

Aus der Klinik und Poliklinik
für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Großhadern
der Ludwig- Maximilians- Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. K. Friese

**Geschlechts-spezifische und menstruationszyklus-abhängige
Unterschiede in der Expression von Mikropartikeln**

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

Vorgelegt von
Katharina Nikolajek
aus München
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Bettina Toth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Helga M. Schmetzer
Prof. Dr. med. Christian P.
Sommerhoff

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
1. Einleitung	2
1.1 Entstehung von Mikropartikeln	2
1.2 Aufbau von Mikropartikeln	4
1.3 Einfluss von Mikropartikeln auf die Gerinnung	5
1.4 Geschlechts-spezifische Unterschiede in der Gerinnungsphysiologie	7
1.5 Menstruationszyklus-abhängige Unterschiede in der Gerinnungsphysiologie	9
1.6 Fragestellung	10
2. Material und Methode	12
2.1 Verwendete Materialien und Geräte	12
2.2 Studiendesign	14
2.2.1 Ethikkommission und Aufklärungsbögen	14
2.2.2 Probandenkollektiv	14
2.2.3 Probengewinnung	15
2.2.4 Laborwerte und Thrombozytenzahl	16
2.2.5 Statistik	16
2.3 Durchführung der Methode	17
2.3.1 Vorbereitung der Pufferarbeitslösungen	17
2.3.2 Vorbereitung der Antikörper und des Annexins V	18
2.3.3 Aufbereitung der Proben	18
2.4 Durchflusszytometrie	19
2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie bei Mikropartikeln	19
2.4.2 Geräteeinstellung	20
2.4.3 Auswertung der Messungen	21
2.5 Antikörper und Farbstoffe	22
2.5.1 Annexin V	23
2.5.2 Anti-IgG1-Antikörper	24
2.5.3 Anti-CD61-Antikörper	24
2.5.4 Anti-CD62P-Antikörper	24
2.5.5 Anti-CD63-Antikörper	25

2.5.6	Anti-CD62E-Antikörper	25
2.5.7	Anti-CD144-Antikörper	25
2.6	Grundlagenversuche zur Methode	26
2.6.1	Tagesquerschnitt- und Monatslängsschnittverläufe der MP-Anzahl	26
2.6.2	Lagerung des entnommenen Blutes auf Eiswasser versus Lagerung bei Raumtemperatur	26
2.6.3	Unterschiedliche Verteilung von MP in den verschiedenen Plasmaschichten im zentrifugierten Zitratröhrchen	27
2.6.4	Unterschiede in der MP-Anzahl bei schockgefrorenen versus nichtschockgefrorenen Proben	27
2.6.5	Stabilitätsmessungen der MP-Anzahl bei längerem Stehen der verarbeiteten Proben	27
3. Ergebnisse		28
3.1	Grundlagenversuche zur Methode	28
3.1.1	Tagesquerschnitt- und Monatslängsschnittverläufe der MP-Anzahl	28
3.1.2	Lagerung des entnommenen Blutes auf Eiswasser versus Lagerung bei Raumtemperatur	30
3.1.3	Unterschiedliche Verteilung von MP in den verschiedenen Plasmaschichten im zentrifugierten Zitratröhrchen	31
3.1.4	Unterschiede in der MP-Anzahl bei schockgefrorenen versus nichtschockgefrorenen Proben	31
3.1.5	Stabilitätsmessungen der MP-Anzahl bei längerem Stehen der verarbeiteten Proben	32
3.2	Mikropartikelanalyse	33
3.2.1	Probandencharakteristika	33
3.2.2	Annexin V-positive MP	34
3.2.3	CD61-positive MP	35
3.2.4	CD62P- und CD63-positive MP	36
3.2.5	Endotheliale MP	39
4. Diskussion		41
4.1	Grundlagenversuche zur Methode	41
4.1.1	Tagesquerschnitt- und Monatslängsschnittverläufe der MP-Anzahl	41
4.1.2	Lagerung des entnommenen Blutes auf Eiswasser versus Lagerung bei Raumtemperatur	43
4.1.3	Unterschiedliche Verteilung von MP in den verschiedenen Plasmaschichten im zentrifugierten Zitratröhrchen	43

4.1.4	Unterschiede in der MP-Anzahl bei schock- gefrorenen versus nichtschockgefrorenen Proben	44
4.1.5	Stabilitätsmessungen der MP-Anzahl bei längerem Stehen der verarbeiteten Proben	44
4.2	Mikropartikelanalyse	45
	5. Zusammenfassung	50
	6. Literaturliste	51
	Lebenslauf	63
	Danksagung	64

Abkürzungen

ADP	Adenosin-diphosphat
AK	Antikörper
CaP	Calciumpuffer
CiP	Citratpuffer
EMP	Endotheliale Mikropartikel
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
FITC	Fluoreszein-Isocyanat
FSC	Forward-Scatter
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
IL1	Interleukin 1
IUGR	Intrauterine growth restriction
LH	Luteinisierendes Hormon
LMP	Leukozytäre Mikropartikel
MP	Mikropartikel
NO	Nitritoxid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PGI ₂	Prostacyclin
PMP	Thrombozytäre Mikropartikel
PS	Phosphatidylserine
PSGL-1	P-Selektin-Bindungsprotein
ROCK I	Rho-assoziierte Kinase
SSC	Side-Scatter
TF	Tissue factor
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TVT	Tiefe Beinvenenthrombose

1 Einleitung

Mikropartikel (MP) wurden erstmals 1967 von Wolf beschrieben (128). Er zeigte thrombozytäre Membranfragmente auf, die er als „platelet dust“ bezeichnete (15,121). Dieser „Thrombozytenstaub“ beinhaltete kleinste Bestandteile mit weniger als 0,1 μm Durchmesser. Diese MP weisen eine prokoagulatorische Potenz auf und können bei vermehrtem Auftreten als Indikator für Verletzung, Stress, Thrombosen und Entzündung dienen (121).

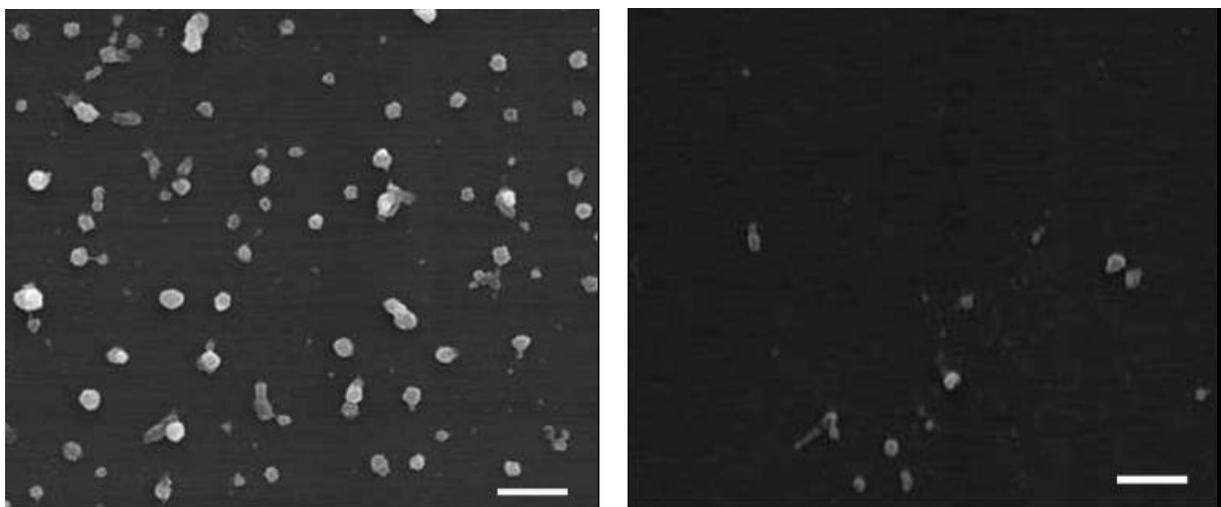


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Darstellung von Mikropartikeln (114).

1.1 Entstehung von Mikropartikeln

Zirkulierende Blutzellen (Thrombozyten, Leukozyten, Erythrozyten) sowie Endothelzellen und glatte Muskelzellen sind in der Lage MP zu bilden und freizusetzen (118,120,121). Eine Freisetzung erfolgt zumeist bei der Aktivierung oder bei der Apoptose (physiologischer Zelltod) der Zellen (29,68,42). Ferner können partielle oder komplette Lyse (z.B. komplement-induziert) sowie oxidativer- oder Scher-Stress zur Bildung von MP führen (10,11,13,16).

Eine Aktivierung von Zellen kann durch verschiedene Agonisten ausgelöst werden (bei Plättchen durch Thrombin, Calciumionophor oder Adenosindiphosphat (ADP) plus Kollagen; bei Monozyten, Endothelzellen und glatten

Muskelzellen durch bakterielle Lipopolysaccharide, Tumor-Nekrose- Faktor alpha (TNF α) oder Interleukin 1 (IL1)) (121,128). Getriggert durch einen Agonisten kommt es zu einer Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration aus intrazellulären Calciumspeichern (dense Tubuli) oder aus dem Plasma (13,15). Der Anstieg des zytosolischen Calciums führt zu einer Aktivierung von Kinasen und Calpain sowie zu einer Hemmung von Phosphatasen (9,26,39,80,781,126,130). Die Bildung von MP ist ebenfalls auf die Erhöhung des zytosolischen Calciums zurückzuführen. Eine Reduktion des extrazellulären Calciums durch EGTA, welche die Steigerung des zytosolischen Calciums verhindert, kann auch die Entstehung von MP blockieren (19,30,79). Eine Veränderung der Enzymaktivität in der Zelle bewirkt die Auflösung der Zellskelettstruktur, die eine Stabilitätsminderung der Zellmembran zur Folge hat und damit die Bildung von MP begünstigt (20,27,41,56,61). Der genaue Mechanismus bleibt noch ungeklärt. Wissenschaftlich bewiesen ist, dass durch die Aktivitätszunahme von Calpain Talin, ein wichtiger Bestandteil des Zellskeletts verändert wird (30,47,48,112). Der bedeutendste Fibrinogenrezeptor auf Thrombozyten (Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor) kann im aktivierten Zustand durch Bindung von Fibrinogen ebenfalls zur Entstehung von MP führen (66,68,86,87).

Auch der physiologische Zelltod ist durch Bildung von MP gekennzeichnet, die sich allerdings in Form, Größe und Aufbau von den MP, die bei Zellaktivierung gebildet werden, unterscheiden können (121). Durch Zellkontraktionen und Instabilität der Zellmembran bei der Apoptose sowie durch Fragmentation des genetischen Materials werden MP freigesetzt (24,47,48,94). Die verminderte Stabilität der Zellmembran resultiert aus einer Aktivierung der Rho-assoziierten Kinase (ROCK I) aufgrund einer Aktivitätssteigerung von zellulären Caspasen (19,28,64). ROCK I verändert die Struktur des Zellskeletts durch Anheftung der Aktin-Myosin-Filamente an die Zellmembran (121). In die entstehenden Apoptosekörperchen können durch die verstärkte Enzymaktivität DNA-Fragmente aus dem Kern transportiert werden (3,15,59,87). Daher können MP, die durch Apoptose entstehen, Teile der zellulären DNA enthalten

(121). Laut Berckmans et al. (10) stammt der größte Teil der zirkulierenden MP von Thrombozyten (thrombozytäre MP, PMP).

1.2 Aufbau von Mikropartikeln

Der Aufbau der MP hängt stark von der Ursprungszelle ab (15,74). MP sind umgeben von einer Phospholipidmembran (121). Aktivierung bzw. Apoptose von Zellen führen zu Strukturänderungen im Aufbau der Zellen. Negativ geladene Phospholipide, wie Phosphatidylserine (PS), die normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran zu finden sind, kommen auf der Membranoberfläche der MP zu liegen (11,15,74).

Diese negativ geladenen Phospholipide an der Membranoberfläche sind Bindungsstellen für Gerinnungsfaktoren sowie für Annexin V (10,124). Annexin V besitzt eine wesentlich höhere Affinität zu den Phospholipiden als Gerinnungsfaktoren, wie tissue factor (TF) oder Faktor VIII (124). Daher können PS-positive MP durch die Bindungsfähigkeit von farbstoffmarkiertem Annexin V im Durchflusszytometer detektiert werden.

Die Zusammensetzung der MP-Zellmembran variiert abhängig von der Zellart der Ursprungszelle oder der Art der auslösenden Stimuli (Entzündung, Apoptose, Aktivierung, etc.) sehr stark (121). PMP beinhalten aktivierte Gerinnungsfaktoren, wie Faktor IXa, VIIa, Xa und Va (46,54,55,63,109). Nicht alle MP tragen negativ geladene PS auf ihrer Außenseite. Berckmans et al. (11) beschrieben synoviale leukozytäre MP (LMP) bei entzündlicher Arthritis, die auf ihrer Membranaußenseite vermehrt Lysophosphatidylcholine, Lysophosphatidylethanolamine, Sphingomyelin sowie weitere Lysophospholipide tragen, allerdings nur wenig PS (13,16,59,61). Diese MP zeigen aufgrund der verminderten PS eine geringere prokoagulatorische Potenz auf (11). PS-positive MP werden vor allem von Thrombozyten, Endothelzellen, Monozyten und Erythrozyten freigesetzt (11).

MP tragen auf ihrer Oberfläche -unabhängig von der Art der Entstehung- zumindest einige der spezifischen Antigene ihrer Ursprungszellen (13,57,74).

Dies ermöglicht eine Subtypisierung der MP (durch Antikörper gegen diese spezifischen Antigene) im Durchflusszytometer. Zudem können Proteine an der Außenseite der MP exprimiert werden, welche durch Apoptose oder Aktivierung der Ursprungszelle vom Zellinneren nach außen transloziert werden (66,68,104,113).

1.3 Einfluss der Mikropartikel auf die Gerinnung

Die Exprimierung von TF auf der Zelloberfläche (z.B. von Monozyten) führt zur Aktivierung der Gerinnungskaskade. Durch Protolyse wird die Umwandlung der Gerinnungsfaktoren über Feedback-Mechanismen initiiert und der Gerinnungsablauf beschleunigt. Die Aktivierung des Tenase- und Prothrombinase-Komplexes führt zur Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin (33). In Abbildung 2 ist die Freisetzung von MP schematisch dargestellt.

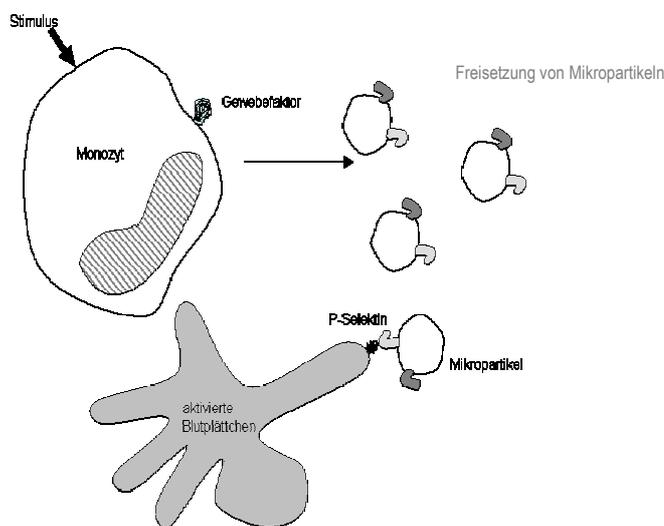


Abbildung 2: Freisetzung von Mikropartikeln. Monozyten setzen nach Aktivierung durch einen Stimulus MP frei, welche an ihrer Oberfläche P-Selektin Bindungsproteine aufweisen, womit sie an P-Selektin exprimierende Thrombozyten binden.

Die maßgebliche Funktion von TF wurde in mehreren Studien bestätigt. Diese wiesen nach, dass TF frei im Blut zirkuliert sowie in LMP gespeichert und transportiert wird (10,34,41). Eine Stimulation von Monozyten führt zur Bildung und Exprimierung von TF (siehe Abb. 2). Zudem synthetisieren die Monozyten MP, welche TF und P-Selektin-Bindungsprotein (PSGL-1) auf ihrer

Oberfläche präsentieren (10). P-Selektin ist ein Membranprotein, das in Thrombozyten (α -Granula) und Endothelzellen (Weibel-Palade Körperchen) gespeichert wird.

Diese MP zirkulieren im Blutkreislauf in relativ niedrigen Konzentrationen. TF ist somit entweder inaktiv oder zu sehr verdünnt, um die Gerinnung zu aktivieren. Im Rahmen einer Gefäßverletzung akkumulieren Blutplättchen und exprimieren P-Selektin. MP docken an PSGL-1 auf stimulierten Blutplättchen an und befördern TF zu dem wachsenden Thrombus. Nachdem TF eine kritische Konzentration überschritten hat, triggert er den weiteren Ablauf der Gerinnungskaskade (33). Ca 2/3 der TF Aktivität wird in PMP transportiert (25,84). Zudem kann ein Einfluss auf die Hemmung der Fibrinolyse durch PMP, welche Plasminogen activator inhibitor I exponieren, dargestellt werden (25,98). Abbildung 3 stellt die bislang bekannten Funktionen der MP schematisch dar.

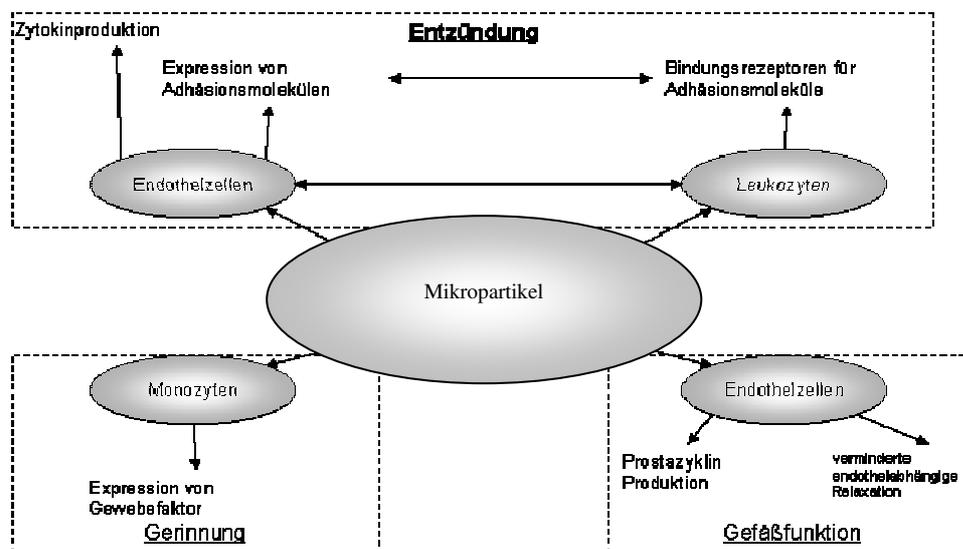


Abbildung 3: Bislang bekannte Funktionen der Mikropartikel (121).

