

Technische Universität München  
Fakultät für Medizin

**Untersuchung der in-vitro-  
Thrombozytenfunktion beim Hämodialyse -  
Patienten**

Vera Bonell

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades  
einer Doktorin der Medizin genehmigten Dissertation.

**Vorsitz:** Prof. Dr. Florian Eyer

**Prüfer\*innen der Dissertation:**

2. apl. Prof. Dr. Christoph Schmaderer
3. Priv.-Doz. Dr. Thorsten Kessler

Die Dissertation wurde am 08.04.2022 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.10.2022  
angenommen.

*Meiner Mutter Margit Bonell gewidmet.*

*Doch Forschung strebt und ringt, ermüdend nie,  
Nach dem Gesetz, dem Grund, Warum und Wie.*

*Johann Wolfgang von Goethe (1749 – 1832)*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Rationale der Studie.....	1
1.2 Dialyse.....	2
1.2.1 Hintergrund der Dialyse und Probleme des extrakorporalen Kreislaufs.....	2
1.3 Thrombozyten.....	3
1.3.1 Aufbau.....	3
1.3.2 Funktion.....	4
1.3.3 Bedeutung im allgemeinen und speziell beim Dialysepatienten.....	8
1.3.4 Thrombozyten spielen eine Schlüsselreaktion im Ablauf von Entzündungsprozessen.....	10
1.4 Thrombozytenfunktionsmessung.....	11
1.4.1 Das Multiplate.....	11
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	19
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.1 Beschreibung der Kollektive.....	20
2.2 Studiendesign.....	22
2.3 Messung der AUC mittels Multiplate.....	24
2.3.1 Prinzip.....	24
2.3.2 Material und Reagenzien.....	24
2.3.3 Geräte und Hilfsmittel.....	25
2.3.4 Ablauf der Messungen.....	25
2.4 Datenerfassung.....	27
2.5 Statistik.....	27
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>29</b>
3.1 Charakteristika der Kollektive.....	29
3.2 Die Thrombozytenfunktion beim HD – Patienten ist reduziert.....	32
3.2.1 Verteilung der AUC – Werte.....	33
3.2.2 HD - Patienten zeigen eine niedrigere AUC als gesunde Probanden.....	35
3.2.3 Die AUC unterscheidet sich vor und nach NO / Sildenafilzugabe beim HD – Patienten und beim gesunden Probanden.....	37
3.3 Delta NO unterscheidet sich nicht signifikant zwischen HD-Patienten und G Gesunden.....	39
3.3.1 Delta NO beim HD – Patienten unterscheidet sich nicht vom Gesunden.....	42

## Inhaltsverzeichnis

3.4	Verteilung und Vergleich der Thrombozytenzahl in HD-Patienten und gesunden Probanden .....	44
3.4.1	Verteilungsdiagramme der Thrombozytenzahl beim HD – Patienten und beim g gesunden Probanden .....	44
3.4.2	Die Thrombozytenzahl ist beim HD-Patienten signifikant geringer im V Vergleich zu jener vom gesunden Probanden .....	47
3.5	Assoziation der Thrombozytenfunktion mit Thrombozytenzahl, chronischer Inflammation und Querschnitts-Endpunkten.....	49
3.5.1	Die Thrombozytenzahl korreliert mit der Thrombozytenfunktion .....	50
3.5.2	Es besteht ein Zusammenhang zwischen Thrombozytenfunktion und chronischer Inflammation.....	52
3.5.3	Die Thrombozytenfunktion ist mit der Dauer der stationären Aufenthalte aufgrund . eines kardiovaskulären Ereignisses assoziiert.....	56
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>58</b>
4.1	Thrombozytenfunktion [AU*min] im Gruppenvergleich .....	59
4.2	Ansprechen auf NO/Sildenafil im Gruppenvergleich .....	62
4.3	Thrombozytenzahl im Gruppenvergleich .....	64
4.4	Korrelation der Thrombozytenfunktion mit infektiösen Ereignissen.....	65
4.5	Korrelation der Thrombozytenfunktion mit Hospitalisierungsdauer .. . aufgrund kardiovaskulärer Ereignissen.....	65
4.6	Kritische Betrachtung der Analyseergebnisse .....	67
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>69</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>.....</b>	<b>71</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>IX</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>XV</b>
<b>9.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>XVII</b>
<b>10.</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>XIX</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Rationale der Studie

Im Rahmen der Dialysebehandlungen kommt Patientenblut durch extrakorporale Zirkulation über die Dialysemaschine permanent mit künstlichen Oberflächen in Kontakt. Es ist bekannt, dass es dabei zu einer verstärkten Thrombozytenaktivierung kommt.

Folge hiervon ist die Bildung von Mikrogerinnseln und eine Steigerung der Thromboseneigung. Dies könnte auch mitverantwortlich für das erhöhte kardiovaskuläre Risikoprofil dieser Patienten sein (2) (3).

Andererseits ist aber auch eine erhöhte Blutungsneigung beim Dialysepatienten beschrieben (4). Blutungen können dabei häufig gastrointestinal, retroperitoneal oder mukosal auftreten.

Grund für diese Thrombozytenfunktionsstörungen sind neben urämischen Toxinen auch Medikamente, welche aufgrund fehlender renaler Elimination akkumulieren (z.B. nicht steroidale Antirheumatika (NSAIDs), z.B. Diclofenac). Auch die Antikoagulation während der Dialyse und die renale Anämie tragen zu Thrombozytenfunktionsstörungen bei (4).

In der vorliegenden Arbeit soll die Thrombozytenfunktion beim Dialysepatienten mittels eines Multiplate-Analyzers näher untersucht und mit der Thrombozytenfunktion von gesunden Probanden verglichen werden. Hierbei soll die Thrombozytenfunktion durch die Untersuchung des Ansprechens bzw. der Reaktion auf externe Trigger (durch Zugabe von Stickstoffmonoxid (NO) und Sildenafil) näher charakterisiert werden.

Ferner soll untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen Thrombozytenzahl und Thrombozytenfunktion besteht.

Des Weiteren soll die Thrombozytenfunktion im Hinblick auf chronische Inflammation und infektiöse Ereignisse untersucht werden und geprüft werden, ob die Thrombozytenfunktion mit kardiovaskulären Ereignissen korreliert.

## 1.2 Dialyse

### 1.2.1 Hintergrund der Dialyse und Probleme des extrakorporalen Kreislaufs

In Deutschland sind mehr als 80.000 Patienten dialysepflichtig aufgrund einer terminalen Niereninsuffizienz (5). Die Patienten müssen dabei mehrmals in der Woche für mehrere Stunden dialysieren. Hierbei zirkuliert das Blut über einen extrakorporalen Kreislauf. Über einen Shunt (Querverbindung zwischen Arterie und Vene) verlässt Blut die Zirkulation, indem es in ein Schlauchsystem eintritt (extrakorporaler Kreislauf). Über eine Pumpe gelangt es zum Dialysator, wo das Blut über die Oberflächenmembran des Filters mittels Osmose gereinigt, d.h. von harnpflichtigen Stoffen befreit, wird. Dabei werden Elektrolyte ausgeglichen und überschüssiges Wasser entzogen. Das gefilterte Blut wird dem Kreislauf über den Shunt wieder zugeführt. Vor dem Dialysator wird Heparin hinzugefügt, um eine Gerinnselbildung im Dialysesystem zu verhindern (6, 7). Abbildung 1 gibt hierzu einen schematischen Überblick.

