell transplantation for patients with severe rheumatic autoimmune disease: a review. *Cancer Control* 2003; 10 (1): 57-65
- [63] Wallace D. Does hydroxychloroquine sulphate prevent clot formation in systemic lupus erythematosus? *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1435-1436
- [64] Warkentin TE, Aird WC, Rand JH, Platelet-endothelial interactions: sepsis, HIT and Antiphospholipid syndrome, *Hematology* 2003; 479-519
- [65] Wiener MH, Burke M, Fried M, et al. Thromboagglutination by anticardiolipin antibody complex in the antiphospholipid syndrome: possible mechanism of immunemediated thrombosis. *Thromb Res* 2001; 103 (3): 193-199

- [66] Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis and Rheumatism* 1999; 42 (7): 1309-1311

## 6 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Stéphanie Muriel Lehmann
Geburtsdatum	18. Oktober 1975
Geburtsort	Koblenz
Staatsangehörigkeit	deutsch und französisch

### Schulbildung

1982 - 1986	Grundschule
1986 - 1995	Gymnasium

### Ausbildung

1995 - 2002	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
-------------	---

### Examina

10. 09. 1997	Physikum
21. 09. 1999	1. Staatsexamen
12. 09. 2001	2. Staatsexamen
11. 12. 2002	3. Staatsexamen

### PJ-Tertiale

erstes Tertial	Innere Medizin (Hämato-Onkologie) am Klinikum Wuppertal Barmen
zweites Tertial	Neurologie am Klinikum Wuppertal Barmen
drittes Tertial	Chirurgie am Kantonspital Luzern (CH)

### Assistenzzeit

01.10.2003 - 30.09.2004	Innere Medizin, Regionalspital Delémont (CH)
01.11.2004 - 30.09.2007	Innere Medizin, St. Marienhospital Hamm
seit 01.10.2007	Focus CDD GmbH, Neuss

## 7 Zusammenfassung

Beim systemischen Lupus erythematodes handelt es sich um eine bevorzugt bei jungen Frauen auftretende chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung. Außer durch das Auftreten von Autoantikörpern ist es klinisch durch seinen Multisystemcharakter gekennzeichnet. Dabei kann es neben der Beteiligung von diversen Organen und Organsystemen zu thromboembolischen Komplikationen kommen, die je nach ihrer Lokalisation zu einschneidenden Veränderungen im Leben der Patienten führen können, deren Extremvariante der Tod darstellt. Bis dato ist nur bekannt, daß Patienten mit Antiphospholipid-Antikörpern ein erhöhtes Risiko aufweisen, ein solches Ereignis zu erleiden. Jedoch darf der Umkehrschluß, daß Patienten mit Antiphospholipid-Antikörpern obligat im Laufe der Jahre ein thromboembolisches Ereignis erleiden, nicht gezogen werden. Darin besteht das Dilemma, denn im Augenblick können unter den Antiphospholipid-Antikörper positiven SLE- und APS-Patienten keine weiteren Einteilungen für eine Risikostratifizierung vorgenommen werden, so daß erst das Ereignis abgewartet werden muß, um zu wissen, ob der Patient gefährdet ist oder nicht.

Aus diesem Grunde war es von Interesse, durch eine Studie zum Verhalten der aktivitätsabhängigen thrombozytären Oberflächenmarker und zur Bildung der Aggregate bei Normalprobanden, SLE- und sAPS-Patienten herauszufinden, ob sich Unterschiede im Profil ergeben und ob und in wiefern dieses Profil bei den Patientenkollektiven unter therapeutischen Maßnahmen Veränderungen unterliegt.

Die Daten wurden aus Probandenvollblut gewonnen, das mit Hilfe monoklonaler Antikörper doppeltmarkiert durchflußzytometrisch erfaßt wurde.

Die SLE-Patienten zeichnen sich durch ein signifikant erhöhtes Auftreten des P-Selektins aus. Dabei liegen die Mediane für das P-Selektin bei den SLE-Patienten mit positivem Antiphospholipid-Titer (auch in den Einzeldarstellungen aufgeteilt nach Anticardiolipin und nach  $\beta_2$ -Glykoprotein I) signifikant oberhalb derjenigen ohne Antiphospholipid-Antikörper. SLE-Patienten mit Antiphospholipid-Antikörpern weisen eine erhöhte thrombozytäre Aktivierung auf, die ihren Ausdruck auch in einer gesteigerten Rate an Aggregaten wiederfindet.

Unter den unterschiedlichen Therapieregimen zeigt sich ein Benefit der antimalarischen Therapie gegenüber den SLE-Patienten ohne Therapie in der Expression des P-Selektins.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß Antiphospholipid-Antikörper positive SLE-Patienten eine thrombozytäre Aktivierung aufweisen, die bei den sAPS-Patienten nicht nachgewiesen werden konnte. Daraus ist abzuleiten, daß nicht alleine die Antiphospholipid-Antikörper für die Aktivierung verantwortlich gemacht werden können, sondern noch andere Einflüsse eine Rolle spielen.

## 8 Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas, die Geduld und konstruktive Kritik bis zur Fertigstellung möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. M. Schneider bedanken.

Für die freundliche Genehmigung, die elektronenmikroskopischen Bilder in die Dissertation übernehmen zu dürfen, möchte ich mich bei Herrn Professor MD Mueller, Universität Wien bedanken.

Mein Dank geht auch an meinen betreuenden Assistenten, der mittlerweile Chefarzt ist, Dr. med. A. Perniok, der mir bei der Abfassung der Arbeit Anregungen, Kritik und Ratschläge erteilte.

Für die sehr liebenswürdige Einarbeitung in die Labortechnik, die immerwährende Hilfe und Unterstützung, möchte ich mich ganz herzlich bei Ellen Bleck bedanken.

Für den Beistand bei statistischen Fragen und die ermutigenden Gespräche möchte ich mich bei Herrn Gherban bedanken.

Nicht unerwähnt möchte ich meine Freunde und meine Familie wissen, die jeder auf ihre Weise zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen haben.