Zusätzlich werden durch MP bioaktive Moleküle in andere Zellen transportiert (siehe Abb. 3), welche zur Bildung von TF, Zytokinen, Zelladhäsions- und Wachstumsfaktoren führen und die Funktion von Endothelzellen beeinflussen (12,31,86,93).

Eine neue Studie von Nieuwland zeigt, dass Patienten mit gastrointestinalen oder gynäkologischen Malignomen erhöhte Plasmalevel von TF exponierenden Vesikeln aufweisen (88). So kann, zumindest teilweise, die erhöhte Gerinnungsaktivität bei Patienten mit gastrointestinalen oder gynäkologischen Malignomen erklärt werden (32,88).

1.4 Geschlechts-spezifische Unterschiede in der Gerinnungsphysiologie

Junge Frauen (bis 45 Jahre) weisen ein dreifach höheres Risiko auf eine venöse Thrombose zu entwickeln als altersentsprechende Männer (89,97,101,112). Dieses erhöhte Risiko wird durch orale Kontrazeption, Schwangerschaft, Wochenbett und Hormonersatztherapie teilweise erklärt. Weitere Gefahren sind Nikotinkonsum, hereditäre Thrombophilie sowie ein niedriger sozioökonomischer Status (97). Auch die Herkunft der Menschen spielt in der Genese einer tiefen Beinvenenthrombose (TVT) eine Rolle. So haben Afroamerikaner ein höheres Risiko eine TVT zu entwickeln als Kaukasier (125). Der genaue Mechanismus, durch welchen weibliche Steroidhormone das Thromboserisiko erhöhen, ist bislang ungeklärt. Als bekannt gilt jedoch, dass zahlreiche Faktoren der plasmatischen Gerinnung durch Steroidhormone beeinflusst werden (18). Die meisten der prothrombotischen Wirkungsweisen werden den Östrogenen zugeschrieben. Gestagene gewinnen erst in der letzten Zeit durch zahlreiche Publikationen zunehmend an Bedeutung. Sie belegen ein erhöhtes Gerinnungsrisiko bei Anwenderinnen oraler Kontrazeption der dritten Generation (gestagen-betont) (21,23,102).

Im Gegensatz zu Männern besitzen Frauen einen thrombogenen Grundstatus. Schreiber et al. (106) zeigten, dass Frauen kurz nach einer Verletzung eine höhere Hyperkoagulabilität aufweisen als Männer. Dies kann als Selektionsvorteil gewertet werden. Denn aus der höheren Hyperkoagulabilität der Frauen nach Verletzungen resultiert eine kürzere Blutungszeit, die einen

verminderten Blutverlust bei Trauma, Geburt und Menstruation zur Folge hat (100).

Steroidhormone entfalten ihre Wirkung über die Bindung an spezifische Rezeptoren. Der Östrogenrezeptor reguliert Transkriptionsprozesse, welche eine nukleäre Translokation und Bindung an spezifische Antwortelemente beinhalten. Des Weiteren führen diese Transkriptionsprozesse zur Regulation der Expression von Zielgenen (119), die den Progesteronrezeptor und den Gerinnungsfaktor XII codieren. Unter dem Einfluss von Östrogenen wird die Expression der zugehörigen Proteine erhöht (107).

Darüber hinaus wurden neue, sogenannte nicht-transkriptionale Mechanismen identifiziert, wie z.B. steroidinduzierte Veränderungen von zytoplasmatischen und membrangebundenen Regulationsproteinen (83).

Endothelzellen besitzen eine essentielle Funktion in der Regulation von Hämostase und vaskulärer Reaktivität (107). Durch die Freisetzung von vasodilatatorischen oder vasokonstriktiven Stoffen tragen sie maßgeblich zum Gefäßtonus bei. Zu den wichtigsten Vasodilatoren gehören Nitritoxid (NO) und Prostacyclin (PGI₂) (107).

An der Gefäßwand dominieren nicht-transkriptionale Wirkungsweisen. Östrogene und Glukokortikoide triggern die Vasodilatation über eine Induktion von NO-Synthase in Endothelzellen. Dies erfolgt über eine östrogenrezeptor-abhängige Aktivierung der Proteinkinase und der Phosphatidylinositol 3-OH Kinase (83). Einige Studien bestätigten allerdings keinen relevanten geschlechts-spezifischen Zusammenhang in der Entstehung von thrombembolischen Ereignissen (65,91,101).

Durch Plättchen induzierte Thrombosen finden sich bei Männern signifikant häufiger als bei Frauen (52,71). Die Funktion der Plättchen in vivo ist bei Männern im Vergleich zu Frauen gesteigert. Männer weisen eine kürzere Blutungszeit auf als Frauen (7,92). Thrombozyten von gesunden Männern

produzieren mehr Thromboxan A₂ und haben einen höheren Cholesterinanteil in der Membran als Thrombozyten von gesunden Frauen (60). Allerdings zeigt sich die Plättchenreaktivität bei einer in vitro Plättchenaggregation auf die Plättchen-Agonisten ADP, Epinephrin und Serotonin bei Männern niedriger als bei Frauen (60). Keinen geschlechts-spezifischen Unterschied zeigte die Plättchenaggregation auf Norepinephrin, Arachnodsäure und Kollagen (60). Plättchen von gesunden Männern sind in vivo hämostatisch aktiver aufgrund einer gesteigerten Fähigkeit zur Adhärenz an arterielles Subendothelium (60). Thrombozyten gesunder Frauen reagieren auf ADP als ein Aggregationsagent empfindlicher als Männer (131). Faraday et al. (36) belegten bei Frauen eine höhere Anzahl von fibrinogen-bindenden GPIIb-IIIa Rezeptoren pro Plättchen als bei Männern. Bei der totalen Anzahl der GPIIb-IIIa Rezeptoren konnte kein geschlechts-spezifischer Unterschied aufgezeigt werden.

1.5 Menstruationszyklus-abhängige Unterschiede in der Gerinnungsphysiologie

Der Menstruationszyklus wird unterteilt in die Follikularphase (zwischen dem Eintritt der Menstruation und dem Eisprung) und in die Lutealphase (zwischen dem Eisprung und dem Beginn der Menstruation). Im Verlauf der Follikularphase steigt die Konzentration an Östrogen kurz vor dem Eisprung rasch an, um dann unmittelbar danach abzufallen. Während der Lutealphase folgt eine langsame Zunahme des Östrogenspiegels, der bei Eintritt der Menstruation abfällt. Einen Anstieg von Progesteron beobachtet man erst nach dem Eisprung in der Lutealphase. Dieses fällt mit Beginn der Menstruation wieder ab.

Einige Studien belegten keine menstruationszyklus-abhängigen Unterschiede in der Anzahl der verschiedenen Gerinnungsfaktoren (131). Allerdings beschrieben Turksoy et al. (115) eine Zunahme von Fibrinogen, Plasminogen und fibrinolytischen Inhibitoren 10 bis 17 Tage vor der Menstruation und im prämenstruellen Status. Zudem wird ein Abfall der fibrinolytischen Aktivität in der Woche vor der Menstruation festgestellt (131). Innerhalb des

Menstruationszyklus unterliegt die Anzahl der Plättchen Schwankungen, nicht aber die Adhärenzfähigkeit der Plättchen oder die elektrophoretische Mobilität (131). So beschrieben Pepper et al. (95) eine Zunahme der Thrombozytenanzahl in der Mitte des Menstruationszyklus sowie einen Abfall der Plättchenlevel während der Menstruation. Zum Zeitpunkt der Ovulation fanden Zahavi et al. (131) eine gesteigerte Plättchenaggregation. Auch die GPIIb-IIa Rezeptor- reaktivität unterliegt einer menstruationszyklus-abhängigen Schwankung und ist bei prämenopausalen Frauen höher als bei jungen Männern (bis 45 Jahre) (36).

1.6 Fragestellung

Die Bestimmung der Expression sowie der Subtypisierung der MP korreliert mit verschiedenen Krankheitsbildern (68,87,121). Es ergaben sich Hinweise, dass die Anzahl der MP als Indikator für die Aktivität autoimmuner Krankheitsbilder wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Morbus Crohn und Colitis ulcerosa), rheumatoide Arthritis oder multiple Sklerose dienen kann (4,66,79). Erhöhte PMP-Werte wurden bei Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Hypertonie, Myokardinfarkt und Sepsis gefunden (86,94,113,121). Ein Anstieg der endothelialen MP (EMP) zeigte sich beim akuten Koronarsyndrom, beim Anti-Phospholipid-Syndrom, bei der multiplen Sklerose, bei Patientinnen mit Präeklampsie sowie bei der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (13,19,30,47,48,61,79,104). Ferner konnte bei Patientinnen mit rezidivierenden Spontanaborten erhöhte Plasmalevel an PMP und EMP nachgewiesen werden. Allerdings beschrieben Salomon et al. (104), dass die Anzahl der zirkulierenden MP in der 25. Schwangerschaftswoche keinen prädiktiven Aussagewert für eine Entwicklung von schwangerschafts-induzierten Komplikationen (Bluthochdruck, Prä-eklampsie, intrauterinen growth restriction (IUGR)) hat.

Bisher fehlen Untersuchungen zu grundsätzlichen geschlechts-spezifischen und menstruationszyklus-abhängigen Unterschieden in der Expression und Subtypisierung von MP.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit quantifizierbaren Unterschieden in der Expression und Subtypisierung von MP bei gesunden Frauen im Vergleich zu altersentsprechenden gesunden Männern. Zudem wurde der Frage nachgegangen, ob menstruationszyklus-abhängige Unterschiede in der MP-Expression und MP-Subtypisierung bestehen. Diese gewonnenen Daten können möglicherweise weitere Informationen darüber liefern, warum gesunde Frauen im Vergleich zu altersentsprechenden Männern ein höheres Thromboserisiko aufweisen.

2 Material und Methode

2.1 Verwendete Materialien und Geräte

Kanüle	Monovette, 20 g	Sarstedt AG&Co.KG, Kehlheim, Deutschland
Zitratröhrchen	5 ml Coagulation	Sarstedt AG&Co.KG, Kehlheim, Deutschland
EDTA-Röhrchen	2.3 ml EDTA	Sarstedt AG&Co.KG, Kehlheim, Deutschland
Steril-Pipetten	5 ml, 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Styrolröhrchen	BD Falcon 5 ml	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Mikroschraubröhrchen	1.5 ml	Sarstedt AG&Co.KG, Kehlheim, Deutschland
Pipetten	0.5-20 µl, 2-200 µl, 50-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	0.5-20 µl, 2-200 µl, 50-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
HCL, NaOH		Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Spritzen	10 ml, 20 ml BD Discardit	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Filter	Minisart	Santorius Göttingen, Deutschland
Blaues Schraubrohr	50 ml Polypropylene Conical Tube	Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, France
Eppendorf Cups	0.5 ml Safe-Lock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
FACS-Röhrchen	5 ml	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Erlenmeyerkolben Becherglas	50 ml, 500 ml 50 ml	Schott AG, Mainz, Deutschland
CaCl ₂		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
NaCl		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Citrat		Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phosphat		Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Destilliertes Wasser	Ampuva®	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
Natriumhypochloritlösung		Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FACSafe	20 l	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow	20 l	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACS Rinse	20 l	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 1: Verwendete Materialien.

Zentrifuge gross	Heraeus-Omnifuge 2.0 RS	Heraeus GmbH, Werheim/Taunus, Deutschland
Tischzentrifuge	Mikro 22 R, Rotor 24 fach	Andreas Hettich GmbH&Co, Tuttlingen, Deutschland
PH-Meter	WTW STH 600, Microprocessor PH-Meter	WTW Wissenschaftlich- Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Vortex	Genie 2	Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz
Durchfluss-zytometer	FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Geräte.

2.2 Studiendesign

2.2.1 Ethikkommission und Aufklärungsbögen

Die Ethikkommission erkannte dieser Studie am 20.11.2003 die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit an. Die Probanden wurden vor der Teilnahme an der Studie von der betreuenden Ärztin oder der medizinischen Doktorandin über den Ablauf, die Bedingungen der Studie sowie über ihr Rücktrittsrecht aufgeklärt. Zudem dokumentierten die Studienteilnehmer ihr Einverständnis durch eine Unterschrift auf dem Aufklärungsbogen.

2.2.2 Probandenkollektiv

Die Studienteilnehmer setzten sich aus freiwilligen Probanden zusammen. Die Untersuchung umfasste 24 weibliche sowie 17 männliche Personen. Beide Untersuchungsgruppen waren bezüglich des Alters homogen und somit vergleichbar. Das Durchschnittsalter betrug bei den weiblichen Probanden 31 Jahre, bei den männlichen Probanden 29 Jahre. Alle Probanden waren Kaukasier. Zu den Ausschlusskriterien für eine Studienteilnahme zählten:

- Nikotinabusus
- chronische oder akute Erkrankungen
- bekannte Gerinnungsstörungen
- regelmäßige Medikamenteneinnahme
- Einnahme von gerinnungs-beeinflussenden Mitteln
- orale Kontrazeption
- Alter <18 Jahre und >35 Jahre.

2.2.3 Probengewinnung und Lagerung

Das Blut für die Untersuchung entnahm immer dieselbe erfahrene Person mit einer weitleumigen Kanüle aus den Cubitalvenen der Probanden. Um den Einfluss auf den Aktivierungsgrad der Thrombozyten zu minimieren, achteten wir auf einen geringen Stauungsdruck (ca. 40 mmHg) sowie eine kurze Stauungszeit (wenige Sekunden). Drei Blutröhrchen wurden entnommen: für die Bestimmung der MP und des D-Dimer ein Zitratröhrchen (5 ml), ein Serumröhrchen für die Hormonbestimmung (Estradiol, Progesteron, Follikelstimulierendes Hormon (FSH), Luteinisierendes Hormon (LH)) sowie ein EDTA-Röhrchen für die Thrombozytenanzahl (2.3 ml). Die Blutentnahme erfolgte bei allen Probanden jeweils morgens (8 Uhr), da es Schwankungen der MP-Level im Tagesverlauf gibt, wobei die Anzahl der MP morgens und abends am höchsten ist (vgl. Kapitel 2.6.1, Grundlagenversuche zur Methode, Tagesquerschnitt- und Längsschnittverläufe der MP-Anzahl). Die Weiterverarbeitung des entnommenen Blutes erfolgte innerhalb von 15 min, um Änderungen der MP-Anzahl bei längerem Stehen zu verhindern (vgl Kapitel 2.6.2, Grundlagenversuche zur Methode, Lagerung des entnommenen Blutes auf Eiswasser versus Lagerung bei Raumtemperatur).

Die abgenommenen Zitratröhrchen für die Untersuchung von geschlechtsspezifischen und menstruationszyklus-abhängigen Unterschieden in der MP-Expression wurden 20 min mit 3000 RPM (rounds per minute, Anzahl der Umdrehungen pro Minute) bei 20°C zentrifugiert (Hereaus Omnifuge). Danach wurde das überstehende Plasma (Platelet Pure Plasma) vorsichtig abpipettiert, wobei der letzte cm im Zitratröhrchen stehen blieb, um Verunreinigungen durch die Blutzellen zu vermeiden. Das abpipettierte Plasma kam in ein Styrolröhrchen, wurde gut gevortext und schließlich zu je 250 µl in Mikroschraubröhrchen abgefüllt (vgl. Kapitel 2.6.3, Grundlagenversuche zur Methode, Unterschiedliche Verteilung von MP in den verschiedenen Plasmaschichten im zentrifugierten Zitratröhrchen).

Die Mikroschraubröhrchen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um einer möglichen Kristallbildung entgegen zu wirken, welche bei langsamem Einfrieren auftritt und zu einer Verfälschung der MP-Werte führen kann (vgl. Kapitel 2.6.4, Grundlagenversuche zur Methode, Unterschiede in der MP-Anzahl bei schockgefrorenen versus nichtschockgefrorenen Proben). Anschließend erfolgte das Tiefgefrieren bei -80°C .

2.2.4 Laborwerte und Thrombozytenzahl

Bei allen Probanden wurde die Thrombozytenzahl bestimmt, da die Anzahl der PMP in Abhängigkeit zur Thrombozytenzahl steht. Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie war ein unauffälliges kleines Blutbild und ein Differentialblutbild. Zur Erfassung des Hormonstatus der weiblichen Probanden wurden neben Östradiol und Progesteron zusätzlich die FSH- und LH- Werte untersucht. Die Konzentrationsbestimmung der Hormone im Serum erfolgte mit Hilfe des automatischen Immunassay Systems (Roche Elecsys 2010, Roche Diagnostics; Mannheim, Germany). Die Bestimmung der D-Dimerkonzentration im Serum war notwendig, um feststellen zu können, ob grundsätzlich eine Aktivierung der Gerinnung vorlag.

2.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte durch das SPSS-Programm (Statistical Package for Social Science, Windows Version 16.0, Chicago, Illinois, USA). Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test analysiert, die unabhängigen Variablen durch den nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test. Alle statistischen Tests waren zweiseitig. P-Werte von <0.05 wurden als statistisch signifikant angenommen.

2.3 Durchführung der Methode

2.3.1 Vorbereitung der Pufferarbeitslösungen

Die Zubereitung der Pufferarbeitslösungen erfolgte täglich frisch. Hierzu wurden für die Arbeitslösung des Citratpuffers (CiP) Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) und Citratgrundlösung im Verhältnis 10:1, für die Arbeitslösung des Calciumpuffers (CaP) PBS und Calciumgrundlösung im Verhältnis 40:1 vermischt (vgl. Tabelle 3). Nach Zusammenfügen der jeweils zwei Komponenten erfolgte eine Einstellung der beiden Arbeitslösungen mit dem pH-Meter (WTW STH 600, Microprocessor pH-Meter, WTW GmbH, Weilheim, Deutschland) auf einen pH-Wert im Bereich von 7.36-7.44. Dies geschah, indem den Lösungen, je nach dem ob sie zu basisch oder zu sauer waren, geringe Mengen an HCl (Salzsäure) bzw. NaOH (Natronlauge) zugegeben wurden. Bei Erreichen des korrekten pH-Wertes, wurde die Pufferlösung in eine 20 ml Spritze aufgezogen, durch einen Filter gedrückt und abgefüllt.

PBS-Puffer	0.25 g Phospat, 9.0 g NaCl, 1000 ml destilliertes Wasser	1-2 Wochen bei Raumtemperatur haltbar
Citratgrundlösung	1.6 g Citrat , 50 ml destilliertes Wasser	4-12 Wochen bei 2-8°C haltbar
Calciumgrundlösung	1.47 g CaCl ₂ , 100 ml destilliertes Wasser	8 Monate bei 2-8°C haltbar

Tabelle 3: Puffergrundlösungen.