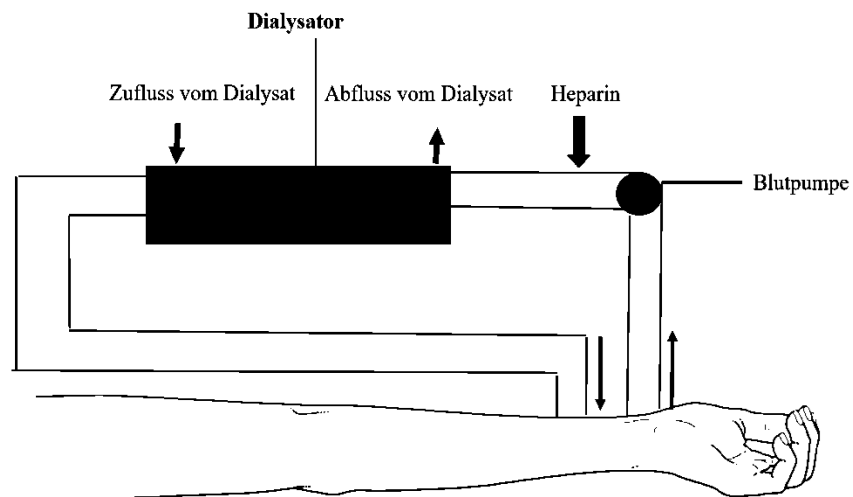


Abbildung 1: Prinzip der Hämodialyse modifiziert nach BREUCH et al. (8)

Bezüglich der Gerinnung führt der ständige Kontakt des Blutes mit künstlichen Oberflächen (Membran des Dialysators) zu einer Aktivierung der Thrombozyten (1). Diese führt zur Bildung von Mikroaggregaten, welchen den Dialysator verstopfen können (2).

Klinisch relevant ist die gesteigerte Thrombozytenaktivität in Bezug auf ein gehäuftes Vorkommen der Arteriosklerose bzw. der Manifestation der Koronaren Herzkrankheit (KHK). Ocak et al. untersuchten bei 455 Dialysepatienten über einen Zeitraum von 12 Jahren, ob eine Risikoerhöhung für Thromboseereignisse beim Dialysepatienten besteht. Untersucht wurde die Inzidenz von thrombotischen Ereignissen und ein Risikovergleich mit gesunden Probanden wurde durchgeführt. Ergebnis war ein 12fach erhöhtes Risiko für Myokardinfarkt, ein 8fach erhöhtes Risiko für Schlaganfall und ein 6fach erhöhtes Risiko für venöse Thrombosen beim Dialysepatienten (9). Koronare Events sind gleichzeitig die häufigste Todesursache beim Dialysepatienten (10). Dabei ist laut Sarnak et al. die kardiovaskuläre Mortalität beim Dialysepatienten 5-fach erhöht im Vergleich zum Nierengesunden (3). Ferner ist bekannt, dass langfristig gesehen die häufigen, mehrstündigen Dialysebehandlungen zu einer Abnahme der Thrombozytenzahl und deren Aktivität führen (1, 11).

### 1.3 Thrombozyten

#### 1.3.1 Aufbau

Thrombozyten sind rund, kernlos; haben einen Durchmesser von 2-5  $\mu\text{m}$  und eine Dicke von 0,5  $\mu\text{m}$ . Ein Erythrozyt ist im Vergleich 1,7-2,2  $\mu\text{m}$  dick (12).

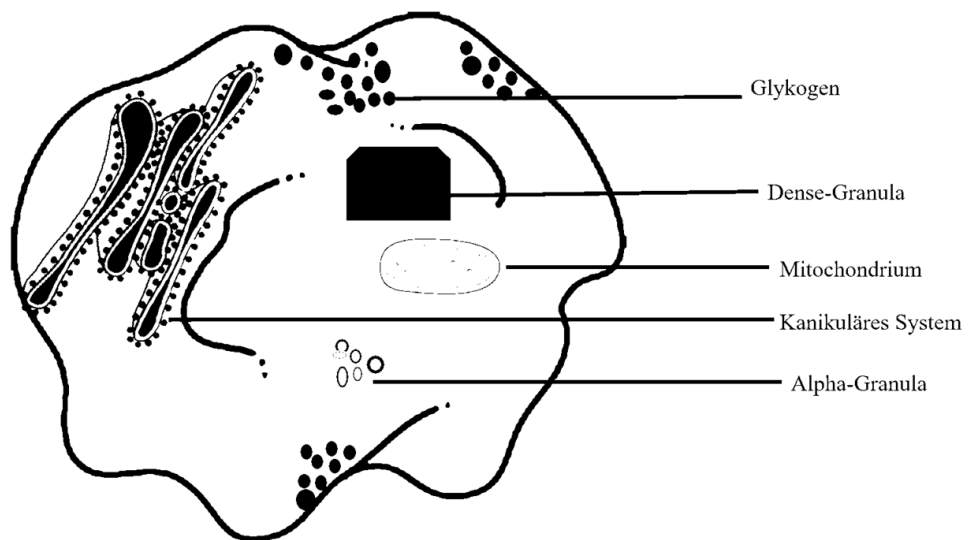
Mikroskopisch besteht ein Thrombozyt aus 2 Teilen, einem Granulomer und einem Hyalomer (granulummfrei). Im Folgenden wird auf diese Bestandteile näher eingegangen.

Das zentrale Granulomer ist aufgebaut aus mehreren Granulomtypen, Ribosomen und Glykogenvesikeln. Ein Granulomtyp ist die helle Alpha ( $\alpha$ ) – Granula. Diese beinhaltet proadhäsive Proteine z.B. von-Willebrand-Faktor (vWF), Fibrinogen und P-Selectin. Weiters prothrombotische Faktoren z.B. Faktor V (F5) und Faktor XI (F11), sowie proinflammatorische Faktoren z.B. Platelet-derived growth factor (PDGF), ein Wachstumsfaktor für die Thrombozyten und CD40 Ligand (CD 40L), wichtig für die Kommunikation der Immunzellen. Lichtmikroskopisch stellt sie sich azurophil dar. Das elektronendichte Delta ( $\delta$ ) –Granula beinhaltet hingegen Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Serotonin, Calcium und Magnesium. Die Lambda – ( $\lambda$ )-Granula besteht aus Lysosomen.

## Einleitung

Das Hyalomer besteht aus kontraktile Mikrofilamenten u.a. Aktin und Myosin. Ihre Hauptfunktion ist der Formerhalt. Ein weiterer Bestandteil sind Mitochondrien und das offene kanikuläre System, eine Sonderform des rauen endoplasmatischen Retikulums. Seine Funktion ist u.a. jene als Speicher für Calcium - Ionen. Diese befinden sich im Zytosol und sind wichtig für die Thrombozytenaggregation. Im Zytoplasma findet man auch messenger Ribonukleinsäure (mRNA). Deren Funktion ist die Proteinneusynthese.

Im Blut liegen die Thrombozyten in einer inaktiven Form vor. Sie sind diskoidal. Aktiviert werden sie z.B. durch mechanische Reize, u.a.z Gefäßverletzungen. Aktivierte Thrombozyten sind sphäroidal, also kugelig, geformt (13).



*Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Darstellung eines Thrombozyten modifiziert nach GEORGE et al. (14)*

### 1.3.2 Funktion

Die Thrombozytenaktivierung läuft prinzipiell in vier Schritten ab: Adhäsion, Formveränderung, Aggregation und Freisetzungsreaktion (15).



