

Diplomarbeit

**Vollblut – Gerinnungsanalysen: Ermittlung von
Referenzwerten anhand gesunder Probanden**

eingereicht von

Hervé Moussalli

Mat.Nr.: 0205856

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Physiologische Chemie

unter der Anleitung von

AP. PD. Mag. Dr. rer. nat. Gerhard. Cvirn

Ort, Datum

(Unterschrift)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

Unterschrift

Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle besonders bei meinem Betreuer, AP PD Mag. Dr. Gerhard Cvirn, bedanken, der mich mit viel Einsatz und Erfahrung umfangreich beim Erlernen der Messtechniken und Erstellen dieser Arbeit unterstützt hat.

Ein herzlicher Dank geht auch an meine Lebensgefährtin, Frau Nicole Nagl, die mich seelisch und fachlich mit ihrer großzügigen Liebe und ihrer intellektuellen Kompetenz enorm unterstützt hat.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn DI Gerd Hübscher, für die Mühe die er sich bei der Korrekturlesung dieser Arbeit gegeben hat.

Auch möchte ich mich bei der Medizin Universität Graz bedanken, die es mir ermöglicht hat das erforderliche Basiswissen zur Erstellung dieser Arbeit zu erlernen.

Schlussendlich möchte ich besonderen Dank an meine Eltern richten, die mir die nötigen Mittel und vor allem die Liebe und Unterstützung geschenkt haben, die ich zur Absolvierung meines Studiums benötigt habe.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	II
Inhaltsverzeichnis	III
Glossar und Abkürzungen	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	IX
Abstract	X
1. Einleitung	1
2. Die Blutgerinnung	2
2.1 Allgemeines	2
2.2 Die primäre Hämostase	3
2.2.1 Thrombozyten und Thrombopoese	3
2.2.2 Aktivierung der Thrombozyten	7
2.3 Die sekundäre Hämostase	9
2.3.1 Aktivierungsphase	11
2.3.2 Koagulationsphase	12
2.3.3 Retraktionsphase	12
2.4 Regulationsmechanismen der Hämostase	14
2.4.1 Fibrinolyse	14
2.4.2 Gerinnungshemmung	15
2.4.2.1. Physiologische Gerinnungshemmung	15
2.4.2.1. Induzierte Gerinnungshemmung	18
3. Material und Methoden	19
3.1 Probanden	19
3.2 Messmethoden	20
3.2.1 Blutbild mittels Sysmex KX-21N	20
3.2.2 Thrombelastometrie	21
3.2.3 Thrombozytenaggregation	24
3.2.4 Thrombozytenadhäsion	27
3.2.5 Statistische Datenauswertung	29
4. Resultate	30
4.1 Blutzellzahlen der gesunden Probanden ermittelt am Sysmex KX-21N	30
4.1.1 Datenauswertung der Blutbild - Parameter	32
4.2 Thrombelastometrie-Parameter der Probanden	33
4.2.1 Datenauswertung der Thrombelastometrie Parameter	35
4.3 Thrombozytenaggregations-Parameter	36
4.3.1 Datenauswertung der Kollagen-induzierten Aggregometrie-Parameter	38
4.3.2 Datenauswertung der Tissue Factor-induzierten Aggregometrie-Parameter	39
4.3.3 Datenauswertung der Kollagen/Tissue Factor-induzierten Aggregometrie-Parameter	40
4.4 Thrombozytenadhäsions-Parameter	41
4.4.1 Datenauswertung der Thrombozytenadhäsions-Parameter	43
5. Diskussion	44
Literaturverzeichnis	45

Glossar und Abkürzungen

12-HETE	12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APC	aktiviertes Protein C
AS	average size
AT(III)	Antithrombin (III)
ATP	Adenosintriphosphat
CFT	clot formation time
CFU	colony forming units
CT	coagulation time
CTAP-3	connective tissue activating peptid 3
EGF	epidermal growth factor
ENA-78	epithelial neutrophil activating protein 78
GAS 6	growth arrest specific gene 6
GDP	Guanosindiphosphat
GLUT	Glukosetransporter
GP	Glykoprotein
GPRP	fibrin polymerization inhibitor
GRO- α	growth related oncogene- α
GTP	Guanosintriphosphat
h	hours (Stunden)
HWZ	Halbwertszeit
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KLKs	Gewebskallikrein
L	Liter
LAMP	lysosome-associated membrane protein
MCF	maximum clot firmness
MCP-3	monocyte chemotactic protein-3
MIP-1 α	macrophage inflammatory protein-1 α
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mmol	Millimol
NAP-2	neutrophil activating protein-2
ng	Nanogramm
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAI	plasminogen activator inhibitor
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PBP	platelet basic protein
PDGF	platelet derived growth factor
PLT	platelets
pmol	Picomol
PRCP	lysosomale Pro-X carboxypeptidase
PTA	plasmathromboplastin antecedant
RANTES	regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted
RBC	red blood count
SC	surface coverage
SDF-1a	stromal derived factor
SERPIN	Serin Proteasen Inhibitor
t-PA	tissue plasminogen activator
Tab.	Tabelle
TBO	Thrombopoetin
TF	tissue factor
TGF- β	Transforming growth factor β
u-PAR	urokinase plasminogen activator receptor
u. a.	unter anderem
U/s	Umdrehungen pro Sekunde
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
vWF	von-Willebrand-Faktor
WBC	white blood count
z.B.	zum Beispiel
α 2M	α ₂ -Makroglobulin
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

μm	Mikrometer
μm^2	Quadratmikrometer
μm^3	Kubikmikrometer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verlauf der Hämatopoese.....	5
Abbildung 2: Die Aktivierungsphase und Thrombinbildung	11
Abbildung 3: Sysmex KX-21N Automated Hematology Analyzer	20
Abbildung 4: ROTEG 05 Rotationselastometer	21
Abbildung 5: Funktionsmechanismus der Rotations – Thrombelastometrie	22
Abbildung 6: Messparameter des ROTEG 05	23
Abbildung 7: Chrono-Log Whole Blood Aggregometer Model 700	24
Abbildung 8: Modul mit Platinelektrode	25
Abbildung 9: Typischer Verlauf einer Aggregometer-Kurve mit Messparameter ..	26
Abbildung 10: Diamed Impact-R.....	27
Abbildung 11: Well und Konus (Impact-R)	27
Abbildung 12: Konus auf Motoreinheit (Impact-R).....	28
Abbildung 13 : Thrombelastometrie-Normalwerte ermittelt in 54 gesunden Probanden.....	35
Abbildung 14: Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregations-Normalwerte ermittelt in 54 gesunden Probanden.	38
Abbildung 15: Tissue factor/Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregations- Normalwerte ermittelt in 54 gesunden Probanden.	39
Abbildung 16: Kollagen/Tissue factor-induzierte Thrombozytenaggregations- Normalwerte ermittelt in 54 gesunden Probanden.	40
Abbildung 17: Thrombozytenadhäsions-Normalwerte ermittelt in 54 gesunden Probanden.....	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inhaltsstoffe der thrombozytären Granula	6
Tabelle 2: Blutgerinnungsfaktoren.....	10
Tabelle 3: Blutbild-Parameter aus KX-21N.....	31
Tabelle 4: Thrombelastometrie-Parameter	34
Tabelle 5: Aggregometrie-Parameter	37
Tabelle 6: Thrombozytenadhäsions-Parameter.....	42

Zusammenfassung

Hintergrund: Am Institut für Physiologische Chemie wurden spezielle Methoden der Gerinnungsanalytik entwickelt, die sich durch hohe Sensitivität auszeichnen, in Vollblut verwendet werden können und bei denen außerdem die Proben weit weniger stark verdünnt werden als bei den in der Routine üblicherweise verwendeten Methoden. Zur Zeit existieren für diese Vollblut-Methoden noch keine Referenzwerte. Deshalb war es Ziel dieser Diplomarbeit, in 54 gesunden Probanden Normalwerte für diese Vollblut-Techniken zu ermitteln.

Methoden: Thrombelastometrie wurde am ROTEM 05 gemessen, die Thrombozytenaggregation am Chrono Log Modell 700 und die Thrombozytenadhäsion am Impact R Cone and.

Ergebnisse: Thrombelastometrie: Die Coagulation time betrug $347,81 \pm 62,07$ s, die Clot formation time $164,11 \pm 56,12$ s, die Maximum clot firmness $56,43 \pm 4,43$ mm und der alpha-Winkel $60,31 \pm 7,31$ °. Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation: Die Amplitude betrug $8,72 \pm 2,80$ Ohm, der Slope war $5,13 \pm 1,71$ Ohm/min und die Lag time war $1,81 \pm 0,75$ Minuten. Kollagen/Tissue factor-induzierte Thrombozytenaggregation: Die Amplitude betrug $9,08 \pm 1,77$ Ohm, der Slope war $5,63 \pm 1,73$ Ohm/min und die Lag time war $1,05 \pm 0,38$ Minuten. Tissue factor-induzierte Thrombozytenaggregation: Die Amplitude betrug $9,77 \pm 2,03$ Ohm, der Slope war $6,08 \pm 1,95$ Ohm/min und die Lag time war $0,70 \pm 0,24$ Minuten. Thrombozytenadhäsion: Die Surface coverage betrug $10,72 \pm 4,07\%$, die Average size war $37,20 \pm 16,18$ μm^2 .

Schlussfolgerung: Zur Zeit laufen am Institut für Physiologische Chemie die beiden Projekte „Einfluss der Thrombozytenfunktion auf die Reobstruktionsrate nach endovaskulärer Rekanalisation bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (PAVK)“ und „Starke Frauen“. Die in der vorliegenden Diplomarbeit ermittelten Referenzwerte für Thrombelastometrie und Thrombozytenaggregation sowie –adhäsion an 54 gesunden Probanden dienen der Beurteilung der aus den beiden Studien zu erwartenden Messergebnisse.

Abstract

Background: Recently, highly sensitive whole blood coagulation tests have been established at the Institute of Physiological Chemistry. The present diploma thesis has been performed in order to generate reference values for these methods by using blood from 54 healthy volunteers.

Methods: Thrombelastometry was performed on a ROTEM 05, platelet aggregation was performed on a Chrono Log Model 700 and platelet adhesion was performed on a Cone and Plate(let) Analyzer.

Results: Following reference values were obtained: Thrombelastometry: Coagulation time was $347,81 \pm 62,07$ s, Clot formation time $164,11 \pm 56,12$ s, Maximum clot firmness was $56,43 \pm 4,43$ mm and the alpha angle was $60,31 \pm 7,31$ °. Collagen-triggered platelet aggregation: Amplitude was $8,72 \pm 2,80$ Ohm, Slope was $5,13 \pm 1,71$ Ohm/min and the Lag time was $1,81 \pm 0,75$ minutes. Collagen/Tissue factor-triggered platelet aggregation: Amplitude was $9,08 \pm 1,77$ Ohm, Slope was $5,63 \pm 1,73$ Ohm/min and the Lag time was $1,05 \pm 0,38$ minutes. Tissue factor-triggered platelet aggregation: Amplitude was $9,77 \pm 2,03$ Ohm, Slope was $6,08 \pm 1,95$ Ohm/min and the Lag time was $0,70 \pm 0,24$ Minuten. Platelet adhesion: Surface coverage was $10,72 \pm 4,07$ %, the Average size was $37,20 \pm 16,18$ μm^2 .

Conclusions: The herein determined values for Thrombelastometry and both platelet aggregation and –adhesion should serve as references for future clinical studies.

1. Einleitung

Hintergrund und Ziel der Diplomarbeit:

Um den Gerinnungsstatus von Patienten einschätzen zu können, stehen zur Zeit mehrere Standard-Methoden wie Prothrombinzeit (PT) oder aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT) zur Verfügung. Diese Tests werden allerdings in Plasmaproben durchgeführt. Plasma enthält zwar den Großteil der Gerinnungsfaktoren, aber keine gerinnungsaktiven phospholipid-hältigen Zellen und Thrombozyten. Messungen in Vollblut würden daher sicher einen umfassenderen Blick auf den Gerinnungsstatus von Patienten erlauben, sind aber zur Zeit noch nicht im klinischen Bereich etabliert. Deshalb sollen im Rahmen dieser Diplomarbeit drei Vollblut-Gerinnungsmethoden an 54 gesunden Probanden getestet werden. Die hier ermittelten Messergebnisse sollen als Referenzwerte für zukünftige klinische Studien an Patienten mit Gerinnungsstörungen dienen.

Thrombelastogramme sollen am TEM Coagulation Analyzer (ROTEM 05) gemessen werden. Diese Methode liefert die Parameter Coagulation Time (CT), Clot Formation Time (CFT), Maximum Clot Firmness (MCF) und α -Winkel. Die Thrombozytenaggregation soll mittels Impedanzmethode am Chrono-Log Whole Blood Aggregometer Model 590 gemessen werden. Diese Methode liefert die Parameter Lag Time, Slope und Amplitude. Die Thrombozytenadhäsion soll am Impact R cone and Plate(let) Analyzer gemessen werden. Diese Methode liefert die beiden Parameter Surface Coverage (SC) und Aggregation Size (AS). Alle diese Methoden sind international etabliert und stellen den neuesten Stand der Technik dar.