2.3.2 Vorbereitung der Antikörper und des Annexin V

Die Antikörper und das Annexin V (vgl. Kapitel 2.5) erfuhren eine Verdünnung durch die Calciumarbeitslösung. Nach dieser Prozedur wurden alle Antikörper zentrifugiert ((Tischzentrifuge, Andreas Hettich GmbH&Co, Deutschland), 5 min, 20°C, 13000 RPM, Bremse 0). Um später das Pellet wiederzufinden, wurden die Cups zuvor markiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere Hälfte abpipettiert, in ein frisches Cup gegeben und zur Detektion der MP weiter verwendet. Die untere Hälfte wurde verworfen.

2.3.3 Aufbereitung der Proben

Die MP wurden nach dem von Berckmans et al. (10) beschriebenen Verfahren isoliert. Zum Auftauen (ca. 1 Stunde) stellten wir die Proben senkrecht in Eis, so dass sie vollständig mit Eis bedeckt waren. Nach dem Auftauen der Proben wurden diese in der Tischzentrifuge (13000 RPM, 20°C, Bremse 1) 30 min geschleudert. Vor der Zentrifugation erfolgte die Markierung der Cups am Deckel (siehe oben). Nach der Zentrifugation wurden die Cups vorsichtig aus der Zentrifuge herausgeholt, die Markierung wurde nach unten gedreht. Anschließend pipettierten wir 2x100 µl und 1x25 µl langsam ab. Im Cup verblieben 25 µl, die mit 225 µl CiP resuspendiert und vermischt wurden. Danach erfolgte die 2. Zentrifugation (30 min, 13000 RPM, 20°C, Bremse 1). Zwischen der ersten und der zweiten Zentrifugation bereiteten wir die Antikörper und das Annexin V vor (vgl. Kapitel 2.3.2) und stellten sie bis zur Weiterverarbeitung in den Kühlschrank. Nach der zweiten Zentrifugation wurden erneut 2x100 µl und 1x25 µl vorsichtig abpipettiert und mit 75 µl CiP resuspendiert. Gemäß dem Pipettierschema (siehe Tabelle 4) wurden 9 verschiedene Cups mit je 35 µl Puffer gefüllt. Dabei gaben wir jeweils 35 µl CiP in die beiden Cups mit den Leerproben für Annexin V-FITC und Annexin V-PE sowie 35 µl CaP in jedes der übrigen 7 Cups. Anschließend wurden je 5 µl

Pellet sowie jeweils 5 µl Antikörper und Annexin V aufgetragen und anschließend für 15 min im Dunkeln inkubiert.

Cup 1	Cup 2	Cup 3	Cup 4	Cup 5	Cup 6	Cup 7	Cup 8	Cup 9
35 µl CiP	35 µl CaP	35 µl CaP	35 µl CaP	35 µl CaP	35 µl CaP	35 µl CiP	35 µl CaP	35 µl CaP
5 µl Pellet	5 µl Pellet	5 µl Pellet	5 µl Pellet	5 µl Pellet	5 µl Pellet	5 µl Pellet	5 µl Pellet	5 µl Pellet
5 µl Annexin V-FITC	5 µl Annexin V-FITC	5 µl Annexin V-FITC	5 µl Annexin V-FITC	5 µl Annexin V-FITC	5 µl Annexin V-FITC	5 µl Annexin V-PE	5 µl Annexin V-PE	5 µl Annexin V-PE
	5 µl Anti- IgG1-PE	5 µl Anti- CD61-PE	5 µl Anti- CD62P- PE	5 µl Anti- CD63-PE	5 µl Anti- CD62E- PE		5 µl Anti- IgG1- FITC	5 µl Anti- CD144- FITC

Tabelle 4: Pipettierschema. 9 Cups wurden mit je 35 µl Puffer gefüllt, dann wurden pro Cup 5 µl Pellet, 5µl Antikörper und 5µl Annexin V aufgetragen und inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Reaktion mit 900 µl CaP gestoppt bzw. für die beiden Annexin V Leerproben wurde 900 µl CiP in ein FACS-Röhrchen pipettiert und im Durchflusszytometer eingelesen (vgl. Kapitel 2.6.5, Grundlagenversuche zur Methode, Stabilität der MP-Anzahl bei längerem Stehen der verarbeiteten Proben).

2.4 Durchflusszytometrie

2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie bei Mikropartikeln

Durch die Durchflusszytometrie ist es möglich, mit Hilfe von Antikörpern und Farbstoffen MP zu messen und ihre Herkunft über bestimmte Membranproteine an der Oberfläche zu bestimmen (123).

Das Verfahren der Durchflusszytometrie analysiert Zellen oder Partikel, die beim Durchfließen an einem fokussierten Laserstrahl mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten AK und Farbstoffen detektiert werden (123). Hierbei

erfassen spezifische Dioden die Fluoreszenzintensität sowie das Streulicht (85,123). Dies ermöglicht Aussagen zur Größe der Zellen oder Partikel durch den Forward-Scatter (FSC, Vorwärtsstreulicht des Lasers), zur Granularität durch den Side-Scatter (SSC, Seitwärtsstreulicht des Lasers) sowie zu bestimmten Membranstrukturen durch fluoreszierende AK oder Farbstoffe (FL1 bzw. FL2 Kanal). Der verwendete Durchflusszytometer, der FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), beinhaltet einen Argonlaser mit einer fluoreszenzanregenden Wellenlänge von 488 nm. Damit können bis zu drei verschiedene Fluoreszenzen synchron erfasst werden, vorausgesetzt sie unterscheiden sich in den emittierenden Wellenlängen. Für Kanal 1 liegt die Wellenlänge bei 530 nm, für Kanal 2 bei 585 nm und für Kanal 3 bei 650 nm. Für diese Studie wurden folgende Fluoreszenzfarbstoffe genutzt: Fluoreszein-Isocyanat (FITC) mit einer mittleren Emissionswellenlänge von 525 nm (Kanal 1) sowie Phycoerythrin (PE) mit einer mittleren Emissionswellenlänge von 575 nm (Kanal 2).

2.4.2 Geräteeinstellung

Die aufbereiteten Proben (vgl. Kapitel 2.3.3) wurden mit der EinzugsEinstellung "high" für eine Minute in das Durchflusszytometer eingelesen. Die genaue Einzugsmenge des FACS-Gerätes variierte sehr stark von Tag zu Tag. Daher war es nötig, den Einzug jeden Tag neu zu messen. Hierzu wurde in einem FACS-Röhrchen eine bestimmte Menge destillierten Wassers abgewogen, für 10 min eingelesen und danach erneut abgewogen. Daraufhin erfolgte die Umrechnung der Differenz der beiden Werte in ml/h. Zur Reduzierung der eingezogenen Datenmenge wurde im FSC bei 52 eine Schwelle (threshold) gelegt, um Verunreinigungen oder Luftblasen bei der Messung nicht mit zu erfassen. Sowohl für den FSC als auch für den SSC wählten wir die logarithmische Darstellung. Zur Kalibrierung des FACS-Gerätes wurde einmal eine Messung mit Beads durchgeführt. Tägliche Beads-Kontrollen waren für unsere Messungen nicht nötig, da keine quantitativen Werte pro MP benötigt wurden. Wichtig für unsere Messungen

war die Aussage, ob die gemessenen MP gegenüber einer Negativkontrolle positiv sind oder nicht. Die absolute MP-Anzahl pro Probensatz wurde mit unserer Rechenformel bestimmt (vgl. Kapitel 2.4.3).

2.4.3 Auswertung der Messungen

Die MP Analyse Maske wurde im Computerprogramm Cell Quest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) erstellt. Abbildung 4 zeigt die von uns erstellte Auswertungsmaske. Zur Abgrenzung der MP von der Plättchenpopulation lasen wir zu Beginn Vollblut ins FACS-Gerät ein. Die Thrombozytenpopulation konnte aufgrund ihrer spezifischen Größe und Granularität im FSC und SSC identifiziert werden. Der Anteil links der Plättchenwolke wurde im Diagramm mit R1 markiert und genau analysiert, da in diesem Gebiet die MP zu erwarten waren.

Die gesamten Annexin-positiven MP wurden anhand der Fluoreszenz und der Granularität aufgezeigt (FITC-positive Events (FL1) bzw. PE-positive Events gegen Granularität (SSC)). Abbildung 4(B) zeigt schließlich die gut abgrenzbare MP-Wolke im oberen rechten Bereich, die sowohl Annexin V als auch AK positiv war.

Nach Erhalt der entsprechenden Events aus der Auswertungsmaske errechneten wir die Anzahl der sich im Plasma befindenden MP gemäß der Formel $N/I = E \times (100/5) \times (950/X) \times (10^6/250)$. „E“ beschreibt die Anzahl der gemessenen Events aus der Auswertungsmaske. Da von den 100 µl zentrifugierten Plasmas nur 5 µl verwendet wurden, erscheint der Bruch (100/5) in dieser Formel. Das Endvolumen im FACS-Röhrchen betrug nach Stoppen der Reaktion mit 900 µl Puffer 950 µl. Die in einer Minute eingelesene Menge hängt stark von der täglich neu gemessenen Einzugsmenge (siehe Kapitel 2.4.2) des Durchflusszytometers ab. Um die exakte eingelesene Menge zu berücksichtigen, wurde diese mit (950/X) in die Formel eingebracht. Die Umrechnung der 250 µl Plasmaprobe auf die Einheit „pro l“ erfolgte schließlich mit dem Formelteil (10⁶/250).

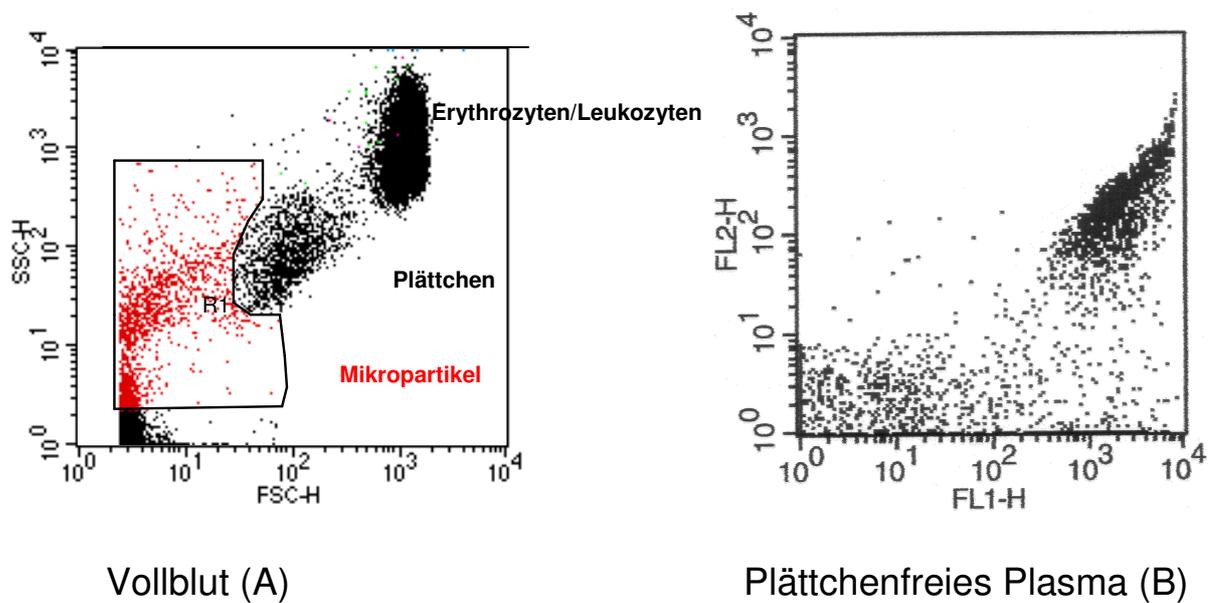


Abbildung 4: Auswertungsmaske zur Analyse der MP. Im Vollblut sind im Bereich R1 die MP zu erwarten, welche kleiner sind als Thrombozyten (A). Eine CD61 positive MP-Wolke im plättchenfreiem Plasma (B).

2.5 Antikörper und Annexin V

Zur Bestimmung der Anzahl und Herkunft der MP kamen verschiedene Antikörper (AK) und Farbstoffe (Fluoreszein-Isocyanat (FITC), Phytcoerythrin (PE)) zur Anwendung. Tabelle 5 stellt die Firmenübersicht der verwendeten Antikörper und Farbstoffe dar. Für alle Antikörper und Annexin V wurden in Vorversuchen an unserem Durchflusszytometer Konzentrationsbestimmungskurven angefertigt und auf Basis dieser Ergebnisse die optimalen Verdünnungen gewählt (vgl. Promotionsarbeit von Meike Kern, „Mikropartikel als Risikofaktor bei Frauen mit rezidivierenden Spontanaborten“).

Annexin V-FITC	Immuno Quality Products, Groningen, Niederlande
Annexin V-PE	Immuno Quality Products, Groningen, Niederlande
Anti-IgG1-AK-FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti-IgG1-AK-PE	Immuno Quality Products, Groningen, Niederlande
Anti-CD61-AK-PE	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Anti-CD62E-AK-PE	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Anti-CD62P-AK-PE	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Anti-CD63-AK-PE	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Anti-CD144-AK-FITC	Acris, Hiddenhausen, Deutschland

Tabelle 5: Firmenübersicht der verwendeten Antikörper und Farbstoffe.

2.5.1 Annexin V

Annexine sind Zellproteine, die physiologischerweise in sämtlichen Lebensformen (Ausnahme Bakterien) vorkommen. Die Gruppe der Annexine ist in eine Vielzahl zellulärer Aktivitäten involviert, die mit Änderungen der Zellstruktur einhergehen, wie Apoptose, Endo- und Exocytose, und andere (44). Klinisch relevant sind z.B. Annexin I als wichtiger Marker in der anti-inflammatorischen Reaktion (99) sowie in der proapoptotischen Reaktion (6). Annexin V ist ein Protein, welches physiologischerweise in Anwesenheit von Calcium-Ionen an der Oberfläche des Syncytiotrophoblasten in der Plazenta bindet und große antikoagulatorische Potenz besitzt (124). Allgemein ist Annexin V ein wichtiger Bestandteil der Gerinnungsphysiologie (44). Wie bereits erwähnt, bindet Annexin V mit einer hohen Affinität an PS, die durch Aktivierung oder Apoptose auf der Zellmembran der MP exprimiert werden. Die optimale Verdünnung wurde für Annexin-FITC mit 1:10, für Annexin-PE mit 1:20 festgelegt.

2.5.2 Anti-IgG1-Antikörper

Da die verwendeten AK alle der IgG1-Klasse angehören, wurden für die Leerkontrolle AK dieser Klasse gewählt. CD61-AK binden beispielsweise zu 20% an unspezifische Strukturen der MP. IgG1 decken diese unspezifischen Strukturen ab. Die Verdünnung für Anti-IgG1-FITC sowie für Anti-IgG1-PE betrug 1:10.

2.5.3 Anti-CD61-Antikörper

Der Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptor (CD61) ist der häufigste Fibrinogenrezeptor auf der Oberfläche der Thrombozyten und PMP (43,121). Durch die Bindung von Fibrinogen am aktivierten CD61 wird die Bildung von PMP gefördert (vgl. Kapitel 1.1). Zur Detektion von PMP im Durchflusszytometer wurden PE-markierte Anti-CD61-Antikörper in der Verdünnung 1:10 verwendet.

2.5.4 Anti-CD62P-Antikörper

P-Selektin (CD62P) wird auf aktivierten Thrombozyten aus den alpha-Granula an der Oberfläche exprimiert und fördert das "rolling" der Leukozyten und Plättchen an den Endothelzellen sowie die Migration und die Extravasion der Neutrophilen und Makrophagen (5,40,75,122). Die Quantität von CD62P-positiven PMP spiegelt die in vivo Aktivierung von Thrombozyten wider (77,116). Durch PE-markierte Anti-CD62P-Antikörper (Verdünnung 1:10) wurden die PMP gemessen, die von aktivierten Plättchen stammen.

2.5.5 Anti-CD63-Antikörper

Der Rezeptor CD63 wird bei höhergradiger Aktivierung von Thrombozyten, Endothelzellen, Granulozyten und anderen Zellarten (Fibroblasten, Osteoklasten, glatte Muskelzellen, Synovialzellen, periphere Nerven) aus intrazellulärer Granula an der Oberfläche freigesetzt (90,110,117). Analog zu der Bestimmung der Expression von CD62P auf MP kann auch durch die Expression von CD63 eine Aussage über die Plättchenaktivierung in vivo gewonnen werden (117). Die Verdünnung von Anti-CD63-AK-PE war 1:2.

2.5.6 Anti-CD62E-Antikörper

E-Selektin (CD62E) wird auf stimulierten Endothelzellen exprimiert und führt bei entzündlichen Prozessen zum Leukozyten-rolling an den aktivierten Endothelzellen (14,70). Die Anzahl an zirkulierenden CD62E-positiven EMP spiegelt die endotheliale Aktivierung wider (1). Die optimale Verdünnung für Anti-CD62E-AK-PE betrug 1:10.

2.5.7 Anti-CD144-Antikörper

VE-Cadherin (CD144) ist ein Protein im interzellulären Bereich von Endothelzellen und dient dort der Adhäsion. Anti-CD144-AK eignen sich daher zum Nachweis von EMP (67). Anti-CD144-AK-FITC wurde in der Verdünnung 1:2 verwendet.

2.6 Grundlagenversuche zur Methode

2.6.1 Tagesquerschnitt- und Monatslängsschnittverläufe der MP- Anzahl

Um mögliche Schwankungen der Gesamtzahl der MP im Tages- bzw. im Zyklusverlauf feststellen zu können, wurden von je vier weiblichen und vier männlichen Probanden Tagesquerschnitt- und Längsschnittstudien angefertigt. Bei den Tagesverläufen erfolgte eine Blutentnahme jeweils um 8 Uhr, 12 Uhr, 16 Uhr und 20 Uhr. Die Längsschnittstudie verlief über vier Wochen, wobei jede Woche zur gleichen Zeit eine Blutentnahme durchgeführt wurde. Bei den weiblichen Probanden wurde der Zyklustag genau vermerkt.