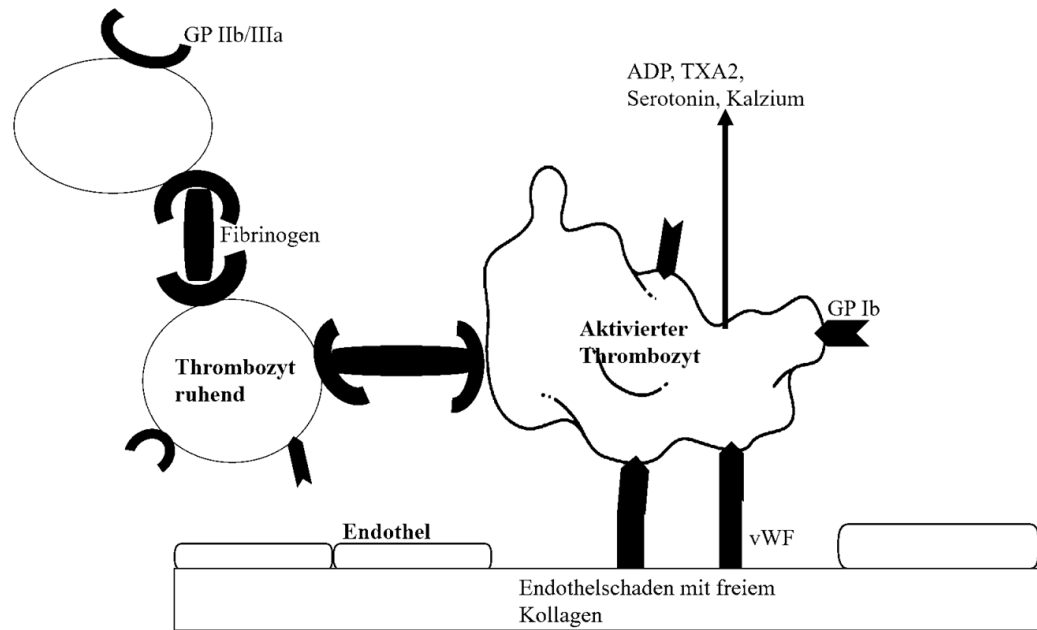


Abbildung 3: Thrombozytenaktivierung, modifiziert nach SALVATI et al. (15)

a) Adhäsion

Durch einen Reiz, beispielsweise einen Endothelschaden (Gefäß), bindet vWF aus dem Endothel an Kollagen. Das Kollagen ist Bestandteil der subendothelialen Matrix. Der vWF selbst bindet an den Glykoprotein Ib (GPIb)-Rezeptor der Thrombozyten. Somit kann der Thrombozyt an der subendothelialen Matrix haften.

b) Formwandel

Pseudopodien entstehen durch Kontraktionen vom Myosin, einem kontraktilen Filament. Hierbei werden die Myosinketten, unterstützt durch Calcium, phosphoryliert. Das Calcium stammt dabei aus intrazellulären Speichern (Membransystem).

c) Aggregation

Durch die intrazelluläre Calcium-Freisetzung werden auch GPIIb/IIIa - Rezeptoren aktiviert. Dies passiert über eine Konformationsänderung. Mithilfe dieser Rezeptoren werden die einzelnen Thrombozyten über Fibrinogen quervernetzt.

Ein zusätzlicher Effekt der GPIIb/IIIa - Konformationsänderung ist die Aktivierung von Signalkaskaden im Zellinneren z.B. Phosphoinositid-Kinase3 (PIK3), welche die Freisetzung von Granula unterstützen (16).

d) Freisetzung

## Einleitung

Über die Granula werden u.a. prokoagulatorische Mediatoren (ADP, Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), Calcium, Gerinnungsfaktoren...) frei, welche die sekundäre bzw. plasmatische Gerinnung unterstützen.

Andererseits gibt es auch inhibitorische Einflüsse auf die Thrombozyten, nämlich Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) und Stickstoffmonoxid (NO). Letzteres stammt u.a. aus dem Gefäßendothel. Es wird aus L-Arginin enzymatisch durch die NO-Synthase neben Citrullin gebildet. Die Guanylatcyclase ist ein enzymatischer Rezeptor für das NO am Gefäßendothel, den Thrombozyten und den glatten Muskelzellen. Diese bewirkt die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) zu cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Das cGMP aktiviert Proteinkinasen, welche im Endeffekt zelluläre Effekte bewirken. Dazu gehört u.a. die Thrombozytenfunktionshemmung. Auf zellulärer Ebene passiert diese über eine Reduktion des freien intrazellulären Calciums, welches von den Thrombozyten für die primäre Gerinnung benötigt wird. Dieser Zusammenhang wurde von Friebe et al. beschrieben (17). Calcium ist zudem wichtig für den Ablauf der sekundären bzw. plasmatischen Gerinnung (18).

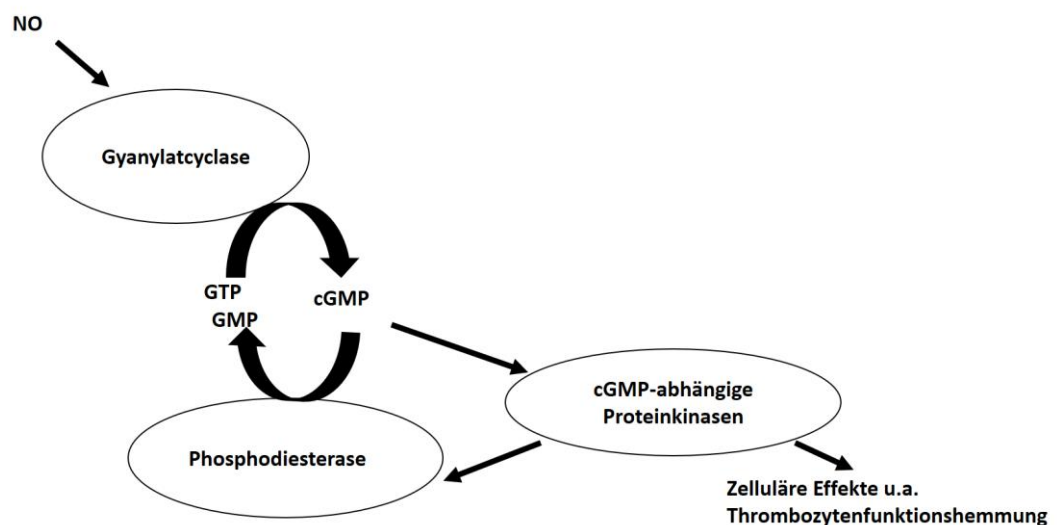


Abbildung 4: Die Wirkung von NO/cGMP modifiziert nach FRIEBE et al. (17)

Das cGMP wird durch Phosphodiesterasen (PDE) zu Guanosinmonophosphat (GMP) abgebaut. Eingeteilt werden die Phosphodiesterasen in 11 Gruppen. Beteiligt sind sie am

## Einleitung

Abbau von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Dabei wird das cGMP v.a. von der PDE 5 abgebaut. Ein Inhibitor der PDE-5 ist beispielsweise Sildenafil.

Klinisch relevante Effekte sind die Gefäßrelaxation, wenn der Wirkort die glatte Muskulatur ist, sowie eine Hemmung der Thrombozytenfunktion (18).

NO und Sildenafil wurden auch in der vorliegenden Studie verwendet, um zu untersuchen, wie sich deren Zugabe auf die Thrombozytenfunktion auswirkt. Hierbei wurde die Thrombozytenfunktion vor und nach NO/Sildenafilzugabe gemessen. Die Annahme hierbei ist, dass Dialysepatienten eine höhere Sensibilität für externe NO-Zugabe besitzen. Angenommen wird ein endogener Verbrauch. Es wird somit eine Abnahme der Thrombozytenfunktion erwartet, welche größer ist, als jene vom gesunden Probanden.

### **Die plasmatische Gerinnung**

Aufgrund des Endothelschadens wird Tissue factor (TF), ein Komplex aus Faktor III und Phospholipiden, frei. Dieser bewirkt die Aktivierung vom Faktor VII. Dieser wiederum bewirkt die Calcium-abhängige Aktivierung vom Faktor X.