Die Aktivierung der Vollblutproben erfolgt durch Zusatz von Kollagen und relipidiertem Tissue Factor. Zukünftige klinische Studien sollen zeigen, ob Abweichungen von diesen Referenzwerten eine mögliche vorliegende Blutungs- oder Thromboseneigung anzeigen können.

2. Die Blutgerinnung

2.1 Allgemeines

Die Blutgerinnung ist ein lebenswichtiger Prozess um eine Wunde oder einen größeren Organdefekt, durch eine schnelle und effektive Gerinnselformung zu verschließen. Dieses komplexe System ist in der Medizin übergreifend als „die Hämostase“ bekannt. Der Begriff der Hämostase kommt aus der altgriechischen Sprache (αἷμα Häma „Blut“ und στάσις Stasis „Stehen, Stillstand“). Sie dient prinzipiell der Reduzierung des Blutvolumenverlustes und agiert als Wegbereiter der Wundheilung. Das gelingt durch eine perfekte Koordination zwischen den zellulären Bestandteilen des Blutes und der im Plasma gelösten Gerinnungsfaktoren.

Man unterscheidet mehrere Phasen :

- Die primäre Hämostase: Wird auch als "vorläufige" Blutstillung in der Literatur bezeichnet.¹ Sie läuft innerhalb von Sekunden bis Minuten ab (durchschnittlich 1 bis 3 Minuten) und dient der kurzfristigen Blutstillung.
- Die sekundäre Hämostase: Wird auch als "endgültige" Blutstillung in der Literatur bezeichnet.¹ Sie läuft in mehreren Minuten ab (durchschnittlich 6 bis 9 Minuten) und dient der Bildung eines stabilen Thrombus.
- Die Wundheilung: ist gekennzeichnet durch die Reendothelialisierung der verletzten Gefäßwände sowie des umliegenden Gewebes bis zur "restitutio ad integrum" oder Narbenbildung. Diese Phase ist auch die längste Phase des Wundheilungsprozesses. Sie kann je nach Größe der Gewebsverletzung Stunden bis Tage benötigen.

¹ Deetjen P., Speckmann E., Hescheler J. (2005): *Physiologie*, München, Urban & Fischer, 4. Auflage 2005, S. 365-377.

2.2 Die primäre Hämostase

Die primäre Hämostase beruht auf zwei Mechanismen die nach einer Gefäßwandverletzung aktiviert werden: der Vasokonstriktion sowie der Aktivierung der Thrombozyten.

Die Gefäßwand besteht aus drei Schichten: der tunica interna, der tunica media und der tunica externa. Die tunica interna besteht aus Endothelzellen, die aus einschichtigem Plattenepithel bestehen. Diese Endothelzellen ruhen meist auf einer Basalmembran und werden von Bindegewebe unterlagert.² Das Endothel bildet eine Schranke zwischen Blutstrom und Gefäßwand und kontrolliert selektiv und aktiv den Austausch zwischen Blut und Interstitium. Es spielt auch eine zentrale Rolle im Gerinnungsprozess, auf den es negativen sowie positiven Einfluss hat. Bei einer Gewebsverletzung kommt es durch Schädigung der Zellwand zu einer Interaktion zwischen subendothelialen Strukturen und den Bestandteilen des Blutes. Das subendotheliale Kollagen induziert über den von-Willebrand-Faktor (vWF) den Gerinnungsprozess. Zusätzlich produziert das Endothel das Peptidhormon Endothelin-1, das großen Einfluss als Vasokonstriktor auf die verletzten Gefäßabschnitte ausübt. Neben dem Einfluss von Endothelin haben die gereizten Nerven eine positive Wirkung auf die Adrenalinausscheidung der Nebenniere mit dem Ziel die Blutgefäße so gut wie möglich zu verengen.³

Die Thrombozyten verschließen die verletzte Gefäßstelle durch Bildung eines primären Thrombozytenpfropfes (weißer Thrombus).

2.2.1 Thrombozyten und Thrombopoese

Die Thrombozyten (Blutplättchen) sind kernlose und farblose Körperchen von 1-4 µm Durchmesser. Man findet in einem µl normales Blut zwischen 150000 und 350000 Thrombozyten mit einem Einzelvolumen von 7 bis 8 µm³. Sie haben eine maximale Lebensdauer von 9 bis 12 Tagen und werden in der Milz und

² Fritsch H., Kühnel W. (2009): *Taschenatlas Anatomie – innere Organe*, Stuttgart, Thieme 10. Auflage, S. 86.

³ Neumann H. (2007): *Das Gerinnungssystem*, Berlin, ABW Wissenschaftsverlag, S. 3-5.

Leber abgebaut.⁴ Die Thrombopoese (Blutplättchenneubildung) findet im Stroma des roten blutbildenden Knochenmarkes statt. Dort liegen die hämatopoetischen Zellen, eingebettet in ein Maschenwerk aus Retikulumzellen und Kollagenfasern der Typen I und III. Die Thrombozyten entstehen primär aus pluripotenten Stammzellen (Hämatozytoblasten), die in der Lage sind sich in multipotente lymphatische oder myeloische Stammzellen zu differenzieren (vgl. Abb. 1). Die myeloischen Stammzellen differenzieren sich weiter in uni- oder bipotente Stammzellen die als Progenitorzellen, oder auch als „colony forming units“ (CFU) bekannt sind. Diese Zellen sind schon für die Entstehung der nachfolgenden Blutzellsorte bestimmt und unterteilen sich in CFU-E, CFU-Meg, CFU-GM, CFU-Eo und CFU-B. Die CFU differenzieren sich weiter in Blut-Vorläuferzellen (Blasten) die schlussendlich die reifen Blutzellen ergeben. Die Blasten sind bereits morphologisch erkennbar und unterscheidbar.

Die Megakaryoblasten gehen aus der „colony forming unit-Meg“ hervor und sind, nach Ausreifung zu Megakaryozyten, die Vorläuferzellen der Thrombozyten. Die Megakaryozyten sind, im Gegenteil zu den Thrombozyten, die größten Zellen des Knochenmarks mit einem Durchmesser zwischen 35 und 150 µm und besitzen ein unregelmäßig gelappten Zellkern mit einer grobscholliger Chromatinstruktur.⁵ Die Thrombozyten entstehen durch Verschmelzung der intrazellulären Membranen die sich im Zytoplasma der Megakaryozyten befinden. Dadurch entstehen je nach Ploidiegrad und Zellgröße ungefähr 500-5000 Blutplättchen pro Megakaryozyt. Die Megakaryozytopoese, und damit auch die Thrombopoese, werden durch Thrombopoetin (TPO) gesteuert. Thrombopoetin ist ein Protein bestehend aus 353 Aminosäuren, das in der Leber sezerniert wird. Es wird über rezeptor-vermittelte Endozytose von den Thrombozyten aufgenommen und agiert parallel dazu als Wachstums- und Differenzierungsfaktor auf die Megakaryozyten.

⁴ Bucher O., Wartenberg H. (1997): *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*, Bern, Hans Huber 12. Auflage, S. 199.

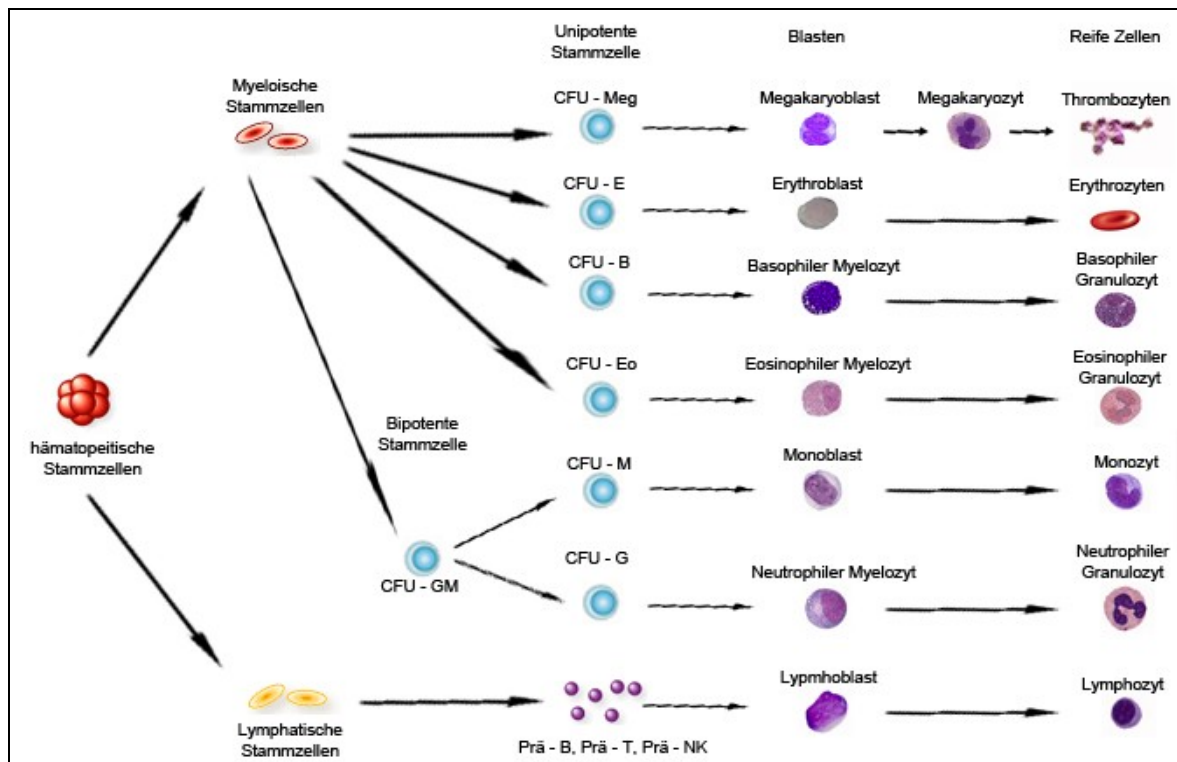


Abbildung 1: Verlauf der Hämatopoese

Durch den erhöhten Blutspiegel an TBO bei einer Thrombozytopenie (Mangel an Thrombozyten) entsteht ein positiver Feedback-Mechanismus auf die Thrombozytogenese. Sind im Gegenteil vermehrt Thrombozyten im Blut vorhanden, sinkt der Blutspiegel an TBO, da es vermehrt von den Thrombozyten abgebaut wird. Die positive Wirkung auf die Thrombozytogenese entfällt und es werden keine Megakaryozyten oder Thrombozyten gebildet.⁵ Pro Stunde werden in etwa 250 Milliarden neue Thrombozyten gebildet.⁶ Thrombozyten sind in der Lage bestimmte Glykoproteine und Mediatoren über sekretorische Organellen zu sezernieren. Ihre sekretorischen Organellen bestehen aus α - Granula (ca. 80 pro Thrombozyt), dichte Granula (3-9 pro Thrombozyt) und vereinzelte primäre oder sekundäre Lysosomen. Jede Organelle produziert oder lagert Inhaltstoffe und Membranproteine die wichtige Funktionen in der Blutgerinnung oder anderen Prozesse besitzen (vgl. Tab. 1).

⁵ Junqueira L., Carneiro J. (2004): *Histologie*, Heidelberg, Springer 6. Auflage, S. 209-212.

⁶ Kenkes-Matthes B., Oehler G. (2001): *Blutgerinnung und Thrombose*, Stuttgart, Thieme 3. Auflage, S.7.

Organelle	Mediatorfunktion	Inhaltsstoffe
α-Granula	Adhäsionsmoleküle	Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor, Thrombospondin-, Thrombospondin-1, Fibronectin, Vitronectin
	Prokoagulatorische Faktoren	Faktor V, Faktor VII, Faktor XI, Faktor XIII, Multimerin, Matrixmetallproteinase, Kininogen, GAS 6
	Antikoagulatorische Faktoren	Plasminogen, Plasminogenaktivatorinhibitor 1, Tissue Factor Pathway Inhibitor, Protein C, Protein S, α_2 -Antiplasmin, α_2 -Makroglobulin, α_2 -Antitrypsin, Proteasenexin-2, Matrixmetallproteinase
	Chemokine, Entzündungsmodulatoren	Plättchenfaktor 4, β -Thromboglobulin, MIP-1a, MCP-3, GRO- α , Interleukin 1 β , PAF, 12-HETE, NAO-2, ENA-78, CTAP-3, RANTES, SDF-1a, Kininogen, Komplementfaktoren
	Wachstumsfaktoren	TGF- β , EGF, VEGF, PDGF
	Antimikrobielle Peptide	PBP, Thrombocidin, Fibrinopeptid A und B, Thymosin- β -4, β -Lysin, IgA, IgG, IgM, Komplementfaktoren
	Membranproteine	P-Selektin, $\alpha_{IIb}\beta_3$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Integrine, CD36, CD9, GLUT-3
	sonstige Proteine	Albumin, histidinreiches Protein, Prion-protein, Amyloid- β - Peptid
Dichte Granula	Nukleotide	ADP, ATP, GDP, GTP α
	Transmitter	Serotonin, Histamin
	Ionen	Ca ²⁺ , Mg ²⁺
	Membranproteine	Granulophysin, LAMP-2
Lysosomen	Proteasen	Kathepsin D und E, Elastase, Kollagenase, Carboxypeptidase Heparinase
	Membranproteine	LAMP-1, LAMP-2, LAMP-3

Tabelle 1: Inhaltsstoffe der thrombozytären Granula ⁷

⁷ Pötzsch B., Madlener K. (2010): *Hämostaseologie*, Heidelberg, Springer 2. Auflage, S. 69.