2.6.2 Lagerung des entnommenen Blutes auf Eiswasser versus Lagerung bei Raumtemperatur

Vorversuche zeigten, dass die Weiterverarbeitung des Blutes nach der Entnahme innerhalb von 15 Minuten erfolgen sollte. Ziel dabei war es, eine Autoaktivierung der Thrombozyten mit resultierender Erhöhung der MP-Anzahl bzw. eine Reduktion der MP-Anzahl mittels Phagozytose durch Makrophagen zu verhindern. Um vom Ausmaß der Erhöhung bzw. der Reduktion der MP-Anzahl einen Eindruck zu bekommen, erfolgten folgende Versuchsreihen: Nach Abnahme des Blutes eines Probanden kam ein Teil der Blutröhrchen auf Eiswasser, der andere Teil der Röhrchen blieb bei Raumtemperatur stehen. Nun wurden nach 30 min, 60 min, 2h, 4h, 6h und 24h je ein Eiswasser- und ein Raumtemperaturröhrchen weiterverarbeitet und untersucht.

2.6.3 Unterschiedliche Verteilung von MP in den verschiedenen Plasmaschichten im zentrifugierten Zitratröhrchen

Da unterschiedliche Verteilungen der MP in den verschiedenen Schichtungen des Plasmas im Zitratröhrchen nicht auszuschließen sind, wurde dies bei drei Probanden untersucht. Dazu wurde das Plasma Schicht für Schicht direkt aus dem zentrifugierten Zitratröhrchen aliquotiert.

2.6.4 Unterschiede in der MP-Anzahl bei schockgefrorenen versus nichtschockgefrorenen Proben

Um mögliche Unterschiede in der MP Anzahl zwischen schockgefrorenen und nicht schockgefrorenen Proben festzustellen, wurde hierzu bei drei Probanden von der gleichen Blutprobe ein Teil des Blutes schockgefroren (in flüssigem Stickstoff) und bei -80°C gelagert. Der andere Teil der Proben wurde nichtschockgefroren bei -80°C eingefroren.

2.6.5 Stabilitätsmessungen der MP-Anzahl bei längerem Stehen der verarbeiteten Proben

Wir führten bei 5 Probanden Stabilitätsmessungen durch, um mögliche Veränderungen der Gesamtzahl der MP nach längerem Stehen zu untersuchen. Die Messung der Proben im Durchflusszytometer erfolgte sofort nach Aufbereitung sowie nach 15 min, 30 min, 45 min und 60 min.

3 Ergebnisse

Alle Messungen erfolgten durch den gleichen Untersucher und waren in zahlreichen Vorversuchen reproduzierbar. Die maximale Abweichung bei Messungen der gleichen Probe betrug 10%.

3.1 Grundlagenversuche zur Methode

3.1.1 Tagesquerschnitt- und Monatslängsschnittverläufe der MP- Anzahl

Es zeigte sich, dass die MP-Anzahl im Tagesverlauf morgens (8 Uhr) und abends (20 Uhr) am größten war. Dies hatte zur Folge, dass wir für die Untersuchung der geschlechts-spezifischen und menstruationszyklus-abhängigen Unterschiede in der Expression von MP ausschließlich Blutproben verwendeten, welche den Probanden morgens (8 Uhr) entnommen wurden. Zudem zeigten sich starke Schwankungen der MP-Anzahl im Zyklusverlauf. Bei den Abnahmen während der Lutealphase waren die Gesamtzahlen der MP bei allen weiblichen Probanden höher als während der Follikularphase. Da die Ergebnisse der MP-Anzahl während der Menstruation nicht von denen der Follikularphase abwichen, wurde die Menstruation definitionsgemäß der Follikularphase zugeordnet (vgl. Kapitel 1.5).

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Zyklusphasen der Probandinnen bei den einzelnen Abnahmen.

	1. Abnahme	2. Abnahme	3. Abnahme	4. Abnahme
Person 1	Follikular	Follikular	Luteal	Luteal
Person 2	Follikular	Follikular	Luteal	Follikular
Person 3	Follikular	Luteal	Luteal	Follikular
Person 5	Luteal	Follikular	Follikular	Luteal

Tabelle 6: Zyklusphase der weiblichen Probanden bei den wöchentlichen Abnahmen.

Nachfolgende Diagramme stellen die Längsschnittstudienresultate graphisch dar.

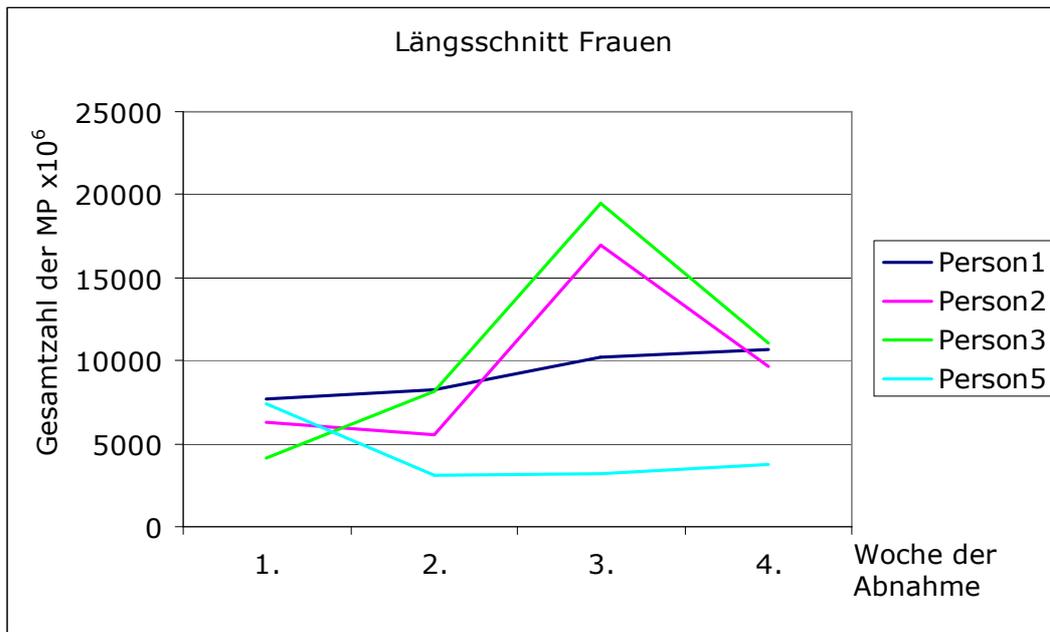


Abbildung 4: Längsschnittstudie Frauen. Über 4 Wochen einmal pro Woche eine Blutentnahme, morgens um 8 Uhr. Die Gesamtzahl der MP während der Lutealphase des Menstruationszyklus ist höher als die Gesamtzahl der MP während der Follikularphase.

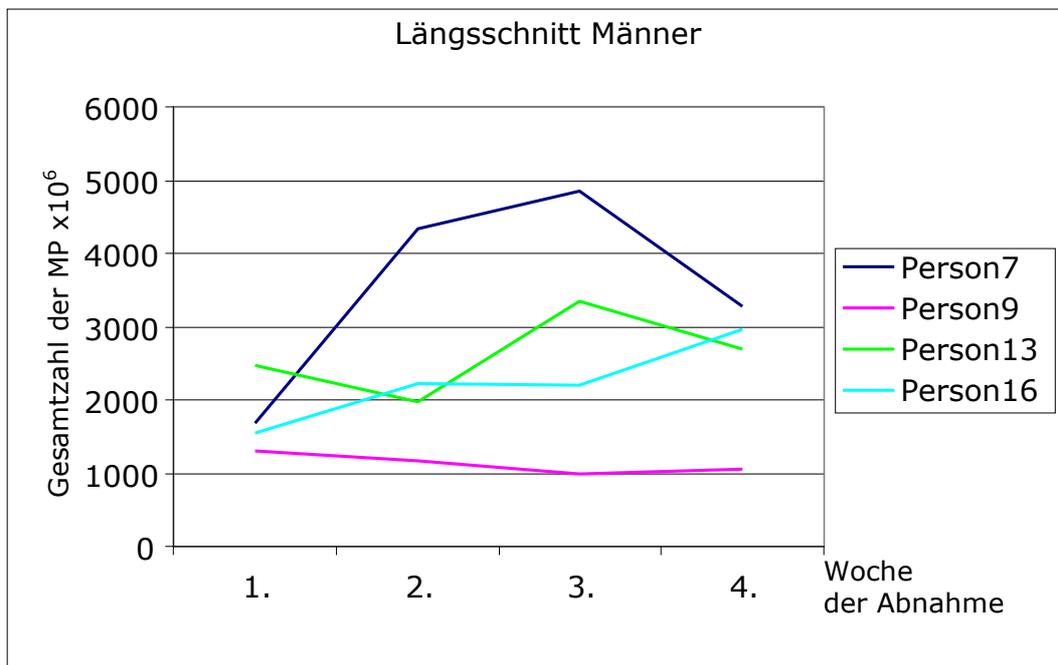


Abbildung 5: Längsschnittstudie Männer. Über 4 Wochen einmal pro Woche eine Blutentnahme, morgens um 8 Uhr. Auch bei einigen männlichen Probanden kann man gewisse Schwankungen der Gesamtzahl der MP über einen vierwöchigen Zeitraum beobachten.

3.1.2 Lagerung des entnommenen Blutes auf Eiswasser versus Lagerung bei Raumtemperatur

Die Ergebnisse der Messreihe zeigten, dass die Gesamtzahl der MP nach 40 min bei den Eiswasserröhrchen anstieg, während sie bei den Raumtemperaturröhrchen abfiel. In Abbildung 6 sieht man die Änderungen der MP-Anzahl im Zeitintervall bei Proben, die auf Eiswasser und bei Proben, die bei Raumtemperatur gelagert wurden. Bei den Proben, die auf Eiswasser gelagert wurden, kommt es erst zu einem Anstieg und dann später im Verlauf (nach ca 1 Stunde) zu einem Abfall der MP-Level. Die Verlaufskurve der MP-Zahlen bei Proben, die bei Raumtemperatur gelagert wurden, verhält sich gegensätzlich zu der Eiswasserkurve. Um homogene Ergebnisse zu erzielen, erfolgte die Weiterverarbeitung des entnommenen Blutes deshalb in den ersten 15 min nach Abnahme.

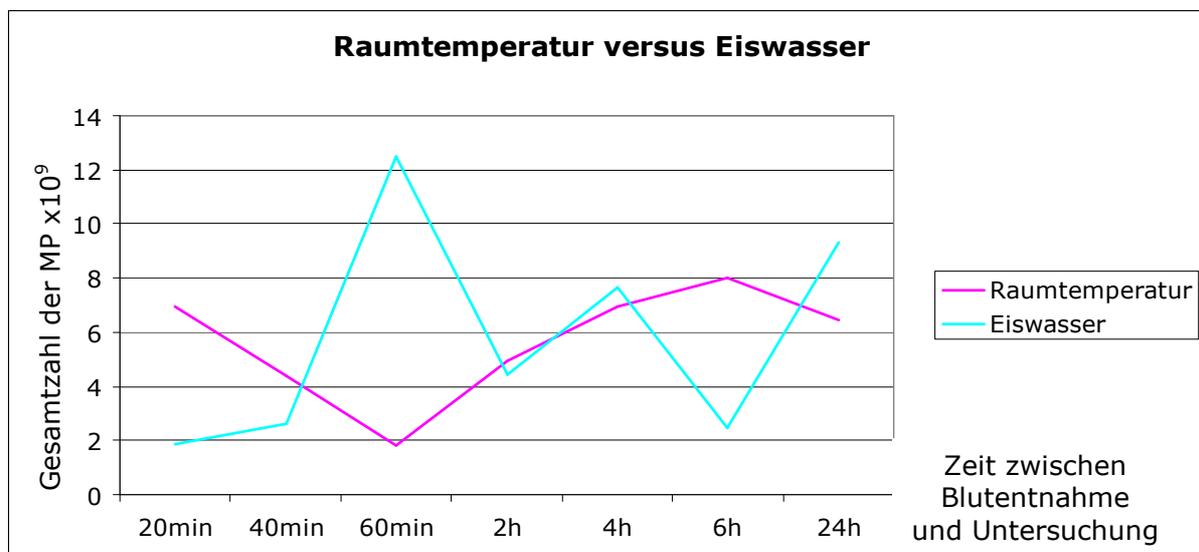


Abbildung 6: Raumtemperatur vs. Eiswasser. Nach der Blutentnahme wurde das Blut der Probandin zu einem Teil auf Eiswasser gestellt, der andere Teil bei Raumtemperatur gelagert. Nach 20 min, 40 min, 60 min, 2h, 4h, 6h, 24h wurden die Proben untersucht. Nach ca. 40 min beobachtet man einen Anstieg der MP-Anzahl bei den Proben, die auf Eiswasser gelagert waren und einen Abfall der MP-Anzahl bei den Proben, die bei Raumtemperatur gelagert wurden.

3.1.3 Unterschiedliche Verteilung von MP in den verschiedenen Plasmaschichten im zentrifugierten Zitratröhrchen

Tatsächlich konnten unterschiedliche Gesamtzahlen innerhalb der verschiedenen Plasmaschichten nachgewiesen werden. Abbildung 7 zeigt die starken Variationen der MP-Level in den verschiedenen Schichtungen des Plasmas. Bei einem Probanden (Reihe 2) sind die Schwankungen sehr ausgeprägt, während die anderen Probanden (Reihe 1 und 3) eher moderate Unterschiede in der MP-Anzahl in den verschiedenen Plasmaschichten zeigen. Um einheitliche Ergebnisse zu erhalten, wurde deshalb das gesamte gewonnene Plasma eines Probanden abpipettiert, als Ganzes vermischt und somit homogenisiert.

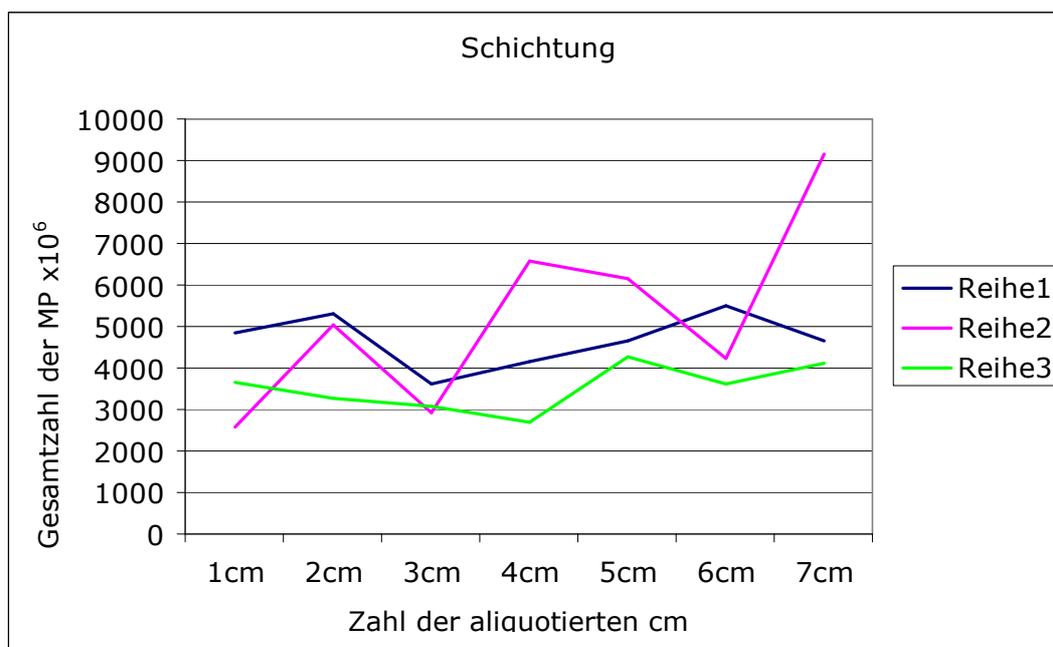


Abbildung 7: Schichtung. Bei 3 Probanden wurde das Blut cm für cm aliquotiert. Die Gesamtzahl der MP ist in den verschiedenen Plasmaschichten sehr unterschiedlich.

3.1.4 Unterschiede in der MP-Anzahl bei schockgefrorenen versus nichtschockgefrorenen Proben

Um mögliche Unterschiede in der MP-Anzahl bei schockgefrorenen und nicht schockgefrorenen Proben festzustellen, wurde hierzu bei drei Probanden von der gleichen Blutprobe ein Teil des Blutes schockgefroren und ein anderer Teil

nicht. Bei den Proben, bei denen kein Schockgefrieren stattfand, war die Gesamtzahl der MP geringer als bei den schockgefrorenen Proben des gleichen Probanden (vgl. Abbildung 8). Um eine Homogenisierung der Proben zu erreichen, wurden alle vor Lagerung bei -80°C schockgefroren.

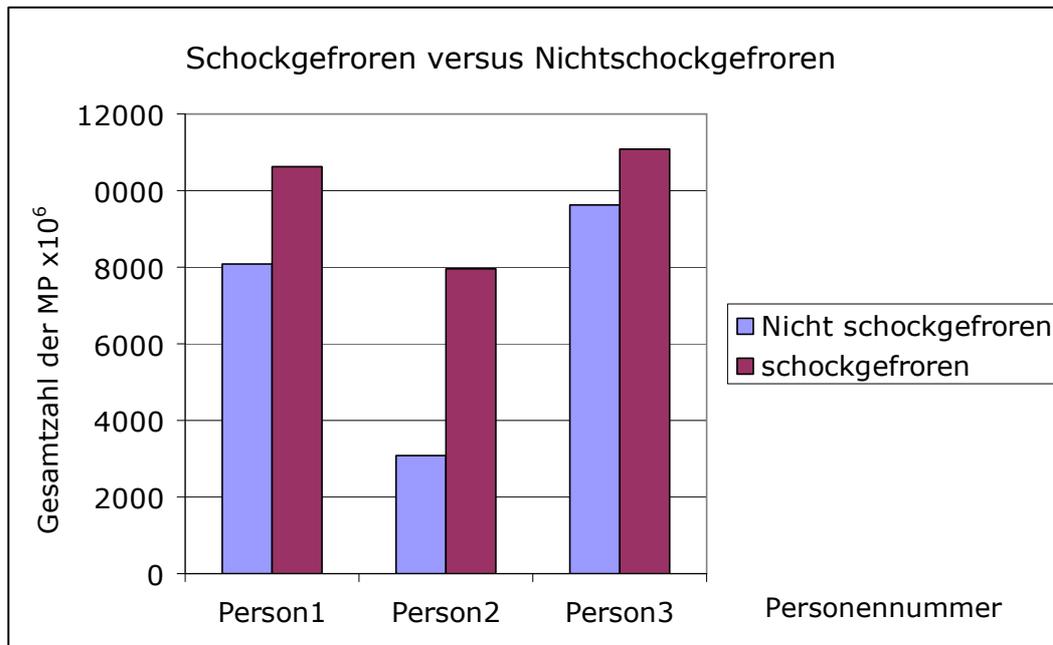


Abbildung 8: Schockgefroren versus Nichtschockgefroren. Bei 3 Probanden wurde ein Teil der gleichen Blutprobe schockgefroren und ein Teil nicht. Die Proben, die nicht schockgefroren wurden, haben eine geringere Gesamtzahl der MP als die schockgefrorenen Proben.