FVa und FXa verbinden sich. Im weiteren Verlauf katalysieren sie unter Anwesenheit von Calcium die Umwandlung von FII in FIIa (Thrombin). Dieses wiederum bewirkt die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin, welches gerinnselstabilisierend wirkt. Faktor XIIIa ist wichtig für die Quervernetzung vom Fibrin. Plasmin (19) löst später den Thrombus wieder auf. Dieser Vorgang wird als Fibrinolyse bezeichnet (16).

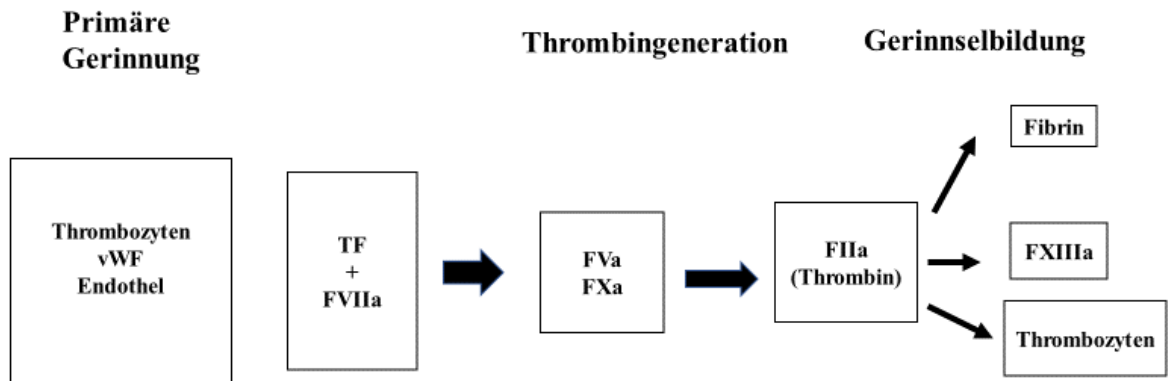


Abbildung 5: Übergang von der primären zur sekundären Gerinnung modifiziert nach SCHOORL et al. (2)

### 1.3.3 Bedeutung im Allgemeinen und speziell beim Dialysepatienten

Die Thrombozyten spielen bei diversen Prozessen eine wichtige Rolle. Neben der Blutstillung sind sie an Infektionen und Entzündungen beteiligt (20). Zudem leisten sie auch einen Beitrag zum Fortschreiten der Arteriosklerose (21).

*Beim Dialysepatienten treten einerseits häufig Thrombozytenfunktionsstörungen auf*

Wie in Abschnitt 1.2 erwähnt, ist das Thromboserisiko beim HD-Patienten erhöht. Die Erklärung hierfür liegt vor allem am Risikoprofil. Mehrere Risikofaktoren, welche für eine KHK prädisponieren, sind gleichzeitig begünstigend für eine chronische Niereninsuffizienz. Dazu zählen vor allem die Hypertonie und Diabetes mellitus (22). Zusätzlich zu den klassischen Risikofaktoren für KHK gibt es weitere Risikofaktoren, welche sowohl die KHK als auch die chronische Niereninsuffizienz begünstigen. Beispiele hierfür sind Inflammation, Oxidativer Stress, Malnutrition und Anämie. Auch Imbalancen der Elektrolyte, wie ein gestörtes Calcium-Phosphat-Gleichgewicht leisten

## Einleitung

einen Beitrag hierzu. Darüber hinaus wird durch die Dialyse selbst die Arterioskleroseneigung erhöht. Hauptsächlich über Blutdruckschwankungen und Bioinkompatibilität von Membranen (3). Sarnak et al. haben sich genauer mit den Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, wozu auch die chronische Niereninsuffizienz zählt, befasst (3).

### *Andererseits besteht beim Dialysepatienten auch eine erhöhte Blutungsneigung*

Neben der Thromboseneigung ist auch die Blutungsneigung beim Hämodialyse - Patienten erhöht. Die Gründe hierfür sind vielfältig. Hauptsächlich begünstigen Urämietoxine Störungen der Thrombozytenfunktion. Prädisponierend sind auch Medikamente, welche renal eliminiert werden wie die bereits eingangs erwähnten NSAIDs. Auch die Antikoagulation während der Dialyse stört die Thrombozyten in ihrer Funktion. Die renale Anämie trägt über die Abnahme des erythrozytenabhängigen Transport der Thrombozyten zu einem erhöhten Blutungsrisiko bei (23) (4).

Es stellt sich die Frage, ob für die Evaluation des Blutungsrisikos die Messung der Thrombozytenzahl über eine Blutentnahme ausreicht. Es besteht bereits eine Thrombozytopenie bei einer Thrombozytenzahl von unter 150 G/l (24, 25). Eine erhöhte Thrombozytenzahl besteht hingegen ab einem Wert von 450 G/l (26). Die häufigste Ursache ist die sekundäre Thrombozytose, beispielsweise bedingt durch eine akute Infektion, sowie chronische Entzündungen (z.B. Morbus Crohn) (27).

Bei einer abnormer Thrombozytenzahl kann die Funktion dennoch normal sein (26).

Für die Evaluation der Manifestation von kardiovaskulären Events ist aber nicht die Thrombozytenzahl, sondern deren Funktion essentiell. Eine zuverlässigere Aussage über das Blutungs- und Thromboserisiko liefert uns aus diesen Gründen die Thrombozytenfunktionsmessung (28-30).

Die Thrombozytenfunktion kann unter anderem mit dem Multiplate-Analyser untersucht werden (31). Mayer et al haben mittels Multiplate gezeigt, dass die Thrombozytenfunktion ein unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläres Outcome ist. Endpunkte waren Stentthrombose und Tod. Untersucht wurde die Hyperreaktivität der Thrombozyten nach Aspiringabe in Patienten mit koronarer Herzkrankheit, welche einer perkutanen Koronarintervention (PCI) unterzogen wurden. (32).

Die Impedanzaggregometrie wurde bereits zur Thrombozytenfunktionsmessung im Kollektiv der Hämodialysepatienten angewandt. Pluta et al. haben die Thrombozytenfunktion mittels Multiplate an 17 Hämodialysepatienten getestet und mit jener von 13 gesunden Probanden verglichen, mit Thrombinrezeptor-aktivierendem Peptid (TRAP) als Thrombozytenagonisten. Das Ergebnis war eine signifikant geringere Plättchenaktivität im HD-Patienten. Auch Gäckler et al. konnten mittels Multiplate eine signifikant geringere Thrombozytenfunktion im HD-Patienten im Vergleich zum gesunden Probanden zeigen. Verwendet wurden verschieden Agonisten, ADP, Arachnoidonsäure (ASPI), TRAP und Ristocetin. Das Kollektiv bestand aus 20 HD-Patienten, 10 CKD-Patienten im V Stadium, nicht in HD-Behandlung, 10 Peritonealdialysepatienten. Die Kontrollgruppe bestand aus 10 gesunden Probanden (34).

### **1.3.4 Thrombozyten spielen eine Schlüsselreaktion im Ablauf von Entzündungsprozessen**

Mit der Bedeutung der Thrombozyten in Hinblick auf Entzündungsprozesse haben sich Stoke et al. beschäftigt (35). Unter physiologischen Bedingungen halten die Thrombozyten die Barrierefunktion des Gefäßendothels aufrecht. Bei Inflammation hingegen, welche beim Dialysepatienten chronisch vorliegt, haften die Thrombozyten an der subendothelialen Matrix und setzen von dort aus vermehrt Entzündungsmediatoren frei. Sie aktivieren unter anderem Leukozyten, welche ihrerseits die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) fördern.