2.2.2 Aktivierung der Thrombozyten

Die Thrombozyten zirkulieren am Außenrand des Blutstromes und konzentrieren sich in unmittelbarer Nähe der Gefäßwand. Kommt es zu einem Endotheldefekt innerhalb der tunica interna, kommen die lokalen Thrombozyten sofort in Kontakt mit dem freiliegenden Kollagen und vWF. Daraufhin binden sich die Thrombozyten mit ihren membrangebundenen Glykoproteinen (GP) an die Kollagenpartikel mittels GP Ia/IIa und GP VI, und an den vWF mittels GP Ib/IX.⁸ Diese Bindung (tethering) resultiert in der Aktivierung der thrombozytären Integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_2\beta_1$ und deren Interaktion mit extrazellulären Matrixproteinen. Dadurch verteilen sich Thrombozyten um den Defekt herum, und deren Bindung zu den endothelialen Bestandteilen (Adhäsion) wird stabilisiert und verstärkt. Diese Reaktion wird durch PECAM-1 reguliert. In der Folge degranulieren die angehafteten Thrombozyten und sezernieren Mediatoren, u.a. ADP, Fibrinogen, Fibronectin, vWF und Thromboxan A₂, die zur Migration weiterer Thrombozyten führen. Es kommt zunächst zu einer reversiblen Aggregation. Die Aggregation beginnt mit der Anheftung der emigrierten Thrombozyten an die defektgebundenen Blutplättchen. Diese wird durch die Expression der membrangebundenen GP IIb/IIIa an den Thrombozytenoberflächen und deren Anbindung aneinander über Fibrinogenbrückenbindungen ermöglicht. Dabei spielen wiederum ADP und Thrombin eine wichtige stimulierende Rolle sowie Thromboxan A₂ und PAF (Plättchen aktivierender Faktor) die auch in der positiven Rückkoppelung involviert sind. Es kommt zur Bildung eines größeren Aggregats, das über das Thrombozytensekret Thrombospondin sowie Fibrin befestigt und verstärkt wird. Schlussendlich kommt es zur irreversiblen Aggregation unter der Einwirkung von ADP, Thrombin und vor allem Thromboxan A₂, was die Aggregation erheblich verstärkt. Die Thrombozyten gehen in eine „visköse Metamorphose“ über: Sie bilden Pseudopodien („shape change“), die zu einer verstärkten Adhäsivität führen, und setzen den Inhalt ihrer Granula frei. Die freigesetzten Granulasekrete werden durch die Cyclooxygenase zu Thromboxan A₂ verstoffwechselt. Somit steigt die

⁸ Pötzsch B., Madlener K. (2010): *Hämostaseologie*, Heidelberg, Springer 2. Auflage, S. 63-64.

Thromboxan A₂-Konzentration um das Aggregat, und führt zu einer irreversiblen Membranverschmelzung. Dieser Schritt ist entscheidend für die Bildung des hämostatischen Pfropfes. Es kann durch einen Cyclooxygenasehemmer irreversibel blockiert werden (Acetylsalicylsäure).⁹

Der letzte Schritt der primären Hämostase ist die Bildung eines Thrombozytenpfropfes. Durch den Fluss weiterer Thrombozyten durch die Blutbahnen werden immer mehr Thrombozyten im Aggregat eingefangen. Dieser wächst zu einem weißen Thrombus, der schließlich ausreichend groß ist um den Gefäßwanddefekt komplett abzudichten. Die Vasokonstriktion wird durch das freisetzen von Cathecholaminen sowie durch Einwirkung des aus den Thrombozyten degranulierten Serotonin verstärkt. Somit kommt es 1-3 Minuten nach der Verletzung zu einer Blutstillung.

⁹ Deetjen P., Speckmann E., Hescheler J. (2005): *Physiologie*, München, Urban & Fischer, 4. Auflage, S. 367.

2.3 Die sekundäre Hämostase

Der aus der primären Hämostase resultierende weiße Thrombus ist zwar in der Lage die Blutung zu stoppen, dennoch würde es zu Nachblutungen kommen wenn es nur bei diesem primären Verschluss bleiben würde. Parallel zu der primären Hämostase läuft ein sekundärer Prozess ab, der dazu dient den gebildeten weißen Thrombus durch einen Komplex von Erythrozyten und Kofaktoren an die subendotheliale Matrix fest anzuhafte. Dieser Prozess ist ausschlaggebend für den weiteren Verlauf der Wundheilung. Endprodukt dieser sekundären Hämostase ist die Bildung eines fibrinreichen Thrombus der mechanisch belastbar ist. Dieser Vorgang läuft über Gerinnungsfaktoren ab, und kann in 3 wesentlichen Schritten zusammengefasst werden:

- Aktivierungsphase
- Koagulationsphase
- Retraktionsphase

Die Gerinnungsfaktoren sind Teil des plasmatischen Gerinnungssystems (vgl. Tab. 2). Sie befinden sich im Plasma als inaktive Vorstufen und sind Glykoproteine (Serinproteasen), die als Enzyme oder Kofaktoren wirken. Die Nomenklatur erfolgt in der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit römischen Ziffern.¹⁰

¹⁰ Kemkes-Matthes B, Oehler G., Kujath P. et al. (2001): *Blutgerinnung und Thrombose*, Stuttgart, Thieme, 3. Auflage 2001, S. 3.

Name	Faktor-nummer	Serumkonzentration	Synthese-ort	HWZ
Fibrinogen	I	1,5-4 ng/ml	Leber	72-96 h
Prothrombin	II	100 µg/ml	Leber, Megakaryozyten	48-60 h
Tissue Faktor (TF)	III	-	Zellmembranen	-
Ca ²⁺	IV	4,6-5,4 µg/ml	-	-
Proakzelerin	V	7 µg/ml	Leber	12 h
Aktivierter Faktor V	VI	-	-	-
Prokonvertin	VII	0,5 µg/ml	Leber	3-6 h
Antihämophiler Faktor A	VIII	200 ng/ml	Sinusoidale Zellen der Leber, Gefäß-, glomeruläres- und tubuläres Endothel	12 h
vWF	-	10 µg/ml	Endothelzellen, Megakaryozyten	24 h
Antihämophiler Faktor B	IX	5 µg/ml	Leber	20-24 h
Stuart-Prower Faktor	X	10 µg/ml	Leber	30-40 h
PTA	XI	3-7 µg/ml	Leber	52 h
Hageman-Faktor	XII	23-39 µg/ml	Leber	40-50 h
Fibrinstabilisierender Faktor	XIII	30 µg/ml	Leber	50 h

Tabelle 2: Blutgerinnungsfaktoren

Gerinnungsfaktoren können in aktivierter Form Enzymreaktionen katalysieren oder sich gegenseitig aktivieren. Daraus resultiert ein Zusammenspiel, das auch als Gerinnungskaskade bekannt ist.

2.3.1 Aktivierungsphase

Die Aktivierungsphase (vgl. Abb. 2) beginnt *in vivo* durch die Einwirkung von Tissue Factor (TF). Dieses Membranlipoprotein ist Bestandteil von Zelloberflächen von Endothelzellen, Monozyten oder aktivierter Thrombozyten. TF bindet an den aktivierten Faktor VIIa und bildet einen membrangebundenen Komplex der wiederum in der Lage ist, Faktor VII zu aktivieren (selbstamplifizierender Effekt). Dieser Komplex kann die Umwandlung von Faktor X zu Faktor Xa induzieren. Faktor Xa bildet anschließend einen Komplex mit Ca^{2+} auf Phospholipidoberflächen und lagert noch Faktor Va zur Stabilisierung an. Faktor Xa, Faktor Va, Ca^{2+} und Phospholipid bilden den Prothrombinasekomplex

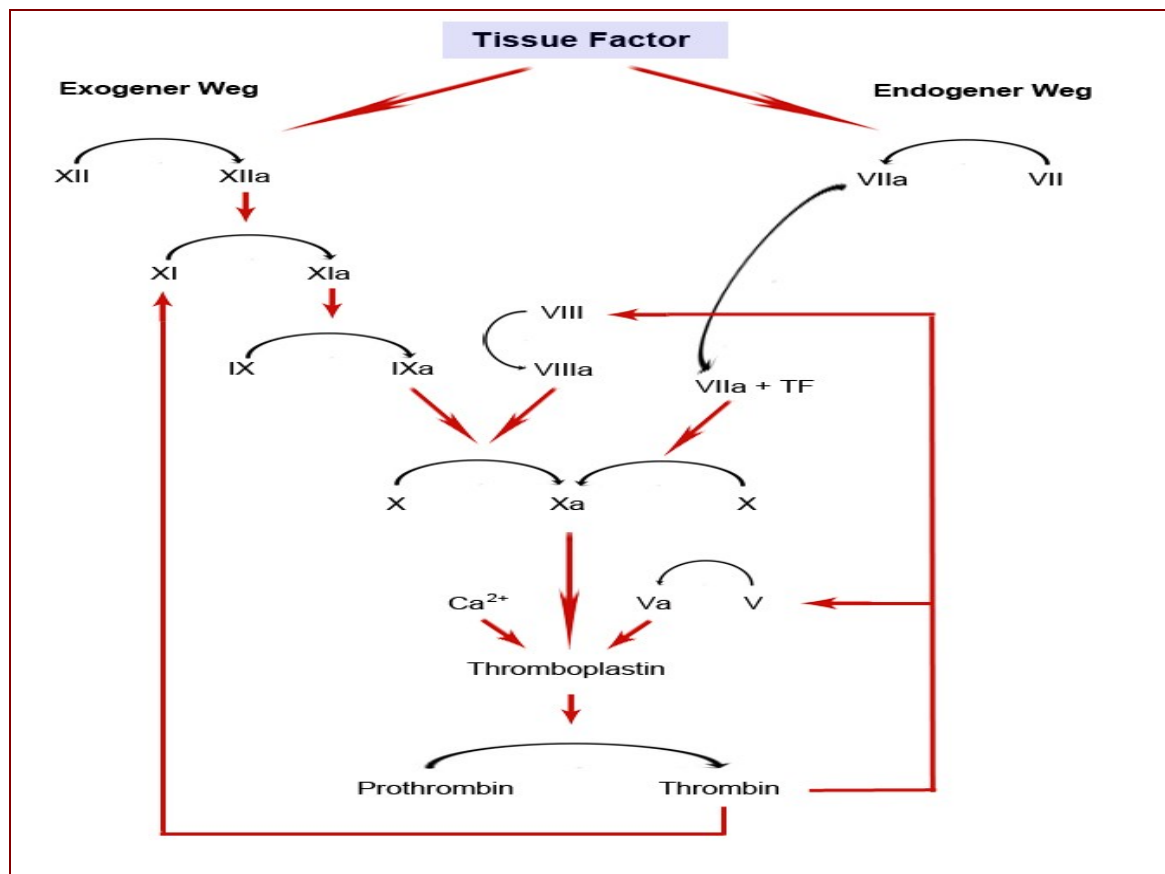


Abbildung 2: Die Aktivierungsphase und Thrombinbildung

Dieser Prothrombinase-Komplex spaltet aus Prothrombin Thrombin ab.

Thrombin kann die Faktoren XI, VIII und V aktivieren, was wiederum einen positiven Effekt auf die Thrombinproduktion hat (selbstamplifizierende Wirkung).¹¹

2.3.2. Koagulationsphase

Durch die Bildung von enzymatisch aktivem Thrombin beginnt die Koagulationsphase. Diese Phase ist durch die Bildung eines Gerinnsel aus Fibrinpolymere gekennzeichnet.¹²

Thrombin ist eine 39 kDa schwere Serinprotease die in der Lage ist Peptidbindungen zwischen Arginin und Glycin innerhalb des Fibrinogens zu spalten. Die dabei entstehenden wasserlöslichen Fibrinmonomere sind in der Lage sich zu Protofibrillen zu verbinden und zu unlöslichen Fibrinpolymeren (Fibrinfilamente) zusammenzuwachsen um schlussendlich ein dichtes Fibrinnetzwerk zu bilden.¹³ Die Fibrinfilamente binden rasch an benachbarte Gewebestrukturen oder Zelloberflächen und führen zu einer Gelierung des Plasmas. Durch die Wirkung von Faktor XIII kommt es zur Entstehung kovalenter Bindungen zwischen den γ -Carboxylgruppen von Glutaminresten und den ϵ -Aminogruppen von Lysinresten zweier Fibrinmonomere.