3.1.5 Stabilitätsmessungen der MP-Anzahl bei längerem Stehen der verarbeiteten Proben

Zur Detektion möglicher Veränderungen in der Gesamtzahl der MP nach längerem Stehen, führten wir bei 5 Probanden Stabilitätsmessungen durch. Die Messung im Durchflusszytometer erfolgte sofort nach Aufbereitung der Proben sowie nach 15 min, 30 min, 45 min und 60 min. Es zeigte sich, dass sich die Anzahl der MP bei allen 5 Probanden nach 60 min deutlich verringert hatte. Abbildung 9 stellt den Abfall der MP-Anzahl bei Proben, die sofort nach Aufbereitung sowie in 15 minütigen Abständen gemessen wurden, graphisch dar. Um diese Schwankungen in der MP-Anzahl durch längeres Stehen zu vermeiden, wurden alle Proben innerhalb von 15 min nach der Aufbereitung gemessen.

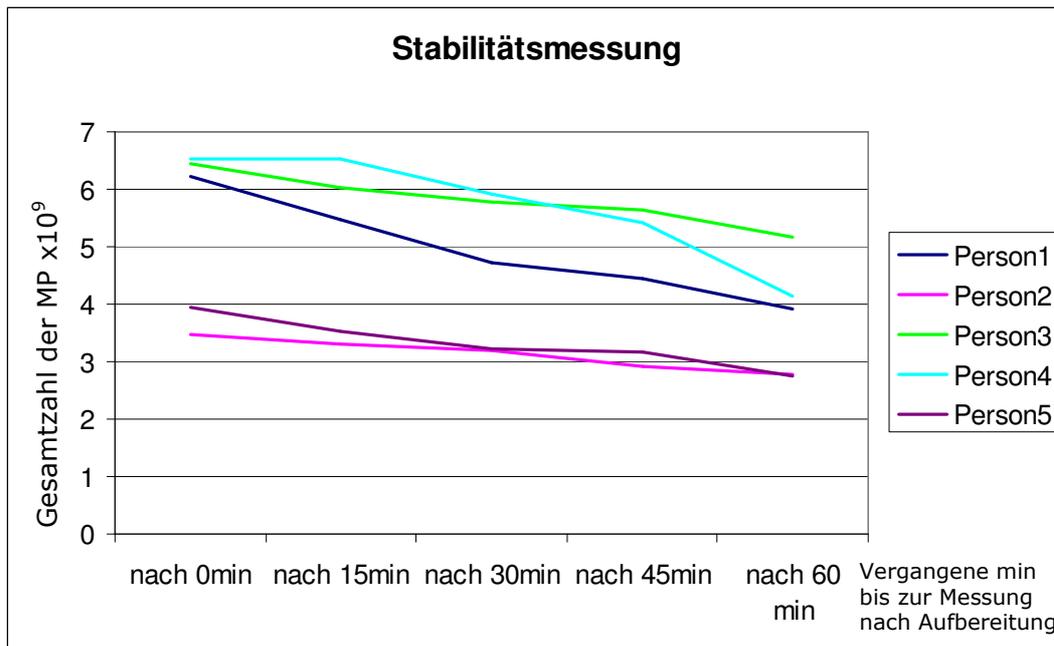


Abbildung 9: Stabilitätsmessung. Bei 5 Probanden wurden die Proben sofort nach Aufbereitung, nach 15 min, 30 min, 45 min und 60 min gemessen. Es zeigt sich eine deutliche Reduktion der Gesamtzahl der MP nach 60 min.

3.2 Mikropartikelanalyse

3.2.1 Probandencharakteristika

Das Durchschnittsalter der weiblichen Probanden betrug 26 ± 8.4 Jahre (Mittel \pm Standardabweichung) und bei den männlichen Probanden 29 ± 3.2 Jahre für die Untersuchung der geschlechts-spezifischen Unterschiede. Für die Untersuchung der menstruationszyklus-abhängigen Unterschiede belief sich das Durchschnittsalter der Frauen auf 31 Jahre. Bezüglich des Menstruationszyklus befanden sich 14 Frauen in der folliculären und 10 in der lutealen Phase. Die weiblichen Probanden zeigten eine höhere Anzahl an Thrombozyten auf als die männlichen. Zudem variierte die Thrombozytenanzahl während des Menstruationszyklus signifikant, wobei die höchsten Werte in der Lutealphase zu finden waren ($p=0.01$). Leukozyten wie auch Hämoglobin und D-Dimer änderten sich während des Menstruationszyklus nicht. Die Frauen zeigten signifikant höhere D-Dimer-Werte als die Männer

($p < 0.001$). Die Hämoglobin-Werte waren bei den Männern höher als bei den Frauen ($p < 0.001$). Tabelle 7 stellt die Probandencharakteristika tabellarisch dar.

Geschlecht	Frauen		p-Wert	Frauen	Männer	p-Wert
Menstruations-zyklus (Phase)	follikulär n=14	luteal n=10	follikulär versus luteal	(total)		Frauen versus Männer
Alter (Jahre)	29±8.4	33±8.6	p=0.2	31±8.6	29±3.2	p=0.99
Hämoglobin (g/dl)	13.7±0.9	13.8±1.2	p=1.0	13.7±0.9	15.7±0.9	p<0.001*
Leukozyten (g/l)	6.5±1.3	7.0±1.7	p=0.4	6.7±1.4	6.6±1.0	p=0.90
Plättchen (g/l)	247±50.2	314±63.6	p=0.01*	273±63.9	251±46.6	p=0.38
D-Dimer (µg/ml)	0.54±0.5	0.75±0.5	p=0.46	0.30±0.2	0.15±0.09	p<0.001*

Tabelle 7: Studienpopulation mit Charakteristika (Alter, Zyklusphase, Hämoglobin-, D-Dimer-, Plättchen- und Leukozytenkonzentration im Plasma). Daten präsentiert als mittlere Werte ±Standardabweichung. * p-Wert: $p < 0.05$ signifikant.

3.2.2 Annexin V-positive MP

Die Gesamtanzahl der Annexin V-positiven MP zeigte sich bei den Frauen ($5.1 \times 10^9/L \pm 2.3$) höher als bei den Männern ($3.7 \times 10^9/L \pm 2.3$; $p = 0.01$). Auch die Anzahl der Glykoprotein IIIa exponierenden PMP war bei den weiblichen Probanden signifikant höher ($3.7 \times 10^9/L \pm 2.3$) als bei den männlichen ($2.2 \times 10^9/L \pm 2.3$; $p = 0.07$). Die aktivierten P-Selektin-positiven PMP wiesen bei den Frauen statistisch höhere Level auf als bei den Männern ($0.05 \times 10^9/L \pm 0.06$ versus $0.02 \times 10^9/L \pm 0.02$; $p = 0.007$). Eine Expression von CD63-positiven MP als Indikator für eine hohe Plättchenaktivierung trat häufiger bei den weiblichen ($0.08 \times 10^9/L \pm 0.2$) als bei den männlichen ($0.05 \times 10^9/L \pm 0.6$; $p = 0.3$) Studienteilnehmern auf.

Abbildung 10 zeigt, dass -im Vergleich zu den Männern- die Anzahl der Annexin V-positiven MP bei den Frauen insgesamt erhöht war ($6.4 \times 10^9/L$ versus $3.5 \times 10^9/L$; $p=0.01$). Dieser Unterschied erwies sich noch ausgeprägter im Vergleich mit Frauen in der Lutealphase des Menstruationszyklus ($8.1 \times 10^9/L$; $p=0.001$). Denn die Anzahl der Annexin V-positiven MP war bei Frauen in der Lutealphase deutlich höher als bei Frauen in der Follikularphase ($4.7 \times 10^9/L$; $p=0.02$). Fast 80% der MP der Frauen waren thrombozytären Ursprungs (versus 67% bei den Männern), 15% waren endothelialer Herkunft (versus 16% bei den Männern).

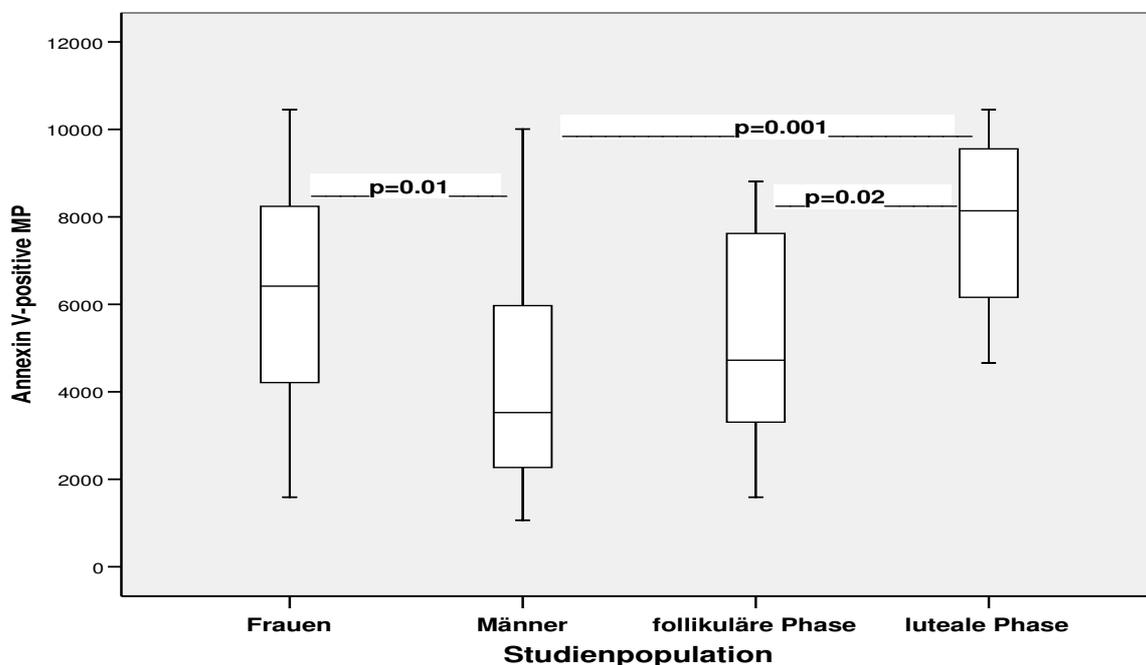


Abbildung 10: Geschlechts-spezifische (Frauen und Männer) und menstruationszyklus-abhängige (Follikel- und Lutealphase) Unterschiede in der Anzahl der Annexin V-positiven MP präsentiert als Median \pm Quartilenabstand; p-Wert: $p < 0.05$ ist signifikant.

3.2.3 CD61-positive MP

Bei den CD61-positiven PMP zeigte sich sowohl ein geschlechts-spezifischer als auch ein menstruationszyklus-abhängiger Unterschied (Abbildung 11). Frauen verzeichneten im Vergleich zu den Männern erhöhte PMP-Werte ($3.7 \times 10^9/L$ versus $2.3 \times 10^9/L$; $p=0.03$), allerdings wurden nur in der Lutealphase

signifikant höhere PMP-Werte im Vergleich zu den Männern gefunden ($p=0.001$).

Im Bezug auf den Menstruationszyklus war bei den Frauen in der Lutealphase eine höhere PMP-Anzahl als bei den Frauen in der Follikularphase zu finden ($6.0 \times 10^9/L$ versus $2.7 \times 10^9/L$; $p=0.001$).

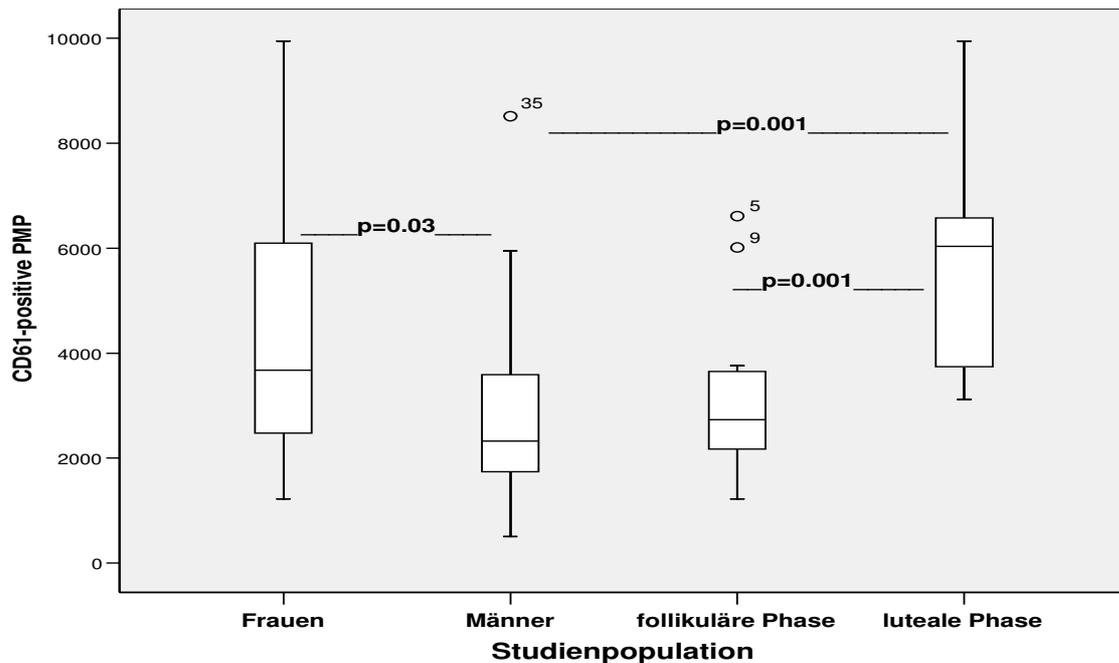


Abbildung 11: Geschlechts-spezifische (Frauen und Männer) und menstruationszyklus-abhängige (Follikel- und Lutealphase) Unterschiede in der Anzahl der CD61-positiven PMP; präsentiert als Median±Quartilenabstand; p-Wert: $p < 0.05$ ist signifikant. Probanden (durch Kreise markiert) mit einer MP-Anzahl oberhalb des Quartilenabstandes: 35 (männlicher Proband), 5 und 9 (weibliche Probanden in der folliculären Phase).

3.2.4 CD62P-positive und CD63-positive MP

P-Selektin-positive (Abbildung 12) oder CD63-positive (Abbildung 13) PMP wiesen bei den Frauen höhere Werte auf als bei den Männern, allerdings war der Unterschied nur bei den P-Selektin-positiven PMP signifikant ($0.06 \times 10^9/L$ versus $0.02 \times 10^9/L$; $p=0.003$).

Im Durchschnitt zeigten die P-Selektin-positiven PMP bei den Frauen zweifach höhere Werte als bei den Männern (1.6% versus 0.9% der gesamten PMP). Während der Anteil der PMP pro Plättchen bei Männern und Frauen fast signifikant unterschiedlich war (15.3×10^3 versus 8.9×10^3 , $p=0.057$), war der

Anteil der P-Selektin-positiven PMP pro Plättchen bei Frauen dreimal höher als bei Männern (0.24×10^3 versus 0.09×10^3 ; $p=0.004$). Bei den CD63-positiven PMP wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Frauen und Männern gefunden (2.7% versus 2.6%; 0.34×10^3 versus 0.25×10^3 , $p=0.2$). Jedoch zeigten sich wieder die höchsten Werte bei Frauen in der Lutealphase. In der Lutealphase ($0.2 \times 10^9/L$) wiesen die zirkulierenden P-Selektin-positiven PMP bei Frauen zehnfach höhere Level auf als bei den Männern ($p=0.01$) und viermal höhere Level verglichen mit den Frauen in der Follikularphase ($0.05 \times 10^9/L$; $p=0.08$). Bei den weiblichen Probanden in der Lutealphase war die Fraktion der P-Selektin-positiven PMP gegenüber der Gesamtzahl der PMP wie auch der Anteil der P-Selektin-positiven PMP pro Plättchen höher als bei Männern (3.3% versus 0.9%; 0.6×10^3 versus 0.09×10^3 ; $p=0.01$); Frauen in der Follikularphase verzeichneten tendenziell niedrigere Werte (1.8%; 0.17×10^3 ; $p=0.15$). Bezüglich der CD63-positiven PMP gab es Unterschiede zwischen Frauen in der Lutealphase, sowohl im Vergleich zu den Männern ($0.3 \times 10^9/L$ versus $0.06 \times 10^9/L$; $p=0.007$) als auch im Vergleich zu den Frauen in der Follikularphase ($0.08 \times 10^9/L$; $p=0.03$).

Ähnlich wie bei den P-Selektin-positiven PMP waren die Mengen an CD63-positiven PMP sowie der Anteil der CD63-positiven PMP pro Plättchen bei den Frauen in der Lutealphase höher als bei den Männern (5.0% versus 2.6%; 0.5×10^3 versus 0.4×10^3 ; $p=0.012$) und tendierten zu niedrigeren Werten in der Follikularphase (3.0%; 0.3×10^3 ; $p=0.1$).