Aktiviert werden die Thrombozyten ihrerseits durch verschiedene Mediatoren, unter anderem Zytokine (z.B. IFN- $\gamma$ ), Interleukine (z.B. IL2) und Chemokine. In der Folge werden Degranulationsprodukte frei, welche die Aggregation der Thrombozyten bewirken. Beim Gesunden verhindern inhibitorische Mediatoren die Thrombozytenadhäsion am Gefäßendothel und die konsekutive Aggregation. Beispiele hierfür sind Nitric oxide (NO) und Prostacyclin, welche vom Gefäßendothel gebildet werden (35).

Caliskan et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass die CRP-Werte im Kollektiv der HD-Patienten im Vergleich zum gesunden Probanden signifikant erhöht sind (36).

## Einleitung

Dass die Entzündungsparameter beim Hämodialysepatienten signifikant erhöht sind im Vergleich zu Patienten mit CKD in konservativer Behandlung (3. und 4. Stadium), Peritonealdialysepatienten und Nierentransplantierten konnten Bilen et al. zeigen (37).

Auf den Aufbau und das Messprinzip vom Multiplate – Analyzer soll im folgenden Abschnitt genauer eingegangen werden.

## 1.4 Thrombozytenfunktionsmessung

### 1.4.1 Das Multiplate

#### 1.4.1.1 Aufbau, Bedienung und Interpretation der Ergebnisse

Das Gerät beinhaltet eine elektronische Pipette, Reagenzien, 5 Messkanäle, sowie eine Auswertungssoftware (Windows XP-basiertes Computersystem).

Jeder Messkanal beinhaltet 2 unabhängige Sensoreinheiten mit je 2 Elektroden. Die Sensoren bestehen aus Kupfer, welches eine hohe Leitfähigkeit besitzt.

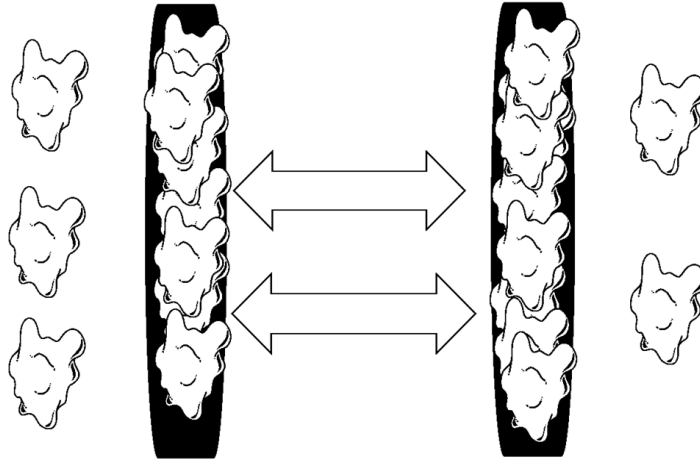


Abbildung 6: Multiplate – Analyzer (31)

Für die Messungen wird heparinisiertes Vollblut mittels einer elektronischen Pipette in einen Messkanal pipettiert. Jede der zwei Sensoreinheiten misst dabei unabhängig die Impedanz, d.h. den elektrischen Widerstand. Ein Agonist, beispielsweise ADP, regt die Thrombozyten durch intrazelluläre Mobilisation von Calcium zur Adhäsion und

## Einleitung

Aggregation an (38). Die Aggregate sammeln sich dann, wie in Abbildung 7 dargestellt, um die Sensordrähte. Sie verursachen so eine Änderung der Impedanz. Diese steigt an, und zwar proportional zur Thrombozytenfunktion.



*Abbildung 7: Aggregierte Thrombozyten haften an den Sensordrähten, modifiziert nach CALATZIS et al. (31)*

Die Impedanzmessung durch die Software erfolgt kontinuierlich. Folglich kann man den zeitlichen Verlauf auch graphisch als Kurve darstellen, wie Abbildung 8 zeigt. Es gibt 2 Kurven, weil es 2 voneinander unabhängige Sensordrähte gibt. Hier wird automatisch der Mittelwert berechnet. Am Monitor graphisch dargestellt wird die Area under the curve (AUC). Die Einheit hierfür ist [Aggregation Units\*minutes] [AU\*min] bzw. Units [U]. 10 [AU\*min] entsprechen dabei 1 [U]. Die [AU\*min] sind der beste Marker für die Thrombozytenaggregation. Je höher der Wert, umso höher ist die Thrombozytenfunktion.

Zudem ist auch die Geschwindigkeit der Aggregation von Bedeutung. Dargestellt ist diese als Steilheit der Kurve. Angegeben wird diese als [AU/min].

Je steiler die Kurve und umso höher der Maximalwert (angegeben in [AU]), umso höher ist die Thrombozytenfunktion.



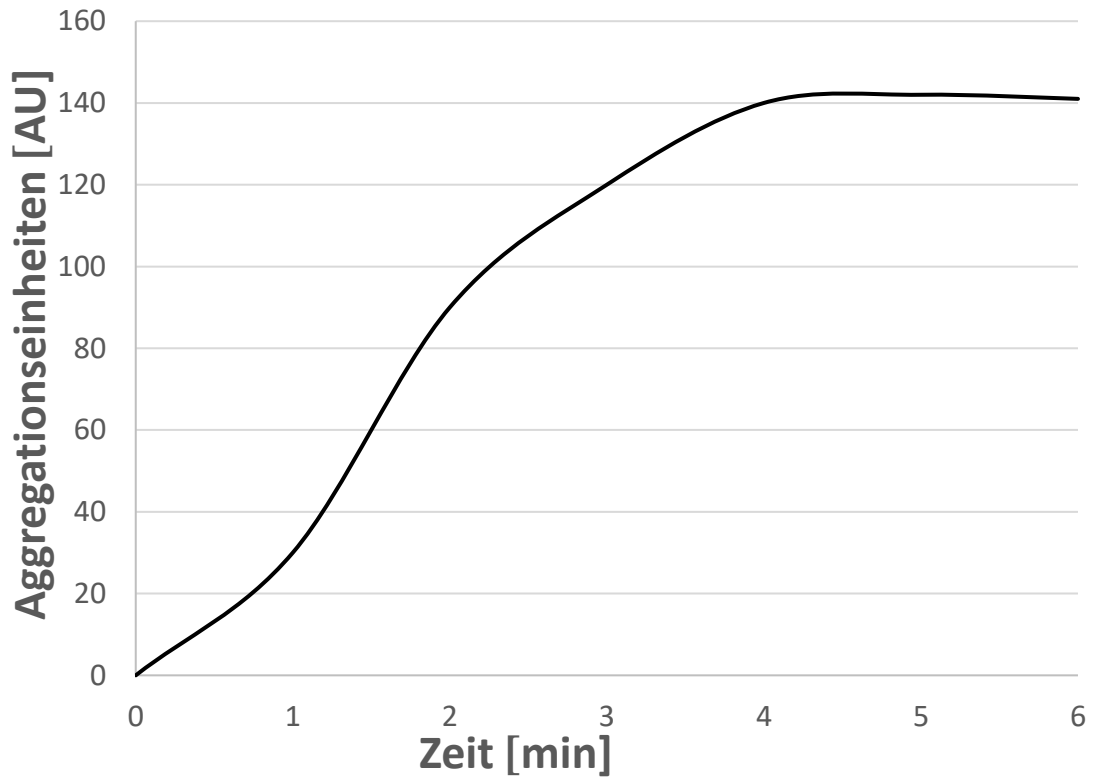


Abbildung 8: Aggregationskurve

Gezeigt ist hier eine Aggregationskurve. Interessant hierbei sind neben der AUC die Steilheit bzw. velocity [AU/min] und der Maximalwert der Aggregationseinheiten [AU].  
Abbildung modifiziert nach CALATZIS et al. (31).

Den optischen Unterschied der Aggregationskurven bei Gesundem und mit Aspirin (ASS) mediziertem Probanden zeigt die folgende Abbildung.