2.3.3. Retraktionsphase

Die Retraktionsphase ist die letzte Phase des Blutgerinnungsprozesses und dient der Bildung eines roten Thrombus. Es kommt zu einer Anlage der in der Koagulationsphase ausgebildeten Fibrinfäden an den Thrombozyten. Diese binden sich über ihren Membranrezeptor GP IIb/IIIa sowie über das „Verankerungsprotein“ Fibronectin an das umgebende Gewebe. Durch die Steigerung der Viskosität fangen sich immer mehr Erythrozyten im Maschenwerk ein. Der Thrombus bekommt dadurch seine rote Farbe.

¹¹ Deetjen P., Speckmann E., Hescheler J. (2005): *Physiologie*, München, Urban & Fischer, 4. Auflage, S. 368-370.

¹² Klinker R., Silbernagl S. (2001): *Lehrbuch der Physiologie*, Stuttgart, Thieme, 3. Auflage, S. 213.

¹³ Brodnax Geer C. (2007): *Analytical studies on the mechanism of fibrin formation*, Chapel Hill, University of North Carolina, S. 8.

Die Retraktionsphase ist aber vor allem durch die Abdichtung des eröffneten Gefäßes gekennzeichnet. Dies wird durch die thrombininduzierte Kontraktion des Aktin-Myosin-System der Thrombozyten bewerkstelligt. Dadurch kommt es zur Retraktion des Thrombus auf ein Bruchteil seiner ursprünglichen Größe, und ermöglicht somit eine Legierung des Gefäßes von Ihnen heraus.¹⁴

¹⁴ Klinke R., Silbernagl S. (2001): *Lehrbuch der Physiologie*, Stuttgart, Thieme, 3.Auflage, S. 213.

2.4 Regulationsmechanismen der Hämostase

Wie viele andere Systemkreise muss auch beim Gerinnungssystem ein adäquater Hemmmechanismus existieren um eine überschüssige Thrombenbildung zu verhindern. Ein unkontrolliertes Wachstum eines Thrombus oder die Bildung freier Thromben im intakten Gefäßlumen können verheerende Nebenwirkungen mit sich bringen wie die einer Thrombose oder einer Thrombembolie.

2.4.1 Fibrinolyse

Die Fibrinolyse ist ein wichtiger Prozess im Abbau eines Thrombus. Sie verhindert das unkontrollierte Wachstum des Gerinnsels und ermöglicht den Abbau des Thrombus. Die primäre Fibrinolyse ist ein physiologischer Prozess und erfolgt durch das proteolytische Enzym Plasmin. Plasmin spaltet das Fibringerüst an verschiedenen Stellen in kleine Fragmente. Es wird in inaktiver Form (Plasminogen) von der Leber sezerniert und wird bei der Bildung des Gerinnsels von Anfang an miteingeschlossen.¹⁵

Die Umwandlung von inaktivem Plasminogen in aktives Plasmin geschieht unter dem Einfluss der Plasminogenaktivatoren Tissue plasminogen activator (t-PA) Urokinase und Kallikrein. T-PA wird von beschädigtem Endothel langsam sezerniert. Urokinase ist im Plasma als einkettiges Proenzym vorhanden. Urokinase bindet an seinen Urokinase-Rezeptor (u-PAR) an der Zellmembran der Endothelzellen und erhält dadurch seine hochwirksame proteolytische Wirkung auf das Plasminogen. Außerdem werden mitotische Signalwege der Zellen aktiviert und die zelluläre Migration gefördert.¹⁶

Die Produktion von t-PA und Urokinase wird durch Plasmin sowie durch Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) und Plasminogen Aktivator Inhibitor-2 (PAI-2) reguliert. Die Erhöhung der Konzentration von Plasmin bewirkt eine weitere Produktion von t-PA und Urokinase, was wiederum einen positiven Effekt

¹⁵ Cesarman-Maus G, Hajjar K.A., *Molecular mechanisms of fibrinolysis*. British journal of haematology, 2005 May; 129(3): 307–21.

¹⁶ Candice D. (2008): *The role of urokinase plasminogen activator receptor in human pleural malignant mesothelioma*, Stephen F. Austin state university, S.1-5.

auf die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin hat (selbstamplifizierende Wirkung). PAI-1 wird von den Endothelzellen der Gefässwände sowie aus adipösem Gewebe sezerniert und PAI-2 wird ausschliesslich von der Plazenta sezerniert. Beide Substanzen gehören zur Familie der Serin Proteasen Inhibitoren (SERPINE) und haben eine hemmende Wirkung auf t-PA und Urokinase.¹⁷

Kallikrein gehört zur Subgruppe der Serin Proteasen. Kallikrein zirkuliert im Plasma in Form von Präkallikrein und wird durch die Proteolyse von Faktor XII und Lysosomale Pro-X Carboxypeptidase (PRCP) in seine wirksame Form umgewandelt. Diese wirksame Form ist in der Lage, Bradykinin und Kallidin aus den Kininogenen freizusetzen und kann auch Plasminogen in Plasmin umwandeln. Somit ist Kallikrein an der Fibrinolyse sowie an der Regulation des Gefäßtonus und an inflammatorischen Prozessen beteiligt.¹⁸ Kallikrein ist auch an verschiedenen Zelloberflächen in Form von Gewebeskallikrein (KLKs) gebunden.

2.4.2 Gerinnungshemmung

Der menschliche Körper besitzt mehrere Antikoagulatorische Systeme zur Vermeidung von Thrombosen, wie z. B. membrangebundene Glykoproteine oder das Protein C / Protein S – System . Die Gerinnungshemmung kann auch zu therapeutischen oder analytischen Zwecken induziert werden.

2.4.2.1. Physiologische Gerinnungshemmung

Um die Bildung von Thromben im intakten Gefäßlumen zu verhindern, besitzt das normale Gefäßendothel antithrombogene Eigenschaften. Diese negative Wirkung auf das Gerinnungssystem wird von bestimmten Glykoproteinen der endothelialen Glykokalix ermöglicht. Diese unterdrücken die lokale Anhaftung von Blutplättchen an das Gefäßlumen und hemmen die Aktivierung von kontaktsensiblen Gerinnungsfaktoren. Die Hauptdarsteller dieser

¹⁷ Mimuro J., *Type 1 plasminogen activator inhibitor: its role in biological reactions*, Rinsho Ketsueki, 1991; 32 (5): 487–9.

¹⁸ Bhoola, K.D., Figueroa, C.D., Worthy, K., *Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases*, Pharmacological Reviews, 1992; 44: 1-80.

Gerinnungshemmung sind die Proteasehemmer Antithrombin III (AT III), α_2 -Makroglobulin (α_2M) und Thrombomodulin/Protein C.¹⁹

Antithrombin III wird in der Leber sezerniert und besteht aus 432 Aminosäuren. Im Blutplasma ist AT III zum Großteil in Form von α -Antithrombin vorhanden und besitzt eine Halbwertszeit von 3 Tagen.^{20 21}

Antithrombin gehört zur Familie der SERPINE. Es ist in der Lage, sich an die Faktor IIa, VIIa, IXa, Xa und Faktor XIa sowie an Plasmin und Kallikrein zu binden und diese zu desaktivieren. Somit besitzt Antithrombin III eine gerinnungshemmende Wirkung auf mehreren Ebenen der sekundären Hämostase.²² Die antikoagulatorische Kapazität von AT III wird durch die Anwesenheit von Heparin 1000 – fach verstärkt.²³

α_2 -Makroglobulin zirkuliert im Blutplasma und wird in der Leber sowie von Macrophagen, Fibroblasten und adrenokortikalen Zellen sezerniert. α_2M ist in der Lage eine große Varietät an Proteinasen zu inhibieren. Es spielt in der Gerinnung eine wesentliche Rolle, weil es durch Inhibierung von Plasmin und Kallikrein die Fibrinolyse hemmt. Es besitzt auch hemmende Eigenschaften auf Thrombin.²⁴

Das Endothel exprimiert auch das integrale Membranprotein Thrombomodulin. Thrombomodulin wirkt als Cofaktor in der Aktivierung von Protein C indem es sich an Thrombin bindet. Das mit Thrombomodulin verbundene Thrombin ändert seine Substratspezifität für Fibrinogen und spaltet stattdessen Protein C in aktiviertes Protein C (APC). APC kann die peptidischen Bindungen von Faktor Va und Faktor VIIIa proteolysieren und bewirkt somit deren Inaktivierung. Protein

¹⁹ Deetjen P., Speckmann E., Hescheler J. (2005): *Physiologie*, München, Urban & Fischer, 4. Auflage, S. 371-372.

²⁰ Bjork I., Olson J. E., *Antithrombin, A bloody important serpin*, Adv. Exp. Med. Biol. 1997; 425:17-33.

²¹ Collen D. J., Schetz F. et al., *Metabolism of antithrombin III (heparin cofactor) in man: Effects of venous thrombosis of heparin administration*, Eur. J. Clin. Invest 1977 Feb; 7(1):27-35.

²² Olson S.T., Bjork I., *Regulation of thrombin activity by antithrombin and heparin*, Semin Thromb Hemost, 1994; 20(4):373-409.

²³ Deetjen P., Speckmann E., Hescheler J. (2005): *Physiologie*, München, Urban & Fischer, 4. Auflage, S. 373.

²⁴ De Boer J.P., Creasey A.A., Chang A. et al., *Alpha-2-macroglobulin functions as an inhibitor of fibrinolytic, clotting, and neutrophilic proteinases in sepsis: studies using a baboon model*, Infect. Immun, 1993 Dec; 61(12):5035-43.

C hat auch eine positive Wirkung auf die Fibrinolyse indem es die Konzentration von Plasminogenaktivatoren im Plasma erhöht.²⁵

²⁵ Deetjen P., Speckmann E., Hescheler J. (2005): *Physiologie*, München, Urban & Fischer, 4. Auflage, S. 372-373.

2.4.2.1. Induzierte Gerinnungshemmung

Die Gerinnungshemmung kann in vitro durch Verwendung von nicht benetzbaren Oberflächen oder durch Zusatz von gerinnungshemmenden Stoffen erreicht werden. Zu diesen Stoffen gehören Natriumoxalat, Natriumcitrat und EDTA. Sie binden die freien Ca^{2+} -Ionen sodass die Ca^{2+} -abhängigen Schritte der Gerinnung blockiert sind. Weiters kann Heparin in vitro oder in vivo antikoagulatorisch eingesetzt werden. Heparin verstärkt die fibrinolytische und antikoagulatorische Wirkung von Antithrombin und kann dementsprechend auch zur Auflösung eines Thrombus eingesetzt werden.²⁶

Eine weitere Klasse von Antikoagulantien werden oft im medizinischen Bereich verwendet: die Coumarin-Derivate. Coumarin-Derivate sind Vitamin-K-Antagonisten. Sie haben ihre Wirkung in der Leber wo sie die γ -Carboxylierung von Prothrombin, Faktor VII, IX und X blockieren. Dadurch sind diese Faktoren nicht mehr in der Lage, sich an Ca^{2+} zu binden und sind dementsprechend für die Gerinnung unbrauchbar.²⁶

3. Material und Methoden

3.1 Probanden

In die Untersuchung wurden 54 Probanden (32 männlich, 22 weiblich) eingeschlossen. Das Durchschnittsalter betrug 27,9 Jahre (19-46). Es wurde sichergestellt, dass alle Probanden für mindestens 14 Tage vor Studieneintritt keine die Gerinnung beeinflussenden Medikamente eingenommen hatten.

Die hier vorliegende Diplomarbeit ist Teil der von der Medizinischen Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz (Nr.20-182 ex08/09) zugelassenen Studie.

3.2 Messmethoden

3.2.1 Blutbild mittels Sysmex KX-21N

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde ein dem KX-21N Automated Hematology Analyzer der Firma Sysmex (Mundelein, Illinois, USA) verwendet (vgl. Abb 3).



Abbildung 3: Sysmex KX-21N Automated Hematology Analyzer

Mit diesem Gerät ist es möglich 17 Blutparameter und 3 Histogramme aus Vollblutproben zu messen. Das benötigte Probenvolumen von 50 µl wird automatisch durch eine Kanüle am Gerät abgesaugt. Die Probenanalyse wird mittels Direktstrom, non-cyanid oder kumulative Hochpuls Detektionsmethode ausgeführt. Die Parameter werden auf einem Display am Gerät angezeigt sowie auf Papier ausgedruckt. Für unsere Studie wurden die Parameter WBC (white blood count), RBC (red blood count) und PLT (platelet) erhoben. Dabei wurden die Zitrat-Vollblutproben zuerst sorgfältig im Abnehmeröhrchen geschwenkt und aus den Röhrchen direkt an die Ansaugkanüle angebracht. Durch Betätigen des Auslöseknopfes wurde das Messverfahren eingeleitet. Die Probenverdünnung durch das Zitrat wurde berücksichtigt.