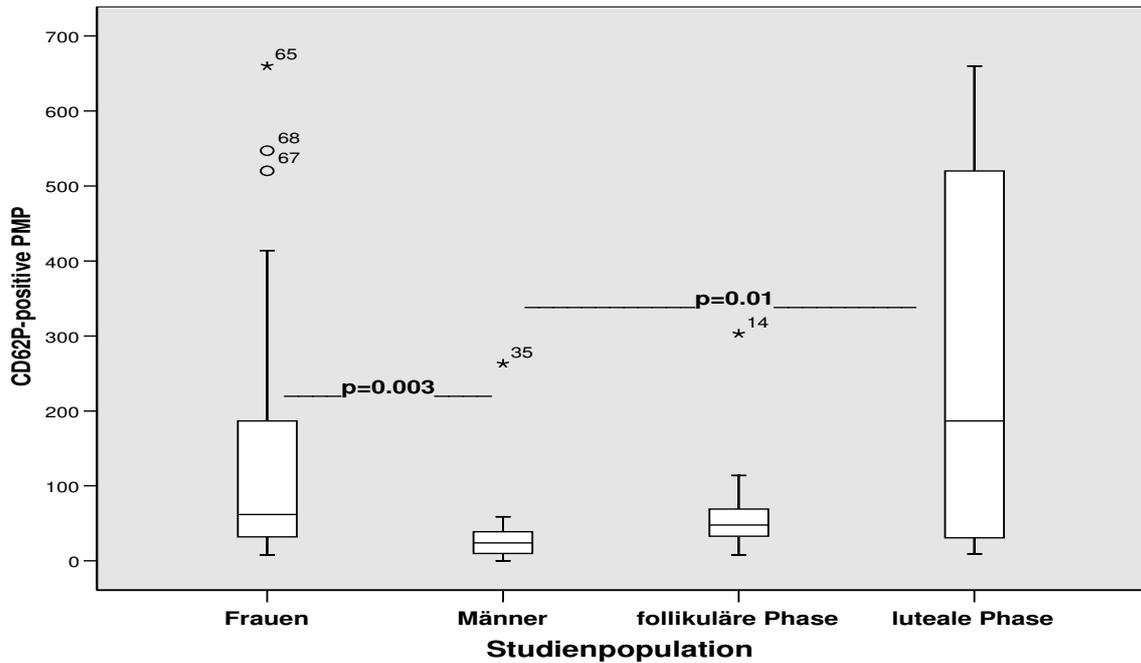


Abbildung 12: Geschlechts-spezifische (Frauen und Männer) und menstruationszyklus-abhängige (Follikel- und Lutealphase) Unterschiede in der Anzahl der CD62P-positiven PMP; präsentiert als Median± Quartilenabstand; p-Wert: $p < 0.05$ ist signifikant. Probanden (durch Kreise und Kreuze markiert) mit einer MP-Anzahl oberhalb des Quartilenabstandes: 35 (männlicher Proband), 65, 68 und 67 (weibliche Probanden), 14 (weibliche Probandin in der folliculären Phase).

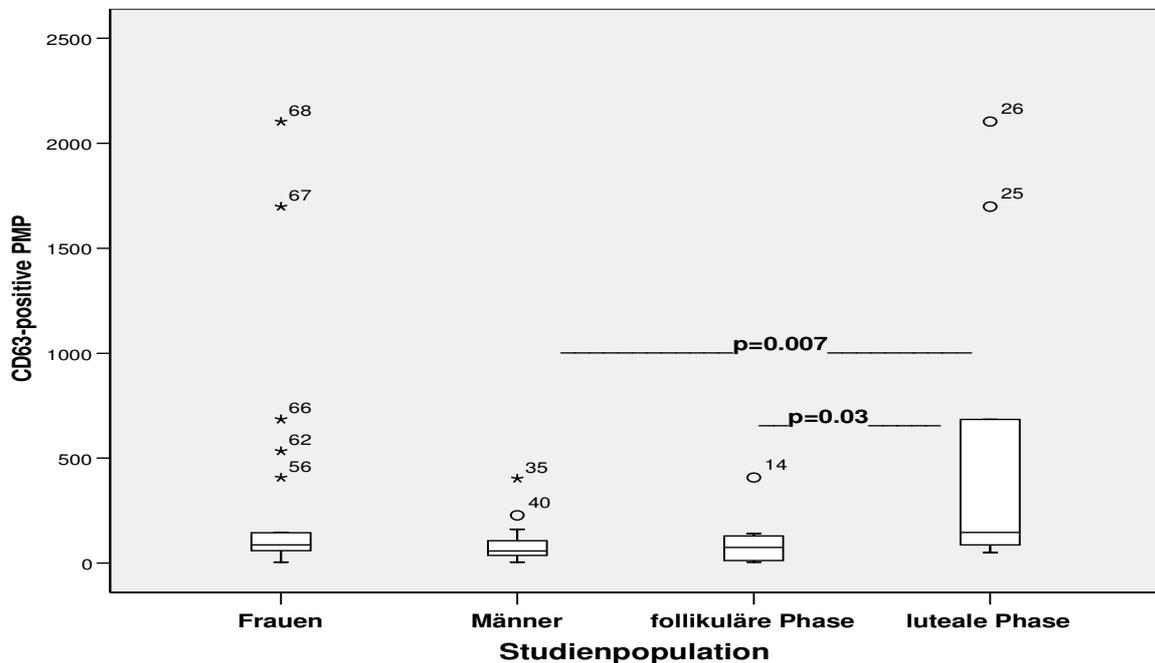


Abbildung 13: Geschlechts-spezifische (Frauen und Männer) und menstruationszyklus-abhängige (Follikel- und Lutealphase) Unterschiede in der Anzahl der CD63-positiven PMP; präsentiert als Median±Quartilenabstand; p-Wert: $p < 0.05$ ist signifikant. Probanden (durch Kreise und Kreuze markiert) mit einer MP-Anzahl oberhalb des Quartilenabstandes: 35 und 40 (männlichen Probanden), 56, 62, 66, 67 und 68 (weibliche Probanden) 14 (weiblicher Proband in der folliculären Phase), 25 und 26 (weibliche Probanden in der lutealen Phase).

3.2.5 Endotheliale Mikropartikel

Im Vergleich zu den PMP konnten bezüglich der Anzahl der zirkulierenden EMP kaum signifikante Unterschiede, weder geschlechts-spezifisch noch menstruationszyklus-abhängig, gefunden werden. Dennoch war die Anzahl der E-Selektin-positiven EMP (Abbildung 14), z.B. EMP von aktivierten Endothelzellen, bei den Frauen im Vergleich zu den Männern erhöht ($0.4 \times 10^9/L$ versus $0.2 \times 10^9/L$; $p=0.02$), und dies signifikant in der Lutealphase ($0.5 \times 10^9/L$; $p<0.001$). Die weiblichen Probanden wiesen höhere Werte an CD144-exponierenden EMP ($0.8 \times 10^9/L \pm 0.7$), verglichen mit den Werten der männlichen Probanden ($0.41 \times 10^9/L \pm 0.4$; $p=0.4$) auf (Abbildung 15).

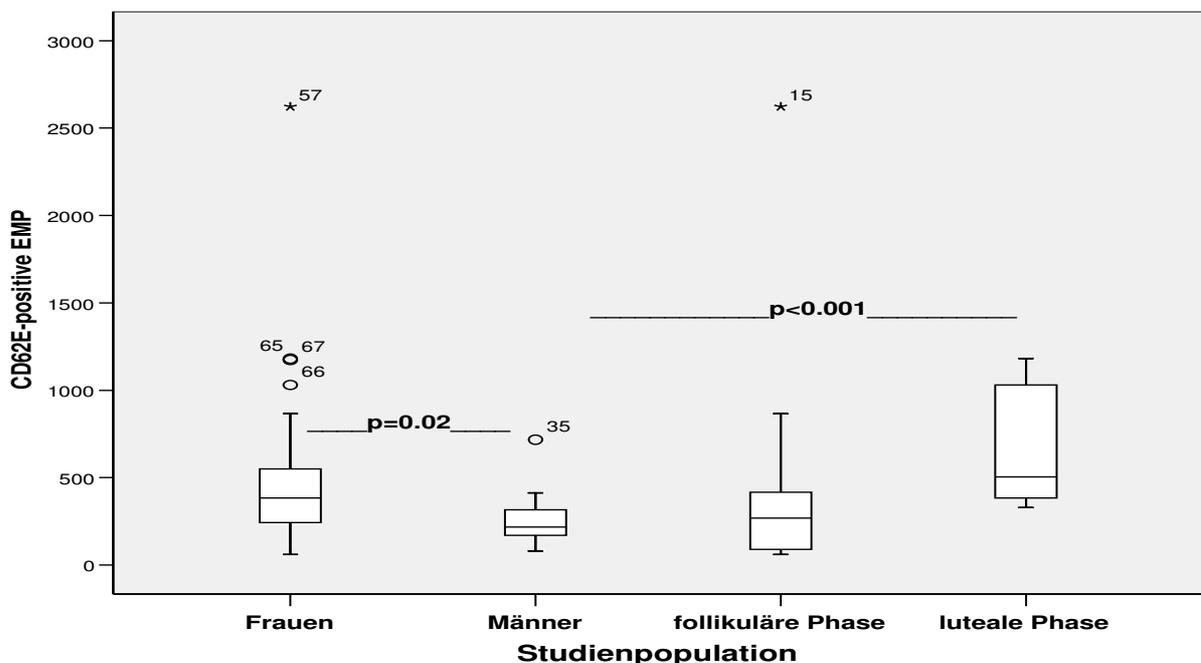


Abbildung 14: Geschlechts-spezifische (Frauen und Männer) und menstruationszyklus-abhängige (Follikel- und Lutealphase) Unterschiede in der Anzahl der CD62E-positiven EMP; präsentiert als Median \pm Quartilenabstand; p-Wert: $p<0.05$ ist signifikant. Probanden (durch Kreise und Kreuze markiert) mit einer MP-Anzahl oberhalb des Quartilenabstandes: 35 (männlicher Proband), 57,65,66 und 67 (weibliche Probanden), 15 (weibliche Probandin in der folliculären Phase).

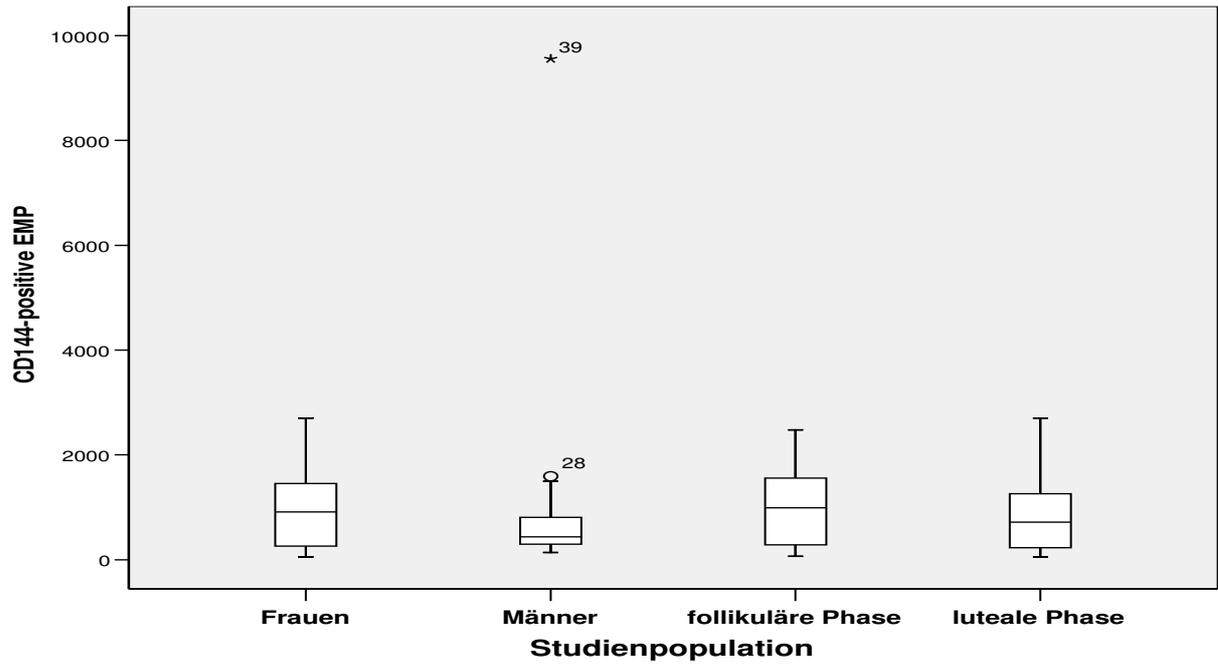


Abbildung 15: Geschlechts-spezifische (Frauen und Männer) und menstruationszyklus-abhängige (Follikel- und Lutealphase) Unterschiede in der Anzahl der CD144-positiven EMP; präsentiert als Median±Quartilenabstand; p-Wert: $p < 0.05$ ist signifikant. Probanden (durch Kreis und Kreuz markiert) mit einer MP-Anzahl oberhalb des Quartilenabstandes: 28 und 39 (männliche Probanden).

4 Diskussion

4.1 Grundlagenversuche zur Methode

4.1.1 Tagesquerschnitt- und Monatslängsschnittverläufe der MP- Anzahl

Im Tagesverlauf zeigten sich die höchsten MP-Werte morgens sowie abends. Michelsen et al. (76) beschrieben eine Erhöhung von PMP in der postprandialen Phase. Diese Zunahme der PMP lässt sich auf einen höheren Triglyceridspiegel im Plasma nach Nahrungsaufnahme zurückführen. Bei den Blutabnahmen für die Tagesquerschnittverläufe wurde nicht berücksichtigt, ob die Probanden nüchtern waren. Nach den kulturellen Essensgewohnheiten hierzulande ist es sehr wahrscheinlich, dass sich die Probanden um 8 Uhr morgens und 8 Uhr abends in einem postprandialen Zustand befanden. Möglicherweise könnte dies eine Erklärung für die höhere MP-Anzahl morgens und abends sein. Bei weiteren Untersuchungen sollte daher, um homogene Ergebnisse zu erzielen, auf einen nüchternen Status der Probanden geachtet werden.

Wie bereits erwähnt, beeinflussen weibliche Steroidhormone unterschiedliche Faktoren der plasmatischen Gerinnung sowie der Endothelzellfunktion, die mit einem erhöhten Thromboserisiko einhergehen (18,21,23,102). Während Östradiol und Progesteron einem monatszyklischen Rhythmus unterliegen, gibt es in geringerer Konzentration weibliche Steroidhormone, welche einem zirkadianem Rhythmus folgen. Östron ist ein schwach wirksames Östrogen, das postmenopausal an Wichtigkeit zunimmt (58). Wie bei vielen anderen Steroidhormonen der Nebennierenrinde, ist die Östronkonzentration am Morgen am höchsten. Möglicherweise hat ein hoher morgenlicher Östronspiegel einen Einfluss auf die MP-Anzahl. Inwiefern andere Steroidhormone Einfluss auf die MP-Bildung ausüben, ist sicherlich ein interessanter Punkt und bietet die Grundlage für weiterführende Untersuchungen. Bisher liegen keine Daten zum Tages- und Monatsverlauf von MP bei postmenopausalen Frauen vor. Möglicherweise könnten durch weiterführende MP-Analysen bei

postmenopausalen Frauen weitere Hinweise auf den Einfluss von Östron oder anderen Steroidhormonen auf die Expression von MP gewonnen werden.

Im intraindividuellen Vergleich der MP-Anzahl während der Zyklusphase der weiblichen Probanden konnte eine höhere Konzentration dieser MP in der Lutealphase festgestellt werden (vgl. Abbildung 4). Im Gegensatz zur Follikularphase, ist der Spiegel der weiblichen Steroidhormone (Östradiol, Progesteron), welche einen Einfluss auf die plasmatische Gerinnung und Endothelzellfunktion haben, in der Lutealphase höher. Des Weiteren führen auch erhöhte Level an MP im Serum zu einer Steigerung der Gerinnungsaktivität (121).

Es zeigt sich ein Zusammenhang zwischen der Erhöhung der MP und der Zunahme der Konzentration der weiblichen Steroidhormone in der Lutealphase des Menstruationszyklus. Der genaue pathophysiologische Mechanismus bezüglich der MP-Anzahl und der weiblichen Steroidhormone ist bisher noch nicht hinreichend geklärt. Möglicherweise liegt der Zusammenhang zwischen der MP-Anzahl und den weiblichen Steroidhormonen in nicht-transkriptionalen Prozessen begründet.

Auch gibt es keine Daten zu MP-Analysen, Tages- und Monatsverläufen von MP bei postmenopausalen Frauen oder prämenstruellen Mädchen. Interessant wäre die Frage, ob auch bei diesen beiden Gruppen, welche weitaus geringeren Schwankungen der weiblichen Steroidhormone unterliegen, zyklische Verläufe der MP-Anzahl vorzufinden sind. Die Tatsache, dass bei den gemessenen Männern nur geringe Schwankungen im Monatverlauf auftraten (vgl. Abbildung 5), festigt die Annahme eines Zusammenhangs zwischen weiblichen Steroidhormonen und der MP-Entstehung, da Männer wesentlich geringere Konzentrationen an Östradiol und Progesteron aufweisen als Frauen. Dennoch könnten MP-Analysen bei Kindern und postmenopausalen Frauen weitere interessante Hinweise für den Einfluss von Steroidhormonen auf die MP-Entstehung liefern.

4.1.2 Lagerung des entnommenen Blutes auf Eiswasser versus Lagerung bei Raumtemperatur

Vorversuche in unserem Labor konnten einen Hinweis darauf geben, dass entnommene Blutproben bis 15 min nach Abnahme verarbeitet werden sollten. Um dies genauer zu verifizieren, wurden direkt nach der Blutabnahme ein Teil der Proben auf Eiswasser und der andere Teil bei Raumtemperatur gelagert. MP entstehen durch Zellaktivierung und Apoptose (121). Bei Lagerung auf Eiswasser kam es zunächst zu einem raschen Anstieg der MP-Anzahl (vgl. Abbildung 6), der möglicherweise auf einen durch den Kältereiz ausgelösten Autoaktivierungsprozess der Blutzellen mit konsekutiver Erhöhung der MP-Anzahl zurückzuführen ist. Auch Apoptose der Zellen, durch Kältereize oder längeres Stehen verursacht, kann zu der Erhöhung der MP-Anzahl beitragen. Der anschließende Abfall der MP-Level könnte ein Hinweis auf ein phagozytär gesteuertes Geschehen sein.

Die Proben, welche bei Raumtemperatur gelagert wurden, zeigten zunächst einen Abfall der MP-Konzentration (vgl. Abbildung 6). Das Fehlen von einem akuten Reiz (Kälte) lässt bei raumtemperaturgelagerten Proben ein Überwiegen der phagozytären Prozesse mit konsekutivem Abfall der MP vermuten. Der daraufhin folgende langsame Anstieg der MP-Anzahl könnte für die Autoaktivierung der Blutzellen durch z.B. Stressstimuli bzw. für Apoptose sprechen.

4.1.3 Unterschiedliche Verteilung von MP in den verschiedenen Plasmaschichten im zentrifugierten Zitratröhrchen

Die unterschiedliche Verteilung der MP in den verschiedenen Plasmaschichten könnte durch die Zentrifugalkraft und die hydrostatischen Kräfte verursacht werden (vgl. Abbildung 7). Unter dem Elektronenmikroskop zeigen MP eine unterschiedliche Varianz in Dichte und Größe (proteinreiche und -arme Fraktionen) (57). Auch spielt die Entstehungsweise der MP (Zellaktivierung, Apoptose, Ursprungszelle) eine große Rolle bzgl. Größe und Proteinanteil der MP (121). Somit lässt sich die unterschiedliche Verteilung der MP in den

verschiedenen Schichten des Plasmas nach Zentrifugation möglicherweise auf eine starke interindividuelle Varianz an Größe und Dichte der MP zurückführen. Durch die einwirkenden Kräfte während des Zentrifugalvorgangs könnte es aufgrund der ungleichen Dichte und Größe der MP zu uneinheitlichen Verteilungen in den Plasmaschichten kommen.