## Einleitung

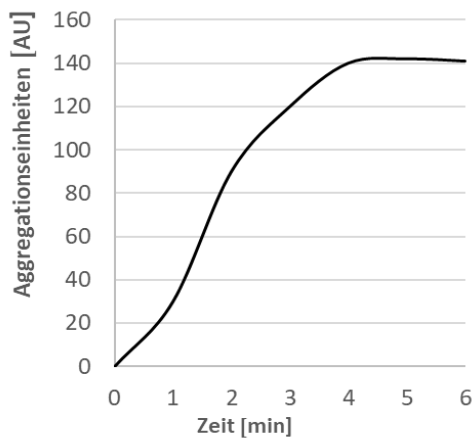


Abbildung 9: Aggregationskurve gesunder Proband

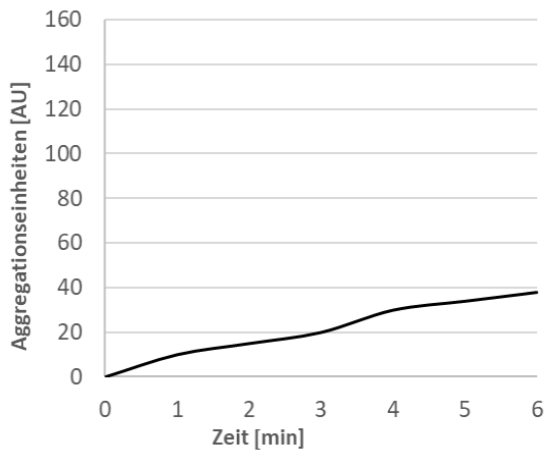


Abbildung 10: Aggregationskurve mit ASS antiaggregierter Patient

Abbildung 9 zeigt die Aggregationskurve eines gesunden Probanden. In Abbildung 10 dargestellt ist die Aggregationskurve eines Probanden, welcher mit ASS antiaggregiert ist. Ihr Anstieg ist flach und der Maximalwert ist gering. Hier wurde Arachnoidensäure (ASPI), als Agonist eingesetzt. Abbildung modifiziert nach CALATZIS et al. (31).

Einen ähnlichen Kurvenverlauf wird erwartet, wenn man die Thrombozytenfunktion nativ mit ADP als prokoagulatorischen Agonist mit jener nach NO/Sildenafilzugabe vergleicht.

Die Messwerte, welche uns das Multiplate anzeigt, werden kontrolliert durch eine interne Qualitätskontrolle. Falls der Korrelationskoeffizient nach Pearson dabei einen bestimmten Wert unterschreitet oder die beiden Kurven um mehr als 20% voneinander

## Einleitung

abweichen, gibt das Multiplate ein Signal. Die Messung soll dann wiederholt werden. (31).

Bei der Impedanzaggregometrie können verschiedene Agonisten eingesetzt werden (39).

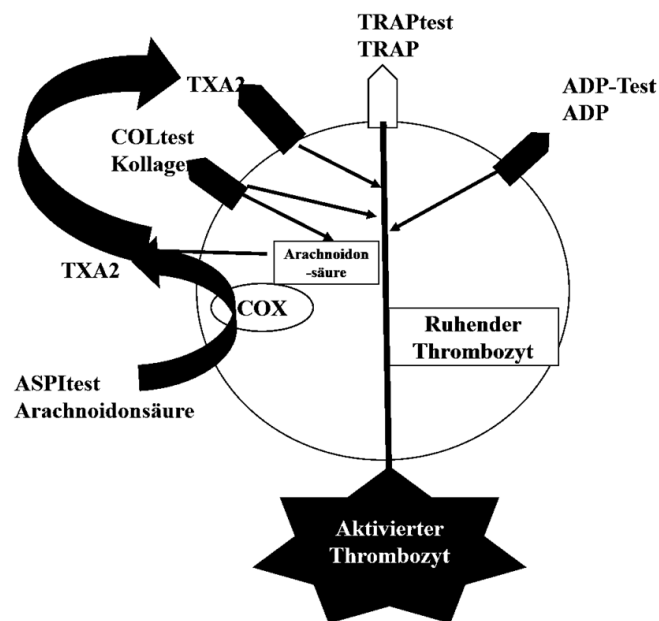


Abbildung 11: Agonisten für die Thrombozytenfunktionsmessung

Für die Messung der Thrombozytenfunktion können neben dem oben angeführten ADP auch andere Agonisten verwendet werden. Unter anderem ASPI bzw. Arachnoidensäure, ein Substrat der Cyclooxygenase (COX), welches die Umwandlung zu Thromboxan A (TXA2)), einem prothrombogenen Mediator, bewirkt. Alternativ kann auch Kollagen eingesetzt werden. Der ASPI und der COLtest (Kollagentest) dienen dem Monitoring der ASS-Einnahme. ASS hemmt irreversibel die COX und hemmt somit die Thrombozyten. Abbildung modifiziert nach CALATZIS et al. (31).

ADP wird u.a. beim therapeutischen Drug Monitoring von Clopidogrel, einem ADP-Rezeptorantagonisten, verwendet. Unter therapeutischem Drug Monitoring versteht man eine Dosisanpassung durch regelmäßig stattfindende Messungen der Wirkung des Medikamentes.

## Einleitung

Der Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid (TRAP) - Test wird hingegen angewandt, wenn ASS und Clopidogrel gleichzeitig eingenommen werden (31).

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass die Ursache der Thrombozytenfunktionsstörungen vielseitig sein kann.

Die Ergebnisse sollen aus den angeführten Gründen immer vorsichtig interpretiert werden. Thrombozytenfunktionsstörungen können nämlich auch durch Komorbiditäten, z.B. Nieren- oder Leberinsuffizienz verursacht sein (40)

### 1.4.1.2 Einsatzbereiche

Das Multiplate wird aktuell vor allem im Bereich der Kardiologie eingesetzt. Hier zur Überwachung und Steuerung der Einnahme von ASS und Clopidogrel (Thrombozytenaggregationshemmer). Insbesondere bei Patienten, welche Clopidogrel einnehmen können low- und high-Responder identifiziert und unterschieden werden. High-Responder haben ein höheres Blutungsrisiko, low-Responder ein höheres Thromboserisiko. So kann die Therapie individuell angepasst werden. Blutungen und Thrombosen kann so vorgebeugt werden (29, 30, 39, 41-45).

Zwei Beispiele für klinisch relevante Forschungsergebnisse, welche mittels Multiplate erreicht wurden, sind im Folgenden angeführt.

Bezüglich ASS wurde die Thrombozytenaktivität bei 7090 KHK-Patienten, welche vor der perkutanen Koronarintervention (PCI) 500 mg ASS injiziert bekamen, gemessen und untersucht auf Hyperreaktivität (High on – aspirin treatment platelet reactivity (HAPR)). HAPR bedeutet, dass die angestrebte Thrombozytenfunktionshemmung nicht ausreichend erreicht wird. Der Cut-off-Wert wurde auf 203 AU\*min festgelegt. Darunter spricht man von non-HAPR, darüber von HAPR. Endpunkte waren Stentthrombose oder Tod im Zeitraum von einem Jahr nach PCI-Behandlung. Es wurde festgestellt, dass HAPR ein unabhängiger Prädiktor für das klinische Outcome ist, da eine Stent-Thrombose oder Tod signifikant häufiger bei Patienten mit HAPR auftraten (32). Durch Bestimmung des HAPR-Status kann bei Risikopatienten eine erhöhte Aggregationsneigung rechtzeitig erkannt und die Therapie entsprechend angepasst werden.

Eine weitere Untersuchung, bei welcher der Multiplate - Analyzer eingesetzt wurde, hat die Metabolisierung von Clopidogrel bei unterschiedlichen Genotypen untersucht.