3.2.2 Thrombelastometrie

Die Thrombelastometrie-Messungen wurden am ROTEG 05 Vollblut-Hämostase-System. Dieses Gerät der Firma Matel Medizintechnik (vgl. Abb 4) ermöglicht die Messung der viskoelastischen Eigenschaften einer Vollblutprobe.



Abbildung 4: ROTEG 05 Rotationselastometer

Das transportable System ermöglicht eine graphische Darstellung der Verfestigung und Lyse eines Blutgerinnsels während eines in-vitro ablaufenden Blutgerinnungsprozesses. Es können Proben aus Zitrat-Vollblut, reinem Vollblut oder Citrat-Plasma verwendet und über 4 getrennte Kanäle analysiert werden. ROTEM® leitet sich von Rotations-Thrombelastometrie ab und benutzt das Prinzip der Thrombelastographie das 1948 von H. Hartert in Heidelberg beschrieben, und Anfang der 1990er Jahre weiterentwickelt wurde.²⁶ Dieses kommerziell erhältliche System erlaubt verschiedene differenzial-diagnostische Aussagen über den Ablauf der Blutgerinnung. Über unterschiedliche Einstellungen kann der intrinsische Weg (INTEM) oder der extrinsische Weg (EXTEM) bevorzugt analysiert werden. Durch die Zugabe von Zusatzstoffen wie

²⁶ Hartert H: Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. Klinische Wochenschrift 1948; 26,: 577–583

Heparin oder Aprotinin können zusätzliche Parameter zur Wirkungsquantifizierung oder zur Detektion von Gerinnungsstörungen erhalten werden.

Bei der Rotationsthrombelastometrie wird die Probe in eine Küvette gefüllt die in einen auf 37°C vorgeheizten Behälter platziert wird. In dieser Küvette dreht sich ein Stempel alternierend um 4,75°. Diese Bewegungen werden mittels eines optischen Detektionssystem erfasst und über eine Computersoftware in Form einer Bewegungsamplitude verarbeitet. Mit zunehmende Gerinnung bilden sich Fibrinfäden und Plättchenaggregate um den Stempel und schränken die Drehung des Stempels ein (vgl. Abb 5).

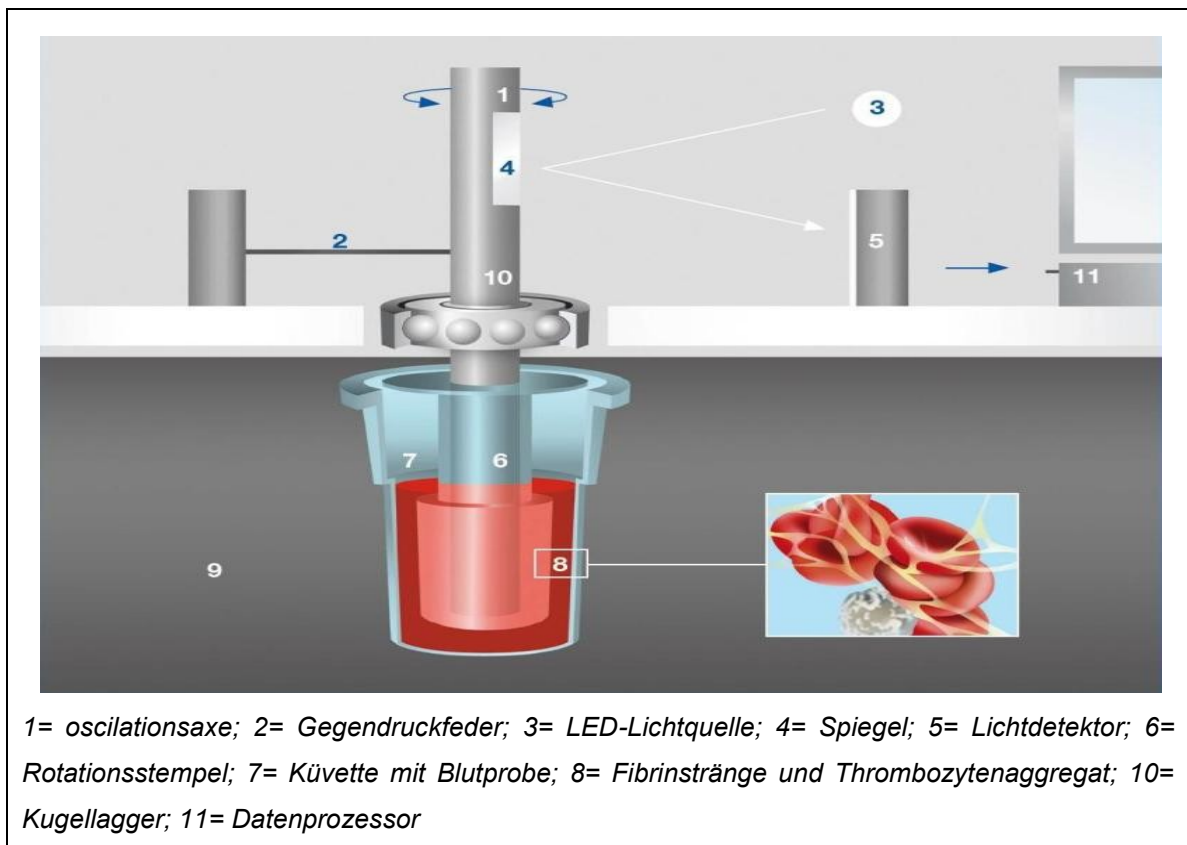


Abbildung 5: Funktionsmechanismus der Rotations – Thrombelastometrie ²⁷

Diese Bewegungseinschränkung des Stempels wird graphisch als Änderung der Bewegungsamplitude dargestellt.

²⁷ TEM International (2011): *Thrombelastometry (TEM®)*. Verfügbar unter: http://www.rottem.de/site/index.php?option=com_content&view=article&id=1&Itemid=7&lang=en. Stand: 20.12.2011

Die Bewegungsamplitude liegt bei null Millimeter wenn sich der Stempel uneingeschränkt bewegen lässt und steigt auf 100 Millimeter an wenn der Stempel blockiert ist. Somit ist die maximal erreichte Bewegungsamplitude gleich der maximal erreichten Festigkeit des Gerinnsels (MCF). Ein weiterer Parameter ist die Gerinnungszeit (CT) oder auch Coagulation Time genannt. Sie definiert den Zeitraum zwischen Zugabe der Aktivierungslösung und Bildung des Blutgerinnsels. Die clot formation Time (CFT) oder die Gerinnselbildungszeit ist definiert als der Zeitraum zwischen Beginn der Thrombusbildung und Erreichen einer 20mm Bewegungsamplitude. Schlussendlich gibt der α -Winkel noch Auskunft über die Kinetik der Thrombusbildung. Er ist definiert als Winkel zwischen Nulllinie und Tangente an der Kurve beim Erreichen einer Bewegungsamplitude von 2mm. Diese einzelnen Messparameter werden anhand der Abbildung 6 bildlich dargestellt.

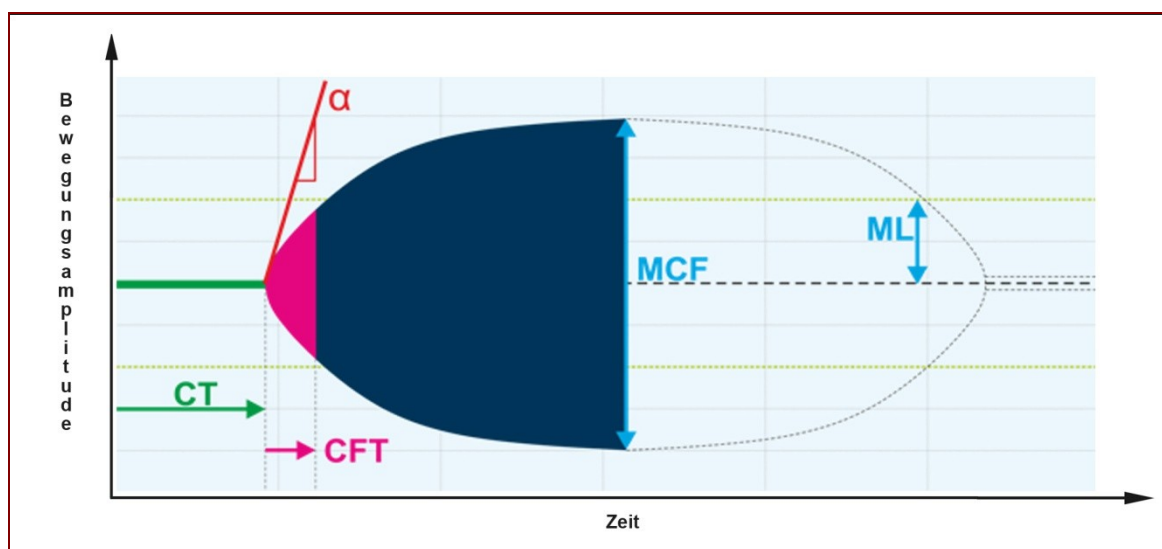


Abbildung 6: Messparameter des ROTEG 05 ²⁸

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde Citrat-Vollblut verwendet. Die Aktivierungslösung bestand aus 3,5 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen, 0,35 pmol/L Tissue Factor und 3 mmol/L Kalziumchlorid. Es wurden 300 μl Vollblut in die vorgeheizten Küvetten pipettiert und durch Zugabe von 40 μl Aktivierungslösung wurde der Gerinnungsprozess eingeleitet.

²⁸ Vgl. Mathew E., Cvirn G, Gary T. (2011): *Einfluss der Thrombozytenfunktion auf die Reobstruktionsrate nach endovaskulärer Rekanalisation bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit*. Diplomarbeit Med Uni Graz., S. 34.

3.2.3 Thrombozytenaggregation

Im Rahmen dieser Studie wurde die Thrombozytenaggregation mit dem Vollblut-Aggregometer „Chrono-Log Whole Blood Aggregometer Model 700“ der Firma Probe&Go gemessen (Abbildung 7).



Abbildung 7: Chrono-Log Whole Blood Aggregometer Model 700

Dieses Gerät ermöglicht die quantitative Erfassung der Thrombozytenaggregation über die Zeit mittels der Impedanzmessmethode. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Messung eines elektrischen Stroms, der durch zwei Platinelektroden fließt (Abbildung 8). Durch die Zugabe von verdünntem Vollblut lagert sich ein „Monolayer“ an Thrombozyten um die Platinelektroden an. Durch die zusätzliche Gabe eines Plättchen-Agonisten kommt es zu einer weiteren Anlagerung von Thrombozyten um diesen initialen „Monolayer“. Es kommt zu einem Impedanzanstieg zwischen beiden Elektroden. Dieser Anstieg wird mittels Computersoftware ausgewertet und in Form einer Kurve über die Zeit dargestellt.

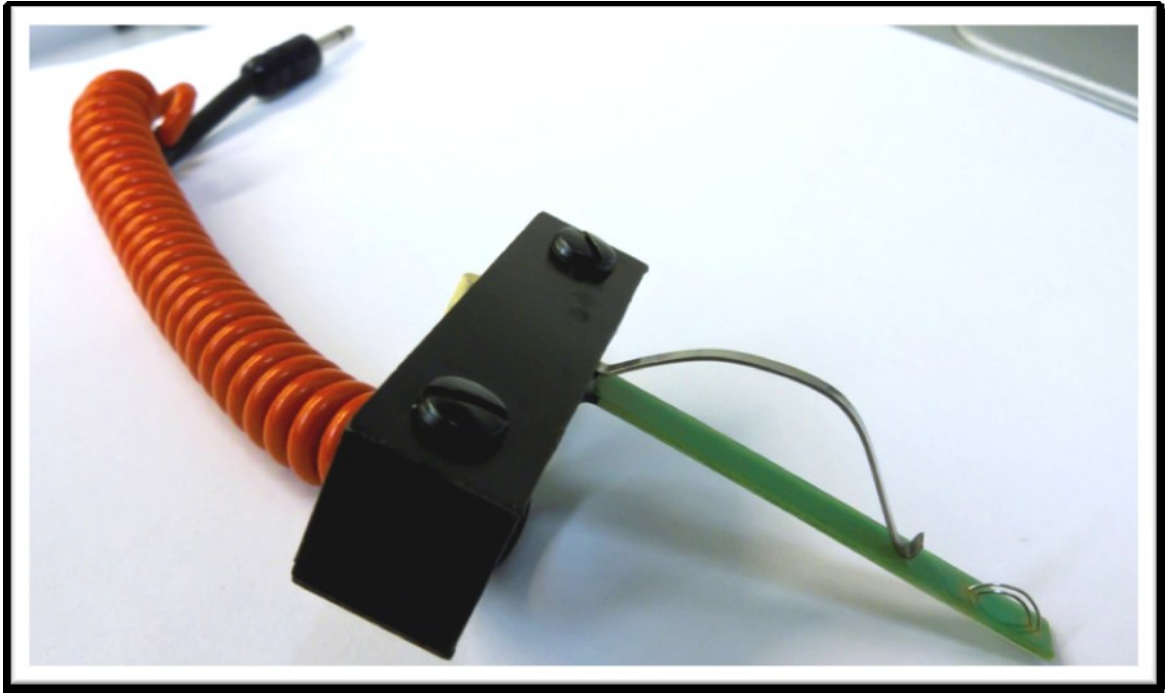


Abbildung 8: Modul mit Platinelektrode

Man erhält den Parameter „maximale Aggregation“, die maximale Amplitude der Kurve in Ohm. Die Aggregationsgeschwindigkeit wird als „slope“ in Ohm/min angegeben. Sie wird aus der Tangente durch den steilsten Punkt der Aggregationskurve berechnet. Der Zeitintervall zwischen Zugabe des Agonisten und Beginn der Aggregation wird „Lag Time“ genannt. Sie wird in Minuten angegeben.