4.1.4 Unterschiede in der MP-Anzahl bei schockgefrorenen versus nichtchockgefrorenen Proben

Zur Feststellung von Unterschieden bezüglich der MP-Anzahl wurden die einzelnen Proben jeweils schockgefroren bzw. langsam eingefroren. Bei den Proben, bei denen kein Schockgefrieren stattfand, war die Gesamtzahl der MP geringer als bei den schockgefrorenen Proben (vgl. Abbildung 8). Beim langsamen Einfrieren bildeten sich auf den Proben ausgeprägt Kristalle, die bei schockgefrorenen Proben nur in geringem Maße sichtbar waren. Die Kristallbildung in den nichtchockgefrorenen Proben kann die geringere MP-Gesamtzahl erklären, da sich MP an den Kristallen befestigen und somit bei der Messung mittels Durchflusszytometrie nicht erfasst werden können. Zudem könnte auch der intensive Kältereiz beim Schockgefrieren ausschlaggebend für mögliche Autoaktivierungsprozesse bzw. apoptotische Prozesse mit konsekutiver MP-Erhöhung beim Auftauen sein.

4.1.5 Stabilitätsmessungen der MP-Anzahl bei längerem Stehen der verarbeiteten Proben

Nach Verarbeitung der Proben wurden vor der Detektion mittels Durchflusszytometer Stabilitätsmessungen durchgeführt (nach 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min). Die Reduktion der Gesamtzahl der MP bei längerem Stehen lässt sich auf Phagozytose durch Makrophagen zurückführen. Die Erniedrigung der MP-Level innerhalb 1 Stunde erfolgte –wie in Abbildung 9– kontinuierlich und langsam. Es stehen keine massiven oder raschen Änderungen der MP-Anzahl im Vordergrund, wie z.B. bei dem Eiswasser-versus Raumtemperaturversuch (vgl. Kapitel 4.1.2). Da es sich bei den

Stabilitätsmessungen um Proben handelt, die aufbereitet wurden, könnte der kontinuierliche, langsame Verlauf auf nur geringe Autoaktivierungsaktivität hinweisen. Dies lässt sich am ehesten auf eine verminderte, durch Zentrifugation dezimierte Menge an MP-produzierenden Zellen zurückführen. Die langsame Verringerung der MP-Anzahl könnte durch eine mäßige Phagozytoseaktivität von nur wenig verbliebenen Makrophagen nach Zentrifugation erklärt werden.

4.2 Mikropartikelanalyse

Unsere Studie zeigt, dass es ausgeprägte geschlechts-spezifische sowie menstruationszyklus-abhängige Unterschiede in der Anzahl der zirkulierenden MP gibt. So besaßen Frauen im Vergleich zu alters-entsprechenden Männern höhere Werte an CD61- und P-Selektin-positiven PMP sowie an E-Selektin-positiven EMP. Bei den CD63-positiven PMP sowie bei den CD144-positiven EMP ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Geschlechtervergleich.

Die Datenlage zu geschlechts-spezifischen Unterschieden und deren Bedeutung in der Entwicklung einer venösen Thrombembolie ist sehr widersprüchlich (65,91,101,111). Anderson et al. (2) beschrieben eine höhere Inzidenz der venösen Thrombembolie bei Männern jeden Alters im Vergleich zu Frauen. Andere Studien konnten keine geschlechts-spezifischen Unterschiede in der Häufigkeit der venösen Thrombembolie nachweisen (73,101,125). Dennoch gibt es Hinweise auf eine bis zu dreifach höhere Inzidenz von venösen Thrombembolien bei Frauen im gebärfähigen Alter (unter 45 Jahren) im Vergleich zu altersentsprechenden Männern (89,108,127). Die bekannten Risikofaktoren für venöse Thrombembolien stehen alle im Zusammenhang mit dem Gerinnungssystem: hereditäre Thrombembolie wie die APC-Resistenz, die Prothrombin G20210A Mutation, ein Mangel an Antithrombin, an Protein C oder S sowie erworbene Thrombembolien wie zum Beispiel das Anti-Phospholipid-Syndrom (36) und nicht zuletzt Autoimmunerkrankungen, welche einen gerinnungs-fördernden Zustand begünstigen. Trotz all dieser bekannten

Risikofaktoren bleiben die Ursachen von 30% der venösen Thrombembolien ungeklärt (53,78).

Basierend auf unseren Ergebnissen könnten zirkulierende MP oder Subpopulationen einen prokoagulativen Status im Körper der Frauen fördern und zu einem erhöhten Risiko für venöse Thrombembolien führen. Besonders der Nachweis von erhöhten PMP-Subpopulationen in der Lutealphase, die Aktivitätsmarker wie P-Selektin oder GP55 auf der Oberfläche tragen, deuten auf eine Plättchenaktivierung hin. Somit bestätigen wir andere Studien, welche zeigten, dass eine stärkere Plättchenaktivität bei Frauen während der Schwangerschaft, bei Frauen unter oraler Kontrazeption (8,49,62,69,82,129) sowie in der Lutealphase nachweisbar ist (36,37,50).

Bisher fehlten noch Daten zu menstruationszyklus- und geschlechtsspezifischen Unterschieden bei der Freisetzung von MP. Bei beiden Geschlechtern ist eine erhöhte Plättchenaktivität mit der Entwicklung von vaskulären Thrombosen assoziiert. Die Anzahl der P-Selektin-positiven PMP waren in unserer Studie in der Lutealphase erhöht.

Die Daten von Hamad et al. (50) bestätigen unsere Ergebnisse bezüglich der höheren PMP-Anzahl bei Frauen in der Lutealphase im Vergleich zu Frauen in der Follikelphase. Frauen mit Präeklampsie haben ein gesteigertes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen im Laufe ihres Lebens. Um thrombogene Charakteristiken zu evaluieren, untersuchten Hamad et al. (50) die Konzentration zirkulierender MP und die Thrombingenerationszeit bei Frauen mit Präeklampsie in der Vorgeschichte und verglichen diese mit einer gesunden Kontrollgruppe. Die gesunde Kontrollgruppe wies weniger PMP auf als die Frauen mit Präeklampsie in der Anamnese. Sowohl in der Präeklampsiegruppe als auch in der Kontrollgruppe konnte eine erhöhte Anzahl an Annexin V-positiven MP und CD61-positiven PMP bei den Frauen während der Lutealphase nachgewiesen werden.

P-Selektin beeinflusst die Gerinnungsaktivierung auf verschiedene Weise: Erstens, P-Selektin bindet, entweder frei, auf aktivierten Thrombozyten oder auf MP, an monozytenexponiertes PSGL-1 und triggert so die Expression und Produktion von gerinnungs-förderndem TF, welcher anschließend auf MP freigesetzt wird (17,105). Derartige TF-positive Monozyten-MP treten sowohl in vitro als auch in vivo auf (45,86).

Zweitens, nach einer Plättchenaktivierung wird durch Kontakt zu einer adhäsiven Oberfläche, z.B. einer Wunde, P-Selektin exprimiert. P-Selektin spielt eine Rolle beim Einfangen von freiem TF aus dem Blutkreislauf (28). Drittens, es zeigte sich, dass TF-positive monozytäre MP mit P-Selektin positiven Thrombozyten durch Interaktion mit PSGL-1 fusionieren und so prokoagulativen TF auf die Plättchenoberfläche übertragen. Folglich könnte das Auftreten einer erhöhten Anzahl von P-Selektin-positiven PMP eine erhöhte Inzidenz für Thrombose bei Frauen reflektieren, besonders in der Lutealphase des Menstruationszyklus.

Erhöhte D-Dimer-Werte bei Frauen im Vergleich zu Männern lassen auf eine Gerinnungsaktivierung schließen. Ein Unterschied bezüglich der D-Dimer-Werte während des Menstruationszyklus war nicht festzustellen, was sich wahrscheinlich auf die relativ geringe Probandenanzahl in unserer Studie zurückführen lässt.

Faraday et al. (36) untersuchten bei gesunden weiblichen und männlichen Probanden die Fähigkeit von in vitro aktivierten Plättchen, Fibrinogen zu binden. Fibrinogen bindet an Integrin α IIB β 3 (GP IIB-IIIa), den Rezeptor, der verantwortlich für die Thrombozytenaktivierung ist. Die Untersucher beobachteten, dass nach einer standardisierten Plättchenaktivierung in vitro die Bindung von Fibrinogen an Thrombozyten bei Frauen signifikant höher war als bei Männern. Ferner ließ sich ein Zusammenhang zwischen der Fibrinogenbindungsfähigkeit und der Menstruationszyklusphase nachweisen. Die Bindungsfähigkeit von Fibrinogen war bei Frauen in der Lutealphase signifikant höher als bei Frauen in der Follikelphase. Da gezeigt wurde, dass

die Bindung von Fibrinogen an aktivierte GPIIb-IIIa erforderlich für die Bildung und Freisetzung von PMP ist (36), könnte man spekulieren, dass die Regulation dieses Integrins durch den Menstruationszyklus mit beeinflusst wird und so zu den erhöhten PMP-Werten bei Frauen führt, vor allem in der Lutealphase.

Das Endothel spielt eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität und Hämostase, da eine Dysfunktion der Endothelzellen bei der Pathogenese von Atherosklerose mitwirkt (67). Obwohl einige Studien geschlechts-spezifische Unterschiede bei der endothel-vermittelten Vasodilatation beschrieben (22,35,38,51,72,96,103), existieren bisher keine Untersuchungen zur menstruationszyklus-abhängigen und geschlechts-spezifischen EMP-Freisetzung.

Chirinos et al. (24) zeigten eine erhöhte EMP-Anzahl bei Patienten mit venöser Thrombembolie, womit sie vorausgegangene Untersuchungen stützen, welche die EMP-Freisetzung sowie die Bindung der EMP an Monozyten als Schlüsselerlebnisse der Thrombogenese deuten (23,41). Koga et al. (67) verifizierten das Auftreten von CD144-positiven EMP in humanem Plasma und zeigten, dass die Anzahl der CD144-positiven EMP im Plasma ein klinisch relevanter und quantitativer Marker für Endothelzellfunktion und Verletzung ist.

In dieser Studie fanden wir menstruationszyklus-abhängige und geschlechts-spezifische Unterschiede im Auftreten von endothelialen und thrombozytären MP, welche möglicherweise eine laufende Aktivierung der plasmatischen Gerinnung widerspiegeln.

Eventuell können weitere Analysen zu einem besseren Verständnis für die Entstehung von Thrombembolien und den Einfluss von weiblichen Steroidhormonen führen. Daher könnten Patienten mit erhöhten MP-Werten im klinischen Alltag detektiert werden und einer angemessenen antikoagulatorischen Therapie zugeführt werden. Da wir in unserer Untersuchung geschlecht-spezifische und menstruationszyklus-abhängige

Unterschiede in der MP-Expression darstellen konnten, ist es sinnvoll im klinischen Alltag bei MP-Analysen das Geschlecht und die Zyklusphase der Patienten miteinzubeziehen.

5 Zusammenfassung

Gerinnungsstörungen spielen bei vielen Erkrankungen eine maßgebliche Rolle. Mikropartikel sind kleinste Vesikel, die durch Stimulation von ihren Ursprungszellen (Thrombozyten, Leukozyten, Endothelzellen, Monozyten, etc.) freigesetzt werden und zur Gerinnungsaktivierung beitragen. Bei zahlreichen Erkrankungen wurden erhöhte MP-Level im Plasma festgestellt. Die Analyse der Subpopulationen der MP erlaubt einen Rückschluss auf die Aktivität des Gerinnungssystems. Grundsätzliche geschlechts-spezifische und menstruationszyklus-abhängige Unterschiede in der Expression von MP wurden bisher nicht untersucht.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass es einen Unterschied in der Anzahl der zirkulierenden MP bei jungen Frauen im Vergleich zu altersentsprechenden Männern gibt. Wir analysierten 41 Probanden (24 weibliche, 17 männliche). Die untersuchten Frauen wiesen im Vergleich zu den Männern erhöhte Werte von CD61-positiven und P-Selektin-positiven PMP sowie von CD62E-positiven EMP auf. Bezüglich der CD63-positiven PMP und der CD144-positiven EMP konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Auch haben wir menstruationszyklus-abhängige Unterschiede in der Expression von MP nachweisen können. So zeigten die untersuchten Frauen in der Lutealphase höher MP-Werte als die Frauen in der Follikelphase.

Unsere Daten zeigen, dass die Anzahl der zirkulierenden MP und deren Subpopulationen abhängig vom Geschlecht und vom Menstruationszyklus sind. Das Vorkommen dieser MP führt zu einem erhöhten Risiko für venöse Thrombembolien. Für ein besseres Verständnis der Pathophysiologie der venösen Thrombembolie sollten daher auch zelluläre Komponenten, z. B. zirkulierende MP, berücksichtigt werden.

Ergänzende Studien sind erforderlich, um einen Einblick in die Beteiligung der weiblichen Sexualsteroiden auf das Gerinnungssystem und die Entwicklung von venösen Thrombembolien zu gewinnen.

6 Literaturliste

1. Abid Hussein MN, Nieuwland R, Hau CM, Evers LM, Meesters EW, Sturk A. Cell-derived microparticles contain caspase 3 in vitro and in vivo. <i>J Thromb Haemost</i> 2005 May;3(5):888-896.
2. Anderson FA, Jr., Wheeler HB, Goldberg RJ, et al. A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT Study. <i>Arch Intern Med</i> 1991;151(5):933-8.
3. Ando M, Iwata A, Ozeki Y, Tsuchiya K, Akiba T, Nihei H. Circulating platelet-derived microparticles with procoagulant activity may be a potential cause of thrombosis in uremic patients. <i>Kidney Int</i> 2002;62(5):1757-63.
4. Andoh A, Tsujikawa T, Hata K, et al. Elevated circulating platelet-derived microparticles in patients with active inflammatory bowel disease. <i>Am J Gastroenterol</i> 2005;100(9):2042-8.
5. Andre P. P-Selectin in haemostasis. <i>Br J Haematol</i> 2004;126(3):298-306.
6. Arur S, Uche UE, Rezaul K, Fong M et al. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. <i>Dev Cell</i> 2003;4(4):587-598.
7. Bain B, Forster T. A sex difference in bleeding time. <i>Thromb Haemost.</i> 1980;43:131-2.
8. Bain BJ. Ethnic and sex differences in the total and differential white cell count and platelet count. <i>J Clin Pathol</i> 1996;49(8):664-6.
9. Basse F, Gaffet P, Bienvenue A. Correlation between inhibition of cytoskeleton proteolysis and antivesiculation effect of calpeptin during A23187-induced activation of human platelets: are vesicles shed by filopod fragmentation? <i>Biochim Biophys Acta</i> 1994;1190(2):217-224.
10. Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. <i>Thromb Haemost</i> 2001;85(4):639-46.
11. Berckmans RJ, Nieuwland R, Tak PP, et al. Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. <i>Arthritis Rheum</i> 2002;46(11):2857-66.
12. Berckmans, R.J., et al. Synovial microparticles from arthritic patients modulate chemokine and cytokine release by synoviocytes. <i>Arthritis Res Ther</i> , 2005. 7(3): p. R536-44.

13. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Fierro C, et al. Endothelial microparticles correlate with high risk angiographic lesions in acute coronary syndromes. <i>Int J Cardiol</i> 2004;97(3):439-46.
14. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. Identification of an inducible endothelial-leucocyte adhesion molecule. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 1987;84:9238.
15. Biro E, Akkerman JW, Hoek FJ, et al. The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. <i>J Thromb Haemost</i> 2005;3(12):2754-63.
16. Biro E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, et al. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. <i>J Thromb Haemost</i> 2003;1(12):2561-8.
17. Bona R, Lee E, Rickles F. Tissue factor apoprotein: intracellular transport and expression in shed membrane vesicles. <i>Thromb Res</i> 1987;48(4):487-500.
18. Brenner, B. Haemostatic changes in pregnancy. <i>Thromb Res</i> , 2004. 114(5-6): p. 409-14.
19. Bretelle F, Sabatier F, Desprez D, Camoin L, Grunebaum L, Combes V, D'Ercole C, Dignat-George F. Circulating microparticles: a marker of procoagulant state in normal pregnancy complicated by preeclampsia or intrauterine growth restriction. <i>Thromb Haemost</i> 2003;89:486-92.
20. Brogan PA, Dillon MJ. Endothelial microparticles and the diagnosis of the vasculitides. <i>Intern Med</i> 2004;43(12):1115-9.
21. Cambien, B et al. A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. <i>Trends Mol Med</i> , 2004. 10(4):179-86.
22. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. <i>J Am Coll Cardiol</i> 1994;24(2):471-6.
23. Celi, A, Lorenzet R, Furie BC, Furie B. Microparticles and a P-selectin-mediated pathway of blood coagulation. <i>Dis Markers</i> , 2004. 20(6):347-52.
24. Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, et al. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leucocyte activation in patients with venous thromboembolism. <i>J Am Coll Cardiol</i> 2005;45(9):1467-71.

25. Choudhury A, Chung I, Blann AD, Lip GYH. Elevated platelet microparticle levels in nonvalvular atrial fibrillation: relationship to P-Selectin and antithrombotic therapy. <i>Chest</i> 2007;131:809-815.
26. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, et al. Membrane blebbing during apoptosis result from caspase-mediated activation of ROCK I. <i>Nat Cell Biol</i> 2001;3(4):339-345.
27. Combes V, Simon AC, Grau GE, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patient with lupus anticoagulant. <i>J Clin Invest</i> 1999;104(1):93-102.
28. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. <i>Blood</i> 2005;106(5):1604-11.
29. Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JWA, Radder JK. Elevated Numbers of Tissue-factor Exposing Microparticles Correlate With Components of the Metabolic Syndrome in Uncomplicated Type 2 Diabetes Mellitus. <i>Circulation</i> 2002;106:2442-47.
30. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. <i>Thromb Haemost</i> 2004;91(4):667-73.
31. Doring, A et al. Third generation oral contraceptive use and cardiovascular risk factors. <i>Atherosclerosis</i> , 2004. 172(2):281-6.
32. Dvorak HF, van de Water L, Dvorak AM, Anderson D, Bitzer AM, Harvey VS, Bach R, Davis GL, deWolf W, Carvalho AC. Procoagulant activity associated with plasma membrane vesicles shed by cultured tumor cells. <i>Cancer Res</i> 1983;43:4434-42.
33. Eilertsen K.E, Osterud B. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. <i>Blood Coagul Fibrinolysis</i> , 2004. 15(7):521-38.
34. Engelmann B, Luther T, Muller I. Intravascular tissue factor pathway-a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel. <i>Thromb Haemost</i> , 2003. 89(1):3-8.
35. English JL, Jacobs LO, Green G, Andrews TC. Effect of the menstrual cycle on endothelium-dependent vasodilation of the brachial artery in normal young women. <i>Am J Cardiol</i> 1998;82(2):256-8.
36. Faraday N, Goldschmidt-Clermont PJ, Bray PF. Gender differences in platelet GPIIb-IIIa activation. <i>Thromb Haemost</i> 1997 Apr;77(4):748-54.