## Einleitung

Clopidogrel wird über CYP 2C19 metabolisiert. Die Allelvariante CYP2C19\*17 hat eine gesteigerte Transkriptionsaktivität. Folge hiervon ist eine schnellere Metabolisierung und eine kürzere Aktivitätsdauer von Clopidogrel. Die Genotypen wurden mittels TaqMan-assay bestimmt, die Thrombozytenaktivität mit dem Multiplate. Das Kollektiv bestand aus 1608 Patienten. Endpunkte waren Blutungen und Stentthrombosen innerhalb von 30 Tage nach PCI. Das Ergebnis war, dass der Genotyp ein unabhängiger Prädiktor für die 30 Tage - Mortalität von Blutungen ist. Bei der homozygoten Variante war der gemessene Wert für AU\*min am geringsten und das Blutungsrisiko somit am höchsten (46). Klinisch relevant ist die Genotypbestimmung und Thrombozytenfunktionsmessung bei Risikopatienten (z.B. Blutungen in der Anamnese). Die antiaggregatorische Therapie kann so individuell angepasst werden.

Das Multiplate ist auch ein wichtiges Messinstrument für die Erfassung des intra- und postoperativen Blutungsrisikos. So können rechtzeitig ausreichend Thrombozytenkonzentrate vorbereitet werden (44, 47-51).

Zusätzlich wird das Multiplate in der Transfusionsmedizin eingesetzt. Untersucht werden dabei die Thrombozyten vom Spender, die Konzentrate selbst und die Thrombozyten im Empfänger nach der Transfusion (52).

Zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion im Kollektiv der Hämodialysepatienten wurde Multiplate bereits angewandt. Dabei konnte im Kollektiv der Hämodialysepatienten eine signifikant reduzierte Thrombozytenaktivität im Vergleich zum Gesunden detektiert werden (33), (34).

Das Multiplate ist eine von vielen zahlreichen Methoden der Thrombozytenfunktionsdiagnostik. Im Anhang (Tabelle S1) sind verschiedene Messmethoden zur Erfassung der Thrombozytenfunktion im Vergleich dargestellt und erläutert.

Eine routinemäßige Thrombozytenfunktionsmessung wird derzeit durch die Leitlinien nicht empfohlen. Vielmehr soll abgewogen werden, bei welchen Patienten der Einsatz von Thrombozytenfunktionsmessungen sinnvoll ist.

Für die Multiplate-Methode sprechen dabei vor allem die technischen Vorteile. Es ist hierbei im Vergleich zu anderen Methoden keine Prozessierung von Vollblut nötig. Es gibt mehrere Messkanäle, d.h. mehrere Untersuchungen können gleichzeitig durchgeführt

## Einleitung

werden. Die hohe Prädiktivität für Blutungs- und Thromboseereignisse spricht für diese Messmethode. (35, 37-43).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll die Thrombozytenfunktion beim Hämodialyse (HD)-Patienten genauer untersucht werden. Verwendet wird hierbei ein Multiplate-Analyser, welcher auf dem Prinzip der Messung von Impedanzänderungen basiert.

Hieraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Wie unterscheidet sich die Thrombozytenaktivität beim HD-Patienten vom Gesunden, gemessen durch die ex-vivo Tests am Multiplate - unabhängig von Einflussfaktoren (u.a. Medikamenteneinnahme, Komorbiditäten)?
2. Unterscheidet sich die Reaktion der Thrombozyten auf externe NO/Sildenafilzugabe beider Kollektive - unabhängig von Einflussfaktoren (u.a. Einnahme von Medikamenten und Komorbiditäten)?
3. Ergeben sich Unterschiede in der Thrombozytenzahl beim Dialysepatienten und beim gesunden Probanden?
4. Findet sich ein Zusammenhang zwischen der Thrombozytenfunktion und weiteren Untersuchungsparametern?
  - a) Gibt es eine Korrelation zwischen Thrombozytenfunktion und Thrombozytenzahl beim HD-Patienten. Gibt es diese auch beim Gesunden?
  - b) Gibt es eine Korrelation zwischen Thrombozytenfunktion und dem Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP)? Besteht ein Zusammenhang zwischen der Hospitalisierung aufgrund einer Infektion und der Thrombozytenfunktion?
  - c) Korreliert die Thrombozytenfunktion mit der Dauer der stationären Aufenthalte aufgrund eines kardiovaskulären Ereignisses?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Beschreibung der Kollektive**

Insgesamt wurden 88 stabile Hämodialysepatienten im Rahmen der Citrat/Acetat Studie im Alter von 33 bis 92 Jahren gescreent. Die Hämodialysepatienten wurden aus den Dialysezentren „Nierenzentrum24“ an den Standorten Neuperlach und Bogenhausen rekrutiert.

Es wurden weitere 84 gesunde Probanden im Alter von 27 bis 93 Jahren gescreent. Gemessen wurde jeder gesunde Proband jeweils ein malig. Zeitraum war vom Mai 2016 bis zum Mai 2017.

Die nachträglich angewandten Ausschlusskriterien sind in Abschnitt 3.1 aufgeführt.

In die Analysen wurden nach Anwendung der definierten Ausschlusskriterien 60 HD – Patienten und 67 gesunde Probanden eingeschlossen

Einschlusskriterien und Ausschlusskriterien bei Dialysepatienten und bei den gesunden Probanden sind in Tabelle 1 dargestellt.



*Tabelle 1: Einschlusskriterien HD und Kontrollgruppe*

<b>Einschlusskriterien</b>	<b>Ausschlusskriterien</b>
Alter > 18 Jahre, beide Geschlechter	Thrombozytenzahl < 150 G/L
Unterschriebene Einverständniserklärung	Thrombozytenzahl > 400 G/L
	Akute Infektion
 <i><b>Speziell bei HD Patienten</b></i>	
Dialysepflichtigkeit seit mindestens 3 Monaten	Einnahme von ADP-Rezeptorantagonisten, z.B. Clopidogrel
Dialyse 3x/Woche für mindestens 4 Stunden pro Sitzung	Leberzirrhose
	Hämatologische Erkrankung
	Keine Messung erfolgt

Die Thrombozytenfunktion der Dialysepatienten wurde gemäß Studienprotokoll im Rahmen der regulären Blutabnahmen der Citrat - Acetat Studie an 3 verschiedenen Zeitpunkten – T1, T2 und T3 - gemessen. Zwischen den einzelnen Messzeitpunkten lagen jeweils etwa 3 Monate. Die Messungen fanden im Zeitraum von Mai 2016 bis Januar 2017 statt.

## Material und Methoden

In die Analysen eingeschlossen wurden zum Zeitpunkt T1 60 Probanden. Die Messungen von T2 und T3 wurden in der vorliegenden Studie nicht zur Auswertung herangezogen.

Das Ziel der Studie ist es, den Einfluss der Dialyse auf die Thrombozytenfunktion zu untersuchen. Nun gibt es aber Faktoren, welche die Thrombozytenfunktion beeinträchtigen, aber nicht mit der Dialyse in Zusammenhang stehen. Dazu gehören die Leberzirrhose und hämatologische Erkrankungen. Bei den Medikamenten führen ADP-Bei den Medikamenten führen ADP-Rezeptorantagonisten wie z.B. Clopidogrel zu verfälschten Ergebnissen.

## 2.2 Studiendesign

Die Thrombozytenfunktionsmessung wurde im Rahmen der Citrat-Acetat-Studie durchgeführt. Bei dieser Studie handelt es sich um eine einfachblinde Crossover-Studie. Die Studie wurde von der Ethikkommission am Klinikum rechts der Isar unter der Ethiknummer: NCT02745340 genehmigt (53).