Abbildung 9 zeigt eine typische Kurve mit den verschiedenen Parametern.

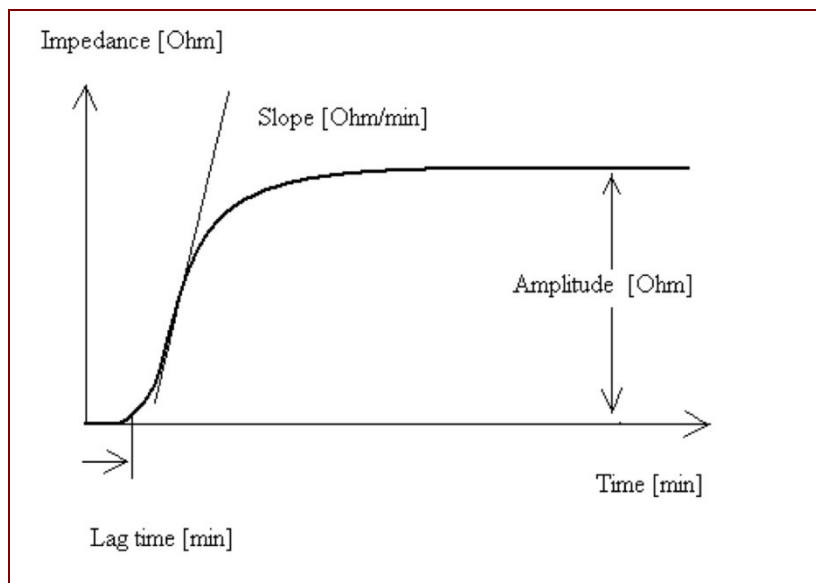


Abbildung 9: Typischer Verlauf einer Aggregometer-Kurve mit Messparameter ²⁹

Im Rahmen dieser Studie wurde Citrat-Vollblut verwendet und es wurden drei verschiedene Agonisten verwendet: Kollagen, Tissue factor und eine Mischung von beiden Agonisten.

Für das Messverfahren mit reinem Kollagen wurde 500 µl Citrat-Vollblut mit 500 µl NaCl-Lösung verdünnt. Dieses verdünnte Vollblut wurde auf 37°C vorgeheizt. Anschließend wurde 3,5 µg/ml Kollagen (Endkonzentration) zugegeben und das Messverfahren eingeleitet.

Im zweiten Verfahren soll das endogen gebildete Thrombin als Plättchen-Agonist dienen. Dieses Verfahren ermöglicht den Ablauf der Thrombozytenaggregation unter annähernd physiologischen Bedingungen. Es wurden 300 µl Vollblut mit 660 µl NaCl-Lösung in einer Küvette verdünnt. Die Thrombinbildung wird durch die Zugabe von 40 µl einer Reaktionslösung aus 3 mmol/l Kalziumchlorid und 8 mmol/l GPRP Endkonzentrationen ausgelöst.

Im dritten Verfahren wurden beide Agonisten gleichzeitig eingesetzt. Dafür wurden 300 µl Zitratblut mit 660 µl NaCl in einer Küvette verdünnt. Als Aktivierungslösung wurde angesetzt: 0,35 pmol/L TF, 3 mmol/L Kalziumchlorid und 8 mmol/L GPRP (Endkonzentration) in 40 µl Gesamtlösung.

²⁹ Mathew E., Cvirn G, Gary T. (2011): *Einfluss der Thrombozytenfunktion auf die Reobstruktionsrate nach endovaskulärer Rekanalisation bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit*. Diplomarbeit Med Uni Graz., S. 36.

3.2.4 Thrombozytenadhäsion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand der Vollblutproben die Plättchenadhäsion mit dem Impact-R der Firma Diamed Haemostasis AG gemessen (Abbildung 10). 130 μ l Zitrat – Vollblut wurden in ein Polystyrol – Well pipettiert. Mittels rotierendem Konus wurden arterielle Flussbedingungen (1800 U/s für 2 Minuten) simuliert (Abbildung 11 und 12).



Abbildung 10: Diamed Impact-R

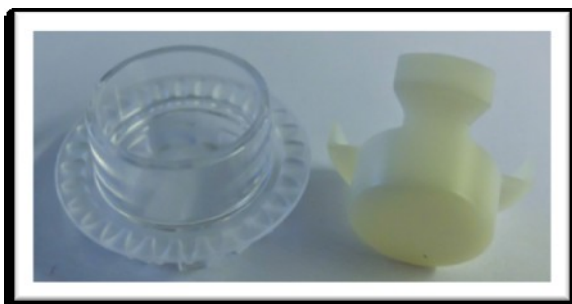


Abbildung 11: Well und Konus (Impact-R)

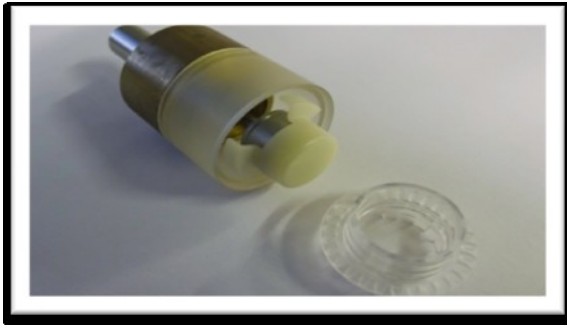


Abbildung 12: Konus auf Motoreinheit (Impact-R)

Nach diesen 2 Minuten wird das überschüssige Blut mit destilliertem Wasser sorgfältig abgewaschen und die anhaftenden Plättchen werden mit einer May-Grünwald-Lösung angefärbt. Daraufhin werden die Proben mittels Mikroskopkamera und einer Computersoftware in 7 verschiedenen Positionen fotografiert. Das gewonnene Bildmaterial wird anschließend quantitativ ausgewertet. Die berechneten Parameter sind: „Surface Coverage (SC)“, der Prozentsatz der durch Plättchenaggregate besetzten Well – Oberfläche, „durchschnittliche Größe der Aggregate (AS)“ in μm^2 und „Anzahl der Objekte“.

3.2.5 Statistische Datenauswertung

Die in den Abbildungen gezeigten Daten sind jeweils der Mittelwert und Standardabweichung (SD). Zur Datenauswertung wurden die Programme Excel 2008 (Microsoft Inc.) und SPSS (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) herangezogen

4. Resultate

4.1 Blutzellzahlen der gesunden Probanden ermittelt am Sysmex KX-21N

Folgende Zellzahlen wurden ermittelt:

Probanden Nr.	WBC [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	RBC [$\times 10^6/\mu\text{l}$]	PLT [$\times 10^3/\mu\text{l}$]
1	3,8	4,8	175
2	5,9	3,73	241
3	4,6	5	194
4	5	4,7	219
5	5,8	4,51	164
6	3,5	4,67	154
7	4,9	4,81	190
8	5,2	5,06	163
9	6,3	4,64	206
10	6,4	4,62	20,5
11	5,4	4,28	273
12	4,6	4,1	322
13	5,7	3,89	270
14	3,5	4,73	208
15	3,9	4,52	238
16	3,8	4,61	195
17	4,6	3,95	234
18	5,3	4,91	197
19	3,5	4,08	194
20	6,1	4,84	228
21	6,1	4,84	199
22	4,2	4,78	205
23	4,5	4,28	147
24	3,6	3,93	274
25	5,9	4,1	215
26	5,1	4,16	315

27	5,2	4,35	225
28	51	4,77	217
29	4,5	4,28	233
30	4,4	4,4	215
31	6,1	4,2	278
32	5,2	4,9	164
33	4,1	4,71	208
34	4,7	4,71	197
35	8	4,08	204
36	10,1	5,25	251
37	5,6	5,34	211
38	5,9	4,74	211
39	2,8	4,89	155
40	7,1	3,98	186
41	4,8	4,69	195
42	3,7	4,11	167
43	4,5	3,93	206
44	5,1	4,24	221
45	6,1	4,2	229
46	7,2	3,86	293
47	4,5	4,55	188
48	4,1	4	160
49	4,5	4,78	149
50	7,3	4,61	235
51	4,2	4,51	222
52	4,9	4,07	204
53	6,8	5,02	249
54	4,4	4,6	175

Tabelle 3: Blutbild-Parameter aus KX-21N

4.1.1 Datenauswertung der Blutbild - Parameter

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellzahlen betragen:

WBC: $5,15 \pm 1,30 \cdot 10^3/\mu\text{L}$

RBC: $4,48 \pm 0,38 \cdot 10^6/\mu\text{L}$

PLT: $212,46 \pm 39,95 \cdot 10^3/\mu\text{L}$

4.2 Thrombelastometrie-Parameter der Probanden

Die Ergebnisse der Thrombelastometrie-Messungen sind in Tabelle 4 aufgelistet:

Proband	CT [s]	CFT [s]	MCF [s]	α -Winkel [°]
1	442	154	56,5	61
2	345	111	58	68
3	358	167	57,5	59
4	319	149	54	62
5	336	181	47	59
6	390	272	47	46
7	378	337	51	40
8	399	235	47,5	52
9	310	142	56,5	64
10	265	149	54,5	62
11	416	172	58,5	58
12	319	126	64	65
13	383	158	57,5	60
14	383	145	60	62,5
15	311	146	57	62
16	474	390	51	35
17	423	278	53	45
18	396	175	58,5	57,5
19	300	147	54,5	62
20	355	122	58	66
21	404	167	62	59
22	338	154	55	61,5
23	411	173	50	58
24	385	142	58,5	63
25	370	143	57,5	62,5
26	347	119	63,5	66,5
27	325	146	57,5	62

28	413	882	58,5	51,5
29	366	129	60,5	65
30	381	119	61,5	72,5
31	338	129	60,5	65
32	488	220	56	51,5
33	375	162	51,5	59,5
34	374	159	59,5	60
35	277	123	53,5	66
36	375	171	57,5	58
37	453	215	57,5	52,5
38	214	130	63,5	66
39	246	133	50	65,5
40	212	86	61,5	72,5
41	388	135	57	64
42	279	127	51,5	65,5
43	261	119	50	67
44	313	129	57	65
45	345	136	57,5	64
46	276	86	70	73,5
47	353	140	57	69
48	248	120	55	68,5
49	257	232	56	51,5
50	332	203	57	54,5
51	273	158	58	63
52	369	148	56,5	61,5
53	335	147	58	62
54	359	184	53	56,5

Tabelle 4: Thrombelastometrie-Parameter

4.2.1 Datenauswertung der Thrombelastometrie Parameter

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Abbildung 13 graphisch dargestellt:

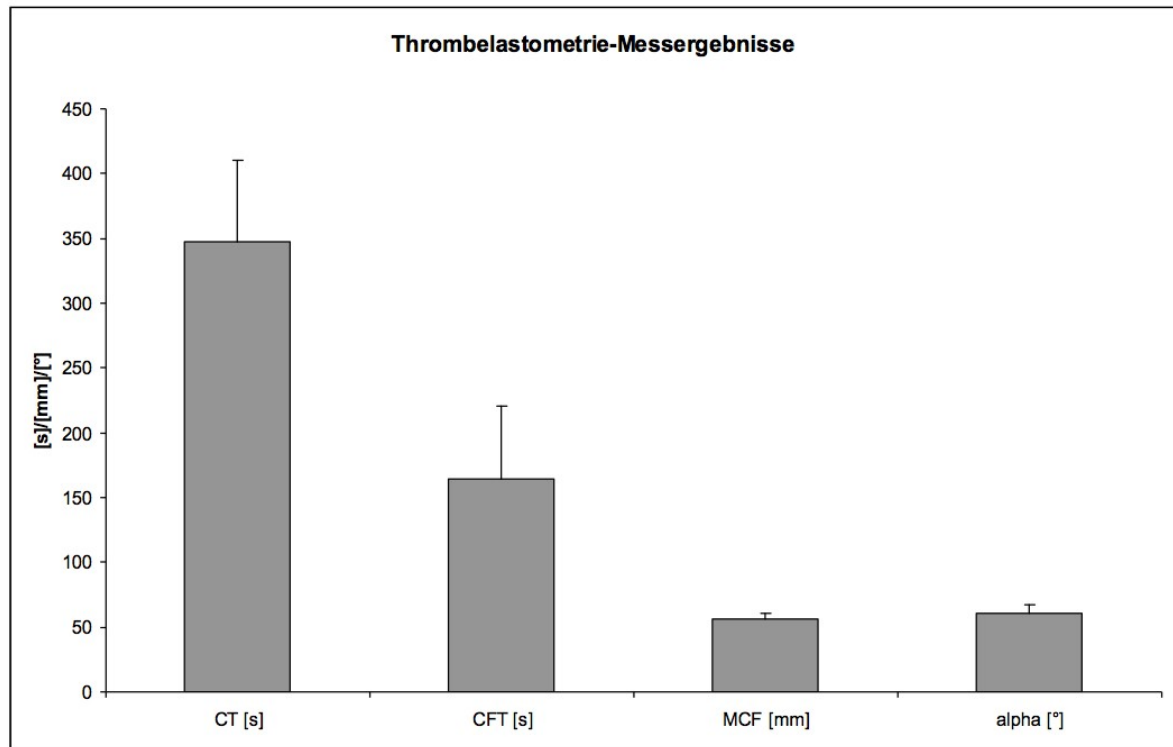


Abbildung 13 : Thrombelastometrie-Normalwerte ermittelt in 54 gesunden Probanden

Die Coagulation time betrug $347,81 \pm 62,07$ s, die Clot formation time $164,11 \pm 56,12$ s, die Maximum clot firmness $56,43 \pm 4,43$ mm und der alpha-Winkel $60,31 \pm 7,31$ °.

4.3 Thrombozytenaggregations-Parameter

Folgende Messergebnisse wurden ermittelt:

Probanden Nr.	Aggregometrie mit Kollagen-Aktivierung			Aggregometrie mit TF-Aktivierung			Aggregometrie mit Kollagen/TF-Aktivierung		
	Amplitude [Ohm]	Slope [Ohm/min]	Lag Time [s]	Amplitude [Ohm]	Slope [Ohm/min]	Lag Time [s]	Amplitude [Ohm]	Slope [Ohm/min]	Lag Time [s]
1	12	6	76	9	5	62	10	7	21
2	13	7	87	9	6	66	9	6	18
3	10	5	155						
4	10	4	134	10	4	96	11	5	52
5	10	4	118	11	4	98	9	4	62
6	5	3	120	6	3	156	6	2	80
7	8	4	144	8	4	46	9	4	62
8	10	4	120	10	4	119	10	4	58
9	12	5	80	11	6	58	11	5	40
10	10	4	101	10	4	59	10	4	53
11	11	6	100	10	8	116	12	10	41
12	9	6	80				12	9	32
13	5	3	72	8	6	103	11	6	45
14	8	5	106	7	4	90	8	5	38
15	8	6	110	7	4	86	11	7	45
16	8	5	104	8	4	83	8	5	51
17	10	7	98	7	4	84	10	7	48
18	5	3	124	6	3	90	10	4	49
19	7	4	106	7	4	101	8	4	52
20	9	6	82	9	6	90	11	7	46
21	11	7	68	10	8	75	10	7	30
22	8	4	94	8	4	89	9	5	37
23	7	4	96	7	4	124	7	4	56
24	11	7	84	10	7	92	8	7	41

25	11	7	68	10	7	90	12	8	32
26	13	10	81	11	10	82	13	11	22
27	9	7	104	10	7	83	19	8	37
28	10	6	108	9	7	69	10	7	18
29	11	7	79	10	7	89	13	8	37
30	9	5	75	10	7	100	10	7	26
31	12	9	91	13	9	134	13	10	43
32	9	5	128	10	6	95	9	5	34
33	8	4	70	10	7	74	8	5	31
34	8	6	110	9	7	82	8	7	24
35	12	6	84	10	6	118	13	7	38
36	12	7	84	11	7	84	15	10	26
37	8	4	100	10	5	132	10	6	34
38	10	6	106	11	6	104	10	7	38
39	10	5	116	10	5	114	9	5	55
40	1	2	270	10	7	106	9	7	36
41	9	5	116	10	7	95	11	7	33
42	8	4	109	8	4	126	8	4	80
43	6	4	102	9	5	90	6	4	62
44	2	2	168	9	7	80	10	7	42
45	1	2	331	6	4	112	8	4	38
46	4	2	104	12	9	50	12	9	21
47	12	6	66	8	5	78	8	5	26
48	7	4	116	7	4	120	7	4	58
49	6	3	150	4	2	128	6	3	62
50	10	6	98	10	7	116	10	6	40
51	9	6	78	6	4	126	6	4	52
52	6	7	130	10	6	68	10	7	54
53	11	6	70	11	7	95	12	7	45
54	10	5	80	10	6	98	12	6	36

Tabelle 5: Aggregometrie-Parameter

4.3.1 Datenauswertung der Kollagen-induzierten Aggregometrie-Parameter

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Abbildung 14 graphisch dargestellt.

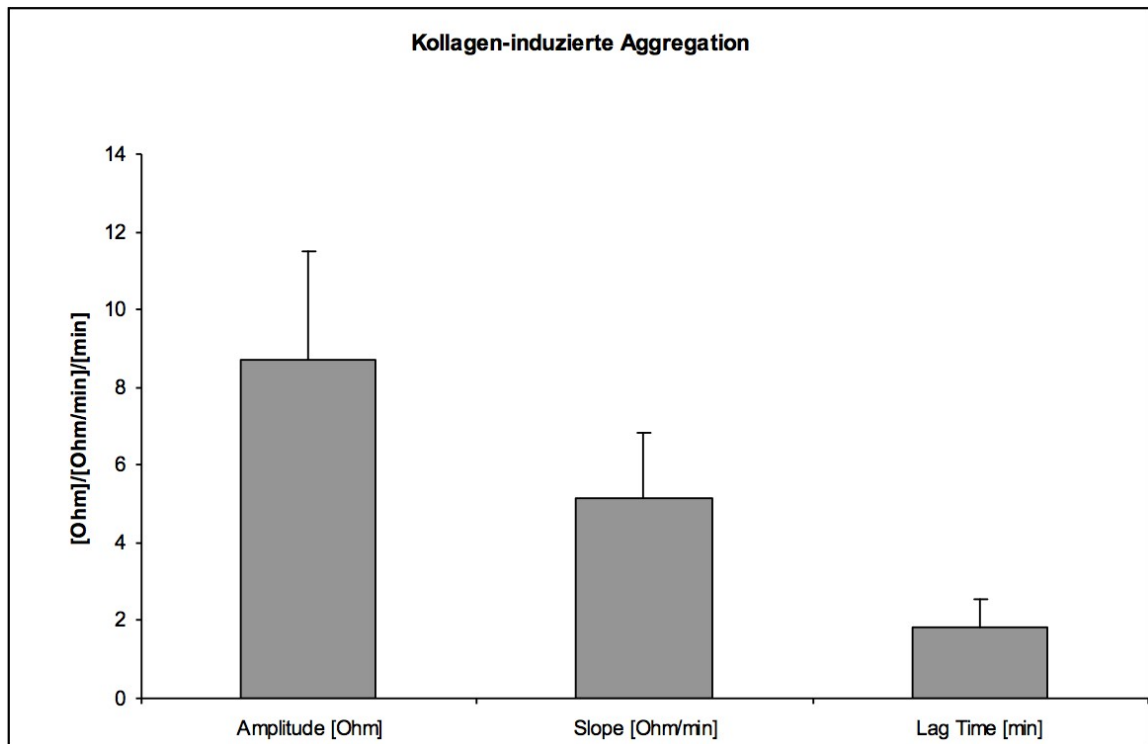


Abbildung 14: Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregations-Normalwerte ermittelt in 54 gesunden Probanden.

Die Amplitude betrug $8,72 \pm 2,80$ Ohm, der Slope war $5,13 \pm 1,71$ Ohm/min und die Lag time war $1,81 \pm 0,75$ Minuten.

4.3.2 Datenauswertung der Tissue Factor-induzierten Aggregometrie-Parameter

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Abbildung 15 graphisch dargestellt.

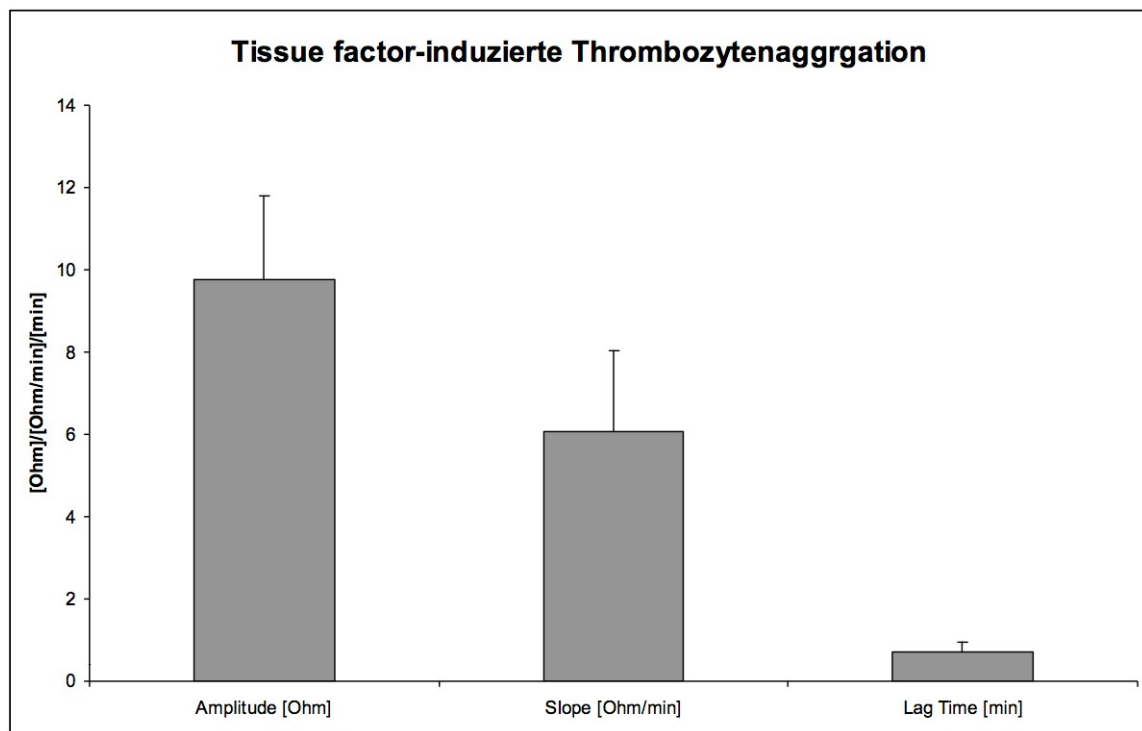


Abbildung 15: Tissue factor/Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregations-Normalwerte ermittelt in 54 gesunden Probanden.

Die Amplitude betrug $9,08 \pm 1,77$ Ohm, der Slope war $5,63 \pm 1,73$ Ohm/min und die Lag time war $1,05 \pm 0,38$ Minuten.

4.3.3 Datenauswertung der Kollagen/Tissue Factor-induzierten Aggregometrie-Parameter

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Abbildung 16 graphisch dargestellt.