37. Feuring M, Christ M, Roell A, et al. Alterations in platelet function during the ovarian cycle. <i>Blood Coagul Fibrinolysis</i> 2002;13(5):443-7.
38. Forte P, Kneale BJ, Milne E, et al. Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. <i>Hypertension</i> 1998;32(4):730-4.
39. Fox JE, Austin CD, Boyles JK, Steffen PK. Role of membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane. <i>J Cell Biol</i> 1990;111(2):483-493.
40. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 1995 Aug 1;92(16):7450-4.
41. Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. <i>Trends Mol Med</i> 2004;10(4):171-8.
42. Garcia S, Chirinos J, Jimenez J, Munoz F, Canoniero M, Jy W, Jimenez J, Horstmann L, Ahn Y. Phenotypic assessment of endothelial microparticles in patients with heart failure and after heart transplantation: switch from cell activation to apoptosis. <i>J Heart Lung Transplant</i> 2005;24:2184-89.
43. George JN, Thoi LL, McManus LM, et al. Isolation of human platelets membrane microparticles from plasma and serum. <i>Blood</i> 1982;60:834-840.
44. Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking Ca ²⁺ signalling to membrane dynamics. <i>Nat Rev Mol Cell Biol</i> 2005;6(6):449-461.
45. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 1999;96(5):2311-5.
46. Gilbert GE, Sims PJ, Wiedmer T, Furie B, Furie BC, Shattil SJ. Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII. <i>J Biol Chem</i> 1991;266(26):17261-8.
47. Gonzalez-Quintero VH, Jimenez JJ, Jy W, et al. Elevated plasma endothelial microparticles in preeclampsia. <i>Am J Obstet Gynecol</i> 2003;189(2):589-93.
48. Gonzalez-Quintero VH, Smarkursky LP, Jimenez JJ, et al. Elevated plasma endothelial microparticles: preeclampsia versus gestational hypertension. <i>Am J Obstet Gynecol</i> 2004;191(4): 1418-24.
49. Gorton HJ, Warren ER, Simpson NA, Lyons GR, Columb MO. Thromboelastography identifies sex-related differences in coagulation. <i>Anesth Analg</i> 2000;91(5):1279-81.

50. Hamad RR. et al. Increased thrombin generation in women with a history of pre-eclampsia. <i>Thrombosis Research</i> 2008.
51. Hashimoto M, Akishita M, Eto M, et al. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. <i>Circulation</i> 1995;92(12):3431-5.
52. Heller RF, Jacobs HS. Coronary heart disease in relation to age, sex and the menopause. <i>Br Med J</i> 1978;1:472-4.
53. Hiller E. Cancer and thrombosis: managing the risks and approaches to thromboprophylaxis. <i>Onkologie</i> 2006;29(10):474-8.
54. Hofman M, Monroe DM, Roberts HR. Coagulation factor IXa binding to activated platelets and platelet-derived microparticles: a flow cytometric study. <i>Throm Haemost</i> 1992;68(1):74-8.
55. Holme PA, Brosstad F, Solum NO. Platelet-derived microvesicles and activated platelets express factor Xa activity. <i>Blood Coagul Fibrinolysis</i> 1995;6(4):302-10.
56. Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. <i>Crit Rev Oncol Hematol</i> 1999;30(2):111-42.
57. Horstmann LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. <i>Keio J Med</i> 2004;53(4):210-30.
58. Hübl W. Östron aus www.med4you.at/laborbefunde/lbef3/lbef_oestron_estron.htm
59. Iwamoto S, Kawasaki T, Kambayashi J, Ariyoshi H, Monden M. Platelet microparticles: a carrier of platelet-activating factor? <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 1996;218(3):940-4.
60. Jeffry B, David WL, Glaci LM, Patricia S, Jonathan DE, Sharon LB, Wendy SK. Sex differences in platelets adherence subendothelium: Relationship to platelet function tests and hematologic variables. <i>Am J Med Sci</i> 1995;309(4):201-207.
61. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Ahn YS. Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease. <i>Br J Haematol</i> 2001;112(1):81-90.
62. Johnson M, Ramey E, Ramwell PW. Sex and age differences in human platelet aggregation. <i>Nature</i> 1975;253(5490):355-7.

63. Kaptan K, Beyan C, Ifran A, Pekel A. Platelet-derived microparticle levels in women with recurrent spontaneous abortion. <i>Int J Gynecol Obstet</i> 2008;102:271-274.
64. Kim HK, Song KS, Park YS, et al. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. <i>Eur J Cancer</i> 2003;39(2):184-91.
65. Kniffin Jr WD, Baron JA, Barrett J, Birkmeyer JD, Anderson Jr FA. The epidemiology of diagnosed pulmonary embolism and deep venous thrombosis in the elderly. <i>Arch Intern Med</i> 1994;154:861-6.
66. Knijff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, van de Laar MA. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. <i>Arthritis Rheum</i> 2002;46(6):1498-503.
67. Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, et al. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. <i>J Am Coll Cardiol</i> 2005;45(10):1622-30.
68. Laude I, Rongieres-Bertrand C, Boyer-Neumann C, et al. Circulating procoagulant microparticles in women with unexplained pregnancy loss: a new insight. <i>Thromb Haemost</i> 2001;85(1):18-21.
69. Lawrence JB, Leifer DW, Moura GL, et al. Sex differences in platelet adherence to subendothelium: relationship to platelet function tests and hematologic variables. <i>Am J Med Sci</i> 1995;309(4):201-7.
70. Lawrence MB, Springer TA. Neutrophils roll on E-Selectin. <i>J Immunol</i> 1993;151:6339.
71. Lerner DJ, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26 year follow up of the Framingham population. <i>Am Heart J</i> 1986;111:383-90.
72. Majmudar NG, Robson SC, Ford GA. Effects of the menopause, gender, and estrogen replacement therapy on vascular nitric oxide activity. <i>J Clin Endocrinol Metab</i> 2000;85(4):1577-83.
73. Martinelli I. Thromboembolism in women. <i>Semin Thromb Hemost</i> 2006;32(7):709-15.
74. Martinez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. <i>AJP-Heart</i> 2005;288:1004-9.

75. Mc Ever RP, Moore KL, Cummings RD. Leucocyte trafficking mediated by selection-carbohydrate interactions. <i>J Biol Chem</i> 1995 12;270(19):11025-8.
76. Michelsen AE, Noto AT, Brodin E, Mathiesen EB, Brosstad F, Hansen JB. Elevated level of platelet microparticles in carotid atherosclerosis and during postprandial state. <i>Thromb Res</i> 2009;123:881-886.
77. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger III AL, Furman MI. Evaluation of platelet function by flow cytometry. <i>Methods</i> 2000;21(3):259-70.
78. Michota F. Venous thromboembolism: epidemiology, characteristics, and consequences. <i>Clin Cornerstone</i> 2005;7(4):8-15.
79. Minagar A, Jy W, Jimenez JJ, et al. Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. <i>Neurology</i> 2001;56(10):1319-24.
80. Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, et al. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. <i>Blood</i> 1996;88(9):3456-3464.
81. Miyoshi H, Umeshita K, Sakon M, et al. Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxid-induced rat hepatocyte injury. <i>Gastroenterology</i> 1996;110(6):1897-1904.
82. Monte S, Lyons G. In vitro evidence of gender-related heparin resistance. <i>Int J Obstet Anesth</i> 2004;13(2):91-4.
83. Mukherjee, T.K., P.R. Reynolds, and J.R. Hoidal, Differential effect of estrogen receptor alpha and beta agonists on the receptor for advanced glycation end product expression in human microvascular endothelial cells. <i>Biochim Biophys Acta</i> , 2005.
84. Muller I, Klocke A, Alex M, et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. <i>FASEB J</i> 2003;17:476-478.
85. Nebe CT. Durchflußzytometrische Meßtechnik und Datenauswertung, <i>Infusionsth Transfusionsmed</i> 1996;23:111-113.
86. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. <i>Blood</i> 2000;95(3):930-5.
87. Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, et al. Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. <i>Circulation</i> 1997;96(10):3534-3541.

88. Nieuwland R. Cellular origin of microparticles exposing tissue factor in cancer: a mixed double? <i>J Thromb Haemost</i> 2008;6:1514-1516.
89. Nikol S, Middendorf K. [Risk of thrombembolism and arteriosclerosis in women]. <i>Z Kardiol</i> 2002;91(7): 523-35.
90. Nishikata H, Oliver C, Mergenhagen SE, Siraganian RP. The rat mast cell antigen AD1 (homologue to human CD63 or melanoma antigen ME491) is expressed in other cells in culture. <i>J Immunol</i> 1992 Aug;149(3):862-870.
91. Nordström M, Lindblad B, Bergquist D, Kjellström T. A prospective study of incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population. <i>J Int Med</i> 1992;232:155-160.
92. O'Brien JR. The bleeding time in normal and abnormal subjects. <i>J Clin Pathol</i> 1951;4:272-85.
93. O'Brien, P.A., The third generation oral contraceptive controversy. The evidence shows they are less safe than second generation pills. <i>Bmj</i> , 1999. 319(7213): p. 795-6.
94. Ogata N, Imaizumi M, Nomura S, et al. Increased levels of platelet-derived microparticles in patients with diabetic retinopathy. <i>Diabetes Res Clin Pract</i> 2005;68(3):193-201.
95. Pepper H, Lindsay S. Level of eosinophils, platelets, leukocytes and 17 hydroxycorticosteroids during normal menstrual cycle. <i>Proc Soc Exp Biol Med</i> 1960 May;104:145-147.
96. Perregaux D, Chaudhuri A, Mohanty P, et al. Effect of gender differences and estrogen replacement therapy on vascular reactivity. <i>Metabolism</i> 1999;48(2):227-32.
97. Pihusch V, Rank A, Steber R, et al. Endothelial cell-derived microparticles in allogenic hematopoietic stem cell recipients. <i>Transplantation</i> 2006;81(10):1405-1409.
98. Podor TJ, Singh D, et al. Vimentin exposed on activated platelets and platelet microparticles localizes vitronectin and plasminogen activator inhibitor complexes on their surface. <i>J Biol Chem</i> 2002;277:7529-7539.
99. Prossnitz ER, Ye RD. The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. <i>Pharmacol Ther</i> 1997;74(1):73-102.
100. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. <i>Lancet</i> 1995;346:113-134.

101. Romero A, Alonso C, Rincon M et al. Risk of venous thrombembolic disease in women A qualitative systematic review. <i>Eur J Obstet Gynaecol Repr Biol.</i> 121(2005):8-17.
102. Rosing J, Mechanisms of OC related thrombosis. <i>Thromb Res</i> , 2005. 115 Suppl 1:81-3.
103. Rosselli M, Imthurm B, Macas E, Keller PJ, Dubey RK. Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for estradiol mediated NO release. <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 1994;202(3):1543-52.
104. Salomon O, Katz BZ, Dardik R, Livnat T, Steinberg DM, Seligsohn U. Plasma levels of microparticles at 24 weeks of gestation do not predict subsequent pregnancy complications. <i>Fertil Steril</i> 2008.
105. Satta N, Toti F, Feugeas O, et al. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. <i>J Immunol</i> 1994;153(7):3245-55.
106. Schreiber M, Differding J, Thorborg P, Mayberry J, Mullins R. Hypercoagulability is more prevalent early after injury and in female patient. <i>J Trauma</i> 2005; 58:475-481.
107. Schwertz DW, Penckofer S. Sex differences and the effects of sex hormones on hemostasis and vascular reactivity. <i>Heart Lung</i> 2001 Nov-Dec;30(6):4010-4026.
108. Silverstein MD, Heit JA, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ, 3rd. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. <i>Arch Intern Med</i> 1998;158(6):585-93.
109. Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor V and express prothrombinase activity. <i>J Biol Chem</i> 1988;263(34):18205-12.
110. Sincock PM, Mayrhofer G, Ashman LK. Localisation of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) member PETA-3 (CD151) in normal human tissues: comparison with CD9, CD63 and alpha5beta1 integrin. <i>J Histochem Cytochem</i> 1997 Apr;45(4):515-525.
111. Spencer FA, Emery C, Lessard D, et al. The Worcester Venous Thromboembolism study: a population-based study of the clinical epidemiology of venous thromboembolism. <i>J Gen Intern Med</i> 2006;21(7):722-7.

112. Stein PD, Hsiu-ling H, Afzal A, Noor H. Incidence of acute pulmonary embolism in a general hospital: relation to age, sex and race. <i>Chest</i> 1999;116:909-913.
113. Steppich B, Mattisek C, Sobcczyk D, Kastrati A, Schomig A, Ott I. Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. <i>Thromb Haemost</i> 2005;93(1):35-9.
114. Toth B, Liebhardt S, Steinig K, Ditsch N, Rank A, Bauerfeind I, Spannagl M, Friese K, Reininger AJ. Platelet-derived microparticles and coagulation activation in breast cancer patients. <i>Thromb Haemost</i> 2008; 100: 663–669.
115. Turksoy RN, Phillips LL, Southam AL. Influence of ovarian function on the fibrinolytic enzyme system. I. Ovulatory and anovulatory cycles. <i>Am J Obstet Gynaecol</i> 1961 Dec;82:1211-5.
116. van der Zee PM, Biro E, Ko Y, et al. P-Selectin- and CD63- exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. <i>Clin Chem</i> 2006.
117. Van Duinen SG, Mauw BJ, de Graaft-Reitsma CB, Ruitter DJ. Methods in laboratory investigation. Immunoelectron microscopic methods for demonstration of antigens on normal human melanocytes and other epidermal cells. <i>Lab Invest</i> 1984 Jun;50(6):733-741.
118. Van Wijk M, Nieuwland R, Boer K, Van der Post JAM, et al. Microparticle subpopulations are increased in preeclamsia: Possible involvement in vascular dysfunction? <i>Am J Obstet Gynecol</i> 2002;187:450-6.
119. Vandenbroucke JP, et al. Third-generation oral contraceptive and deep venous thrombosis: from epidemiologic controversy to new insight in coagulation. <i>Am J Obstet Gynecol</i> , 1997. 177(4):887-91.
120. VanWijk M, Boer K, Berckmans RJ, Meijers JCM, Van der Post JAM, Sturk A, VanBavel E, Nieuwland R. Enhanced Coagulation Activation in Preeclamsia: Role of APC Resistance, Microparticles and other Plasma Constituents. <i>Thromb Haemost</i> 2002;88:415-20.
121. VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. <i>Cardiovasc Res</i> 2003;59(2):277-87.
122. Varki A. Selectin ligands. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 1994 Aug 2;91(16):7390-7.
123. Villmow TM. Thrombozytenaktivierung und Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion bei Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen. Inaugural-dissertation im Fachbereich Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität 2003.

124. Wang X, Campos B, Kaetzel MA, Dedman JR. Annexin V is critical in the maintenance of murine placental integrity. <i>Am J Obstet Gynecol</i> 1999 Apr;45(10):1622-30.
125. White RH, Zhou H, Murin S, Harvey D. Effect of ethnicity and gender on the incidence of venous thromboembolism in a diverse population in California in 1996. <i>Thromb Haemost</i> 2005;93(2):298-305.
126. Wiedmer T, Sims PJ. Participation of protein kinases in complement c5b-9-induced shedding of platelet plasma membrane vesicles. <i>Blood</i> 1991;78(11):2880-2886.
127. Winkler UH. [Thrombophilia and antithrombotic prevention in gynecology and obstetrics]. <i>Internist (Berl)</i> 1997;38(7):650-7.
128. Wolf, P. The nature and significance of platelets products in human plasma. <i>Br J Haematol</i> 1967;13;269-88.
129. Yamazaki H, Motomiya T, Kikutani N, et al. Platelet aggregation during menstrual cycle and pregnancy. <i>Thromb Res</i> 1979;14(2-3):333-40.
130. Yano Y, Kambayashi J, Shiba E, et al. The role of protein phosphorylation of cytoskeletal reorganization in microparticle formation from the platelet plasma membrane. <i>Biochem J</i> 1994;299(Pt1):303-308.
131. Zahavi J, Dreyfuss F, Kalef M, Soferman N. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation in healthy women with and without a combined and sequential contraceptive pill. <i>Am J Obstet Gynecol</i> 1973;117(1):107-13.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in

Gender-specific and menstrual cycle dependent differences in circulating microparticles.

Bettina Toth, Katharina Nikolajek, Andreas Rank, Rienk Nieuwland, Peter Lohse, Verena Pihusch, Klaus Friese and Christian J. Thaler.

Platelets November 2007.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	15.09.1978
Geburtsort	München
Eltern	Dr. phil. Ruth Nikolajek, Dr. med. Wolfgang Nikolajek
Religion	römisch-katholisch
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildungsdaten

Seit Juni 2006	Assistenzärztin im Fach Strahlentherapie im Klinikum der LMU- München
Oktober 2005	III. Staatsexamen
August 2004	II. Staatsexamen
Januar 2006	Promotionsarbeit in der Frauenklinik (Vorstand Prof. Dr.K. Friese) unter der Leitung von Frau PD Dr. Bettina Toth
August 2002	I. Staatsexamen
August 2001	Physikum
November 1999	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der LMU München
Juni 1997	Allgemeine Hochschulreife
1988	9-jährige Schulausbildung am Klenzegymnasium und am Gymnasium der armen Schulschwestern am Anger, München
1984	4-jährige Schulausbildung an der Grundschule Schillerschule, Aalen und der Grundschule am Gotzinger Platz, München

Danksagung

Frau PD Dr. Toth danke ich für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Sie stand mir für meine Fragen immer geduldig zur Verfügung. Ich danke ihr für ihre konstruktiven Hinweise.

Des Weiteren danke ich Frau Meike Kern, Frau Marianne Fileki und dem ganzen Team des Frauenforschungslabors in Großhadern für die Unterstützung und die geduldige Einarbeitung.

Ich danke allen freiwilligen Probanden, die sich so zahlreich und hilfsbereit zur Verfügung gestellt haben.

Für die stetige Unterstützung und Hilfe möchte ich auch meinen Eltern, meiner Schwester Verena und den zahlreichen Freunden, die mir in EDV-Fragen, Korrektur und Motivation eine ständige Hilfe waren, insbesondere Frau Uta Krämer, Frau Gabriele Leitmeier, Frau Dr. Julia Mangel, ganz herzlich danken.