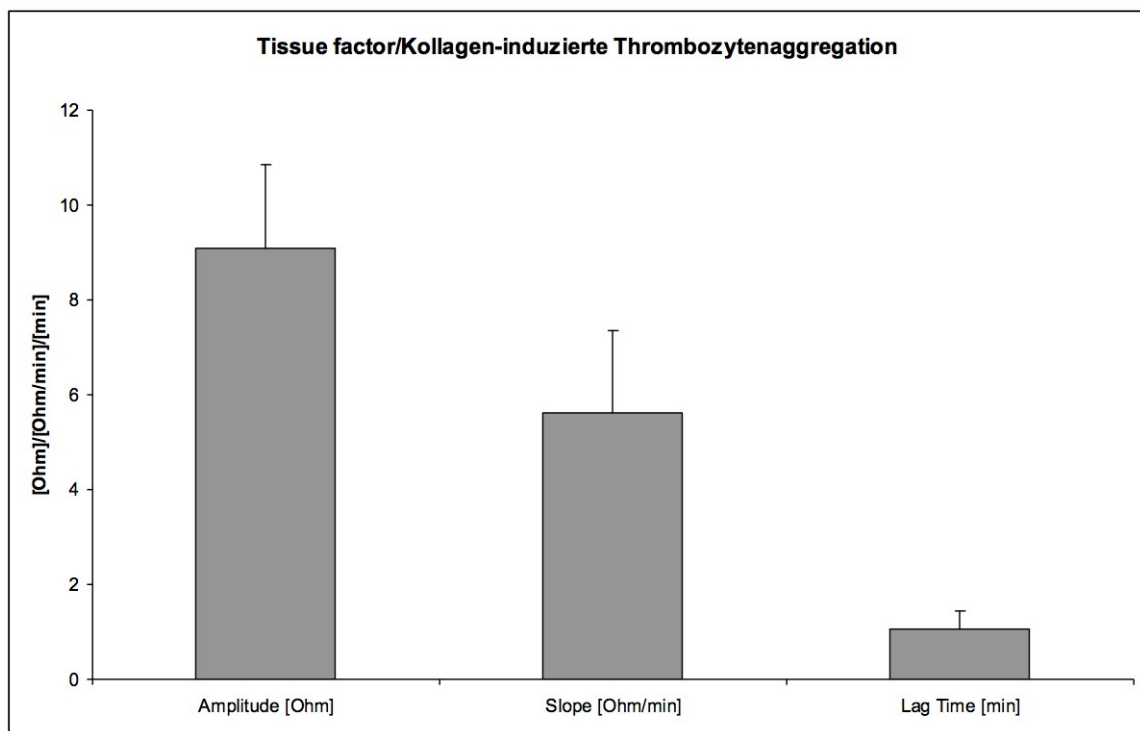


Abbildung 16: Kollagen/Tissue factor-induzierte Thrombozytenaggregations-Normalwerte ermittelt in 54 gesunden Probanden.

Die Amplitude betrug $9,08 \pm 1,77$ Ohm, der Slope war $5,63 \pm 1,73$ Ohm/min und die Lag time war $1,05 \pm 0,38$ Minuten.

4.4 Thrombozytenadhäsions-Parameter

Die Ergebnisse der Thrombozytenadhäsionsmessung sind in Tabelle 6 aufgelistet:

Probanden Nr.	Surface Coverage (SC) [%]	Average Size (AS) [μm^2]	Numbers of Objects
1	12	39	1874
2	10	31	1797
3	7,05	26	1545
4	7,6	24	1739
5	13	46	1657
6	7,65	28,5	1512
7	9,5	30	1826
8	10	34,5	1660
9	11	31,5	1974
10	6,15	21,5	1574
11	15	70	1288
12	10	36,5	1580
13	17	48,5	8051
14	16,5	53,5	1801
15	6,6	24,5	1507
16	5,1	21	1312
17	3,8	20	1055
18	8,5	30,5	1596
19	5,95	23	1447
20	5,4	22,5	1340
21	11	34	1766
22	10	30	1902
23	7,9	28	1544
24	13	33	2271
25	11,5	38,5	1691
26	17,5	43	2290

27	5,35	23	1280
28	4,75	24,5	1082
29	7,4	24,5	1673
30	13,5	35	2200
31	13	38	1911
32	7,8	26	1701
33	16,5	69,5	1397
34	11,5	41	1648
35	8,85	29,5	1699
36	11,5	41	1674
37	10,6	34	1774
38	20,5	56,6	2086
39	11,5	35,5	1833
40	7,8	25,5	1732
41	8	28,5	1572
42	8,5	29	1623
43	14,5	48,5	1728
44	8,75	30	1647
45	12,5	38,5	1848
46	11,8	39,5	1677
47	14,5	51,5	1660
48	16	71	1347
49	9,85	33	1654
50	8,25	28	1588
51	7,05	24,5	1640
52	10	29	1960
53	20	72,5	1614
54	20	113	1052

Tabelle 6: Thrombozytenadhäsions-Parameter

4.4.1 Datenauswertung der Thrombozytenadhäsions-Parameter

Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Abbildung 17 graphisch dargestellt.

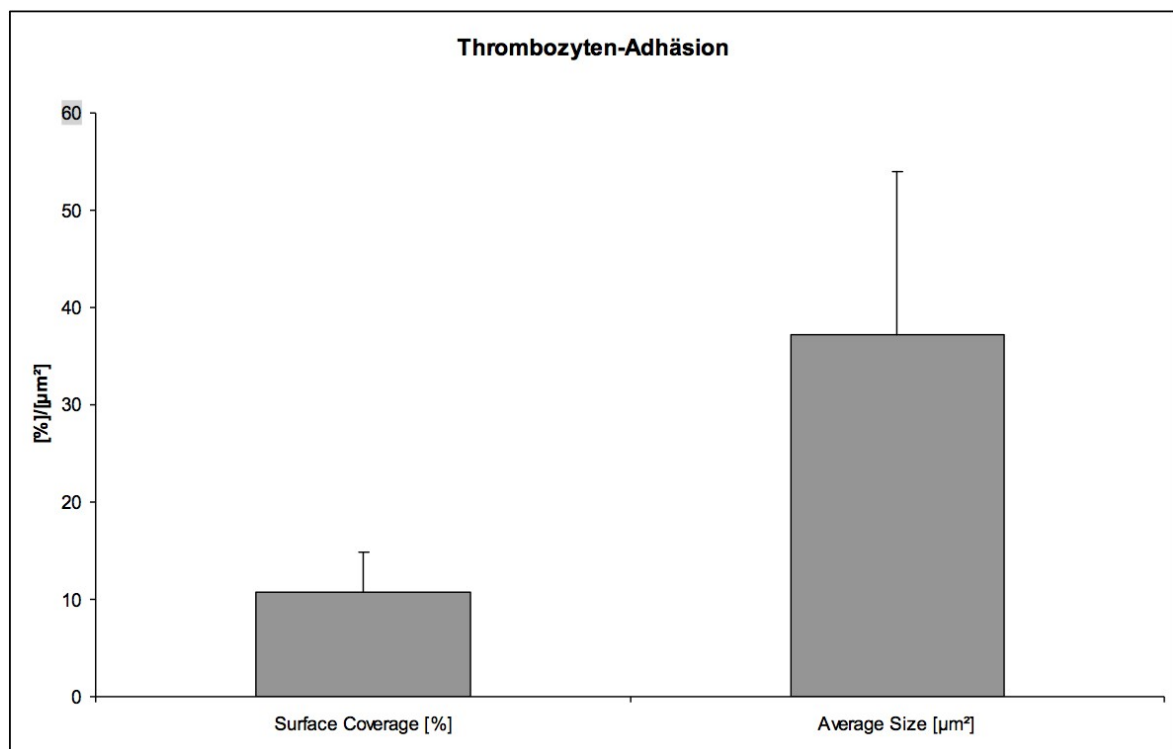


Abbildung 17: Thrombozytenadhäsions-Normalwerte ermittelt in 54 gesunden Probanden.

Die Surface coverage betrug $10,72 \pm 4,07$ %, die Average size war $37,20 \pm 16,18$ μm^2 .

5. Diskussion

Die hier vorliegende Diplomarbeit ist Teil einer Kooperation zwischen dem Institut für Physiologische Chemie (AP Dr. Gerhard Cvirn, Forschungseinheit „Spezielle Gerinnungsanalysen und Gerinnungsforschung“) und der Klinischen Abteilung für Angiologie (Dr. Thomas Gary). Im Rahmen dieser Kooperation soll der Einfluss der Thrombozytenfunktion auf die Reobstruktionsrate nach endovaskulärer Rekanalisation bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (PAVK) untersucht werden (EK20-182ex08/09).

Ziel dieser Diplomarbeit war es, im Vorfeld für die in dieser Kooperation zur Anwendung kommenden Gerinnungsuntersuchungen (Thrombelastometrie am ROTEM 05, Thrombozytenaggregation am Chrono Log Modell 700, Thrombozytenadhäsion am Impact R Cone and Plate(let) Analyzer) Referenzwerte an gesunden Probanden zu ermitteln.

Die in weiterer Folge an Patienten mit PAVK zu ermittelnden Messwerte sollen dann mit jenen Referenzwerten verglichen werden.

Die in dieser Diplomarbeit angewandten Gerinnungsmethoden sind (zur Zeit) im klinischen Alltag noch nicht etabliert. Deshalb war es notwendig, Referenzwerte an gesunden Probanden zu ermitteln. Die hier benutzten Methoden liefern allerdings, unserer Meinung nach, Messwerte, die der in-vivo-Situation viel näher kommen als jene der Routinemethoden (PT, aPTT). Dies lässt sich folgendermaßen begründen: Für Routine-Gerinnungsuntersuchungen werden die zu untersuchenden Plasmaproben mit Aktivator-Reagenz im Verhältnis 1:3 verdünnt, diese starke Verdünnung entspricht nicht der in-vivo Situation. Außerdem wird das Plasma dadurch mit unphysiologisch hohen Aktivatormengen inkubiert. Neueste Untersuchungen zeigen, dass in-vivo die Blutgerinnung von kleinsten Mengen Tissue Factor (im Pikomol-Bereich) ausgelöst wird. Der dritte Grund, warum die in dieser Diplomarbeit angewandten Methoden der in-vivo Situation näher kommen als die Routinemethoden ist dadurch gegeben, dass mit Vollblut gearbeitet wird. Plasma enthält zwar alle wichtigen Gerinnungsfaktoren, aber Vollblut enthält zusätzlich die für die Gerinnung essentiellen Thrombozyten und die für die Produktion von Tissue Factor (= physiologischer Aktivator) verantwortlichen Monozyten.

Zukünftigen Studien sollen zeigen, ob die am Institut für Physiologische Chemie entwickelten und etablierten sensiblen Gerinnungsmethoden in der Lage sind, einen möglichen hyper- oder hypokoagulablen Zustand von Patienten aufzuspüren um rechtzeitig vorbeugende oder therapeutische Maßnahmen einleiten zu können. Die in dieser Diplomarbeit ermittelten Normalwerte stellen dazu die Basis dar.

Literaturverzeichnis

Bhoola, K.D., Figueroa, C.D., Worthy, K., *Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases*, Pharmacological Reviews, 1992; 44: 1-80

Bjork I., Olson J. E., *Antithrombin, A bloody important serpin*, Adv. Exp. Med. Biol. 1997; 425:17-33

Brodnax Geer C. (2007): *Analytical studies on the mechanism of fibrin formation*, Chapel Hill, University of North Carolina

Bucher O., Wartenberg H. (1997): *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*, Bern, Hans Huber 12. Auflage

Candice D. (2008): *The role of urokinase plasminogen activator receptor in human pleural malignant mesothelioma*, Stephen F. Austin state university

Cesarman-Maus G, Hajjar K.A., *Molecular mechanisms of fibrinolysis*. British journal of haematology, 2005 May; 129(3): 307–21

Collen D. J., Schetz F. et al., *Metabolism of antithrombin III (heparin cofactor) in man: Effects of venous thrombosis of heparin administration*, Eur. J. Clin. Invest 1977 Feb; 7(1):27-35

de Boer J.P., Creasey A.A., Chang A. et al., *Alpha-2-macroglobulin functions as an inhibitor of fibrinolytic, clotting, and neutrophilic proteinases in sepsis: studies using a baboon model*, Infect. Immun, 1993 Dec; 61(12):5035-43

Deetjen P., Speckmann E., Hescheler J. (2005): *Physiologie*, München, Urban & Fischer, 4. Auflage

Fritsch H., Kühnel W. (2009): *Taschenatlas Anatomie – innere Organe*, Stuttgart, Thieme 10. Auflage

Hartert H: Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. *Klinische Wochenschrift* 1948; 26,: 577–583

Junqueira L., Carneiro J. (2004): *Histologie*, Heidelberg, Springer 6. Auflage

Kenkes-Matthes B., Oehler G. (2001): *Blutgerinnung und Thrombose*, Stuttgart, Thieme 3. Auflage 2001

Klinke R., Silbernagl S. (2001): *Lehrbuch der Physiologie*, Stuttgart, Thieme, 3. Auflage

Mathew E., Cvirn G, Gary T. (2011): *Einfluss der Thrombozytenfunktion auf die Reobstruktionsrate nach endovaskulärer Rekanalisation bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit*. Diplomarbeit Med Uni Graz.

Mimuro J.; *Type 1 plasminogen activator inhibitor: its role in biological reactions*, *Rinsho Ketsueki*, 1991; 32 (5): 487–9.

Neumann H. (2007): *Das Gerinnungssystem*, Berlin, ABW Wissenschaftsverlag

Olson S.T., Bjork I., *Regulation of thrombin activity by antithrombin and heparin*, *Semin Thromb Hemost*, 1994; 20(4):373-409.

Pötzsch B., Madlener K. (2010): *Hämostaseologie*, Heidelberg, Springer 2. Auflage

TEM International (2011): *Thrombelastometry (TEM®)*. Verfügbar unter: http://www.rottem.de/site/index.php?option=com_content&view=article&id=1&Itemid=7&lang=en. Stand: 20.12.2011