Dabei gab es zwei Dialysesysteme: Citrat und Acetat sollten in Bezug auf verschiedene Parameter verglichen werden. Es gab 3 Messzeitpunkte. Die Zuteilung zu Citrat oder Acetat erfolgte durch die Zugehörigkeit zum jeweiligen Zentrum. Folglich wurde keine Randomisierung durchgeführt. Zur Veranschaulichung dient dabei das folgende Schema.

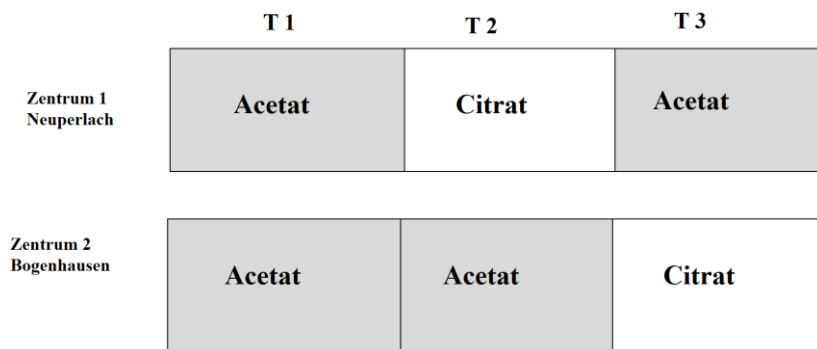


Abbildung 12: Darstellung der Messzeitpunkte

## Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Thrombozytenfunktionsmessung. Diese wurde mittels Multiplate unter der Verwendung von Vollblut gemessen. Die Messungen erfolgten dabei nach den Protokollen der Hersteller. In der vorliegenden Studie wurde die Thrombozytenfunktion zunächst nativ, dann in einem weiteren Schritt unter Zugabe von NO/Sildenafil gemessen. Dieses Prinzip wurde angelehnt an das Protokoll vom Deutschen Herzzentrum (siehe 2.3.4).

Neben der Thrombozytenfunktionsmessung wurden bei der Citrat-Acetat-Studie folgende Parameter untersucht: Einfluss auf den Blutdruck und dynamische Parameter der Makrozirkulation, Änderung dialysespezifischer Laborparameter, proinflammatorischer Zytokine und Immunphänotyp, Verträglichkeit und Lebensqualität an der Dialyse anhand eines klinischen Fragebogens, Abfrage von substratspezifischen Symptomen und die kognitive Leistungsfähigkeit (53).

Für die Auswertung dieser Studie wurden die Messwerte zum Zeitpunkt T1 verwendet. Der Vergleich von Citrat mit Acetat ist nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

## 2.3 Messung der AUC mittels Multiplate

### 2.3.1 Prinzip

Das Messprinzip der Thrombozytenfunktionsmessung zeigt Abb. 13.

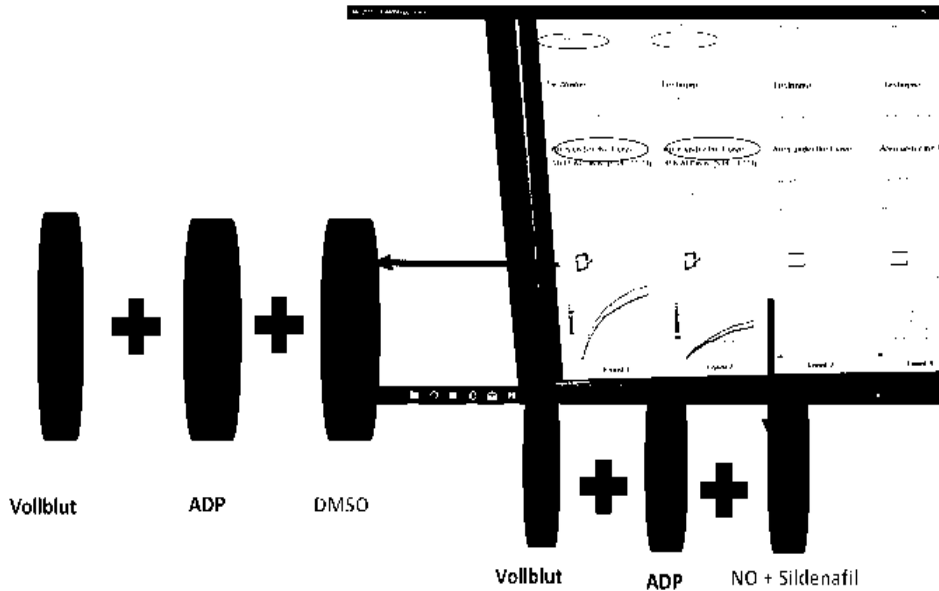


Abbildung 13: Darstellung vom Messprinzip

Die Thrombozytenfunktionsmessung wurde mit jeder Patientenprobe nativ (in Abbildung 13 links) und nach NO/Sildenafilgabe (in Abbildung 13 rechts) durchgeführt.

Die AUC wurde quantitativ gemessen mit dem Multiplate (Katalognummer 06675794190 V 3) der Firma Roche®, Mannheim, Deutschland. Die Messung erfolgte dabei nach dem Protokoll des Herstellers.

### 2.3.2 Material und Reagenzien

Flasche (R1) für 1 ml

Reagenz mit ADP 0,2 mM

5 Mikroteströhrchen zur Aliquotierung

Kochsalzlösung 0,9%

Destilliertes Wasser

Dimethylsulfoxid (DMSO)

## Material und Methoden

Nitroprussid

Sildenafil

### 2.3.3 Geräte und Hilfsmittel

Multiplate-Gerät

Laboraüstung

### 2.3.4 Ablauf der Messungen

#### Vorbereitung

Der Inhalt der Flasche R1 (ADP) wurde mit 1 ml destilliertem Wasser rekonstituiert. Nach dem Verschluss wurde die Flasche für 10 Minuten bei 18 – 25°C stehen gelassen. Danach wurde das Reagenz in Mikroteströhrchen aliquotiert.

Für die Blutentnahme wurden Hirudinröhrchen verwendet.

Zu beachten war, dass zwischen Blutentnahme und Messung maximal drei Stunden vergehen durften.

#### AUC nativ

Den Messablauf der Thrombozytenfunktionsmessung nativ zeigt Tabelle 2.

Ablauf	Menge / Zeitdauer
Kochsalzlösung 0,9% (auf 37°C vorgewärmt)	300 µl
Vollblut (18 -25°C)	300 µl
Inkubation	3 Minuten
R1(ADP)	20 µl
Messzeit	6 Minuten

*Tabelle 2: Ablauf der Messung der [AUC] nativ*

## Material und Methoden

In den jeweiligen Messkanal wurde eine vorgegebene Menge vorgewärmte Kochsalzlösung pipettiert. Dann wurde Vollblut hinzu pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten wurde ADP dazugegeben. Abschließend wurde DMSO hinzugefügt. Die Endkonzentration an ADP betrug 6,5 mM.

Die Anweisungen zum Ablauf der Messungen wurden hierbei am Monitor vom Multiplate angezeigt.

Nach einer Messzeit von 6 Minuten wurden die Aggregationskurve und der Wert für die AUC am Monitor angezeigt.

### AUC nach NO/Sildenafilzugabe

Der Ablauf der Messung wurde angelehnt an das Protokoll vom Deutschen Herzzentrum.

Das Pipettierschema ist in Abbildung 14 visualisiert.

DMSO (78,13 g/mol)		Nitroprussid (297,95 g/mol)		Sildenafil (666,70 g/mol)	
<b>Stocklösungen</b>					
		30 mg Nitroprussid + 500 µl DMSO (= 200 mM)		5 mg Sildenafil + 1,5 ml DMSO (= 5 mM)	
<b>Arbeitslösungen</b>					
20 µl DMSO + 980 µl H <sub>2</sub> O (= 1:50)	40 µl DMSO + 960 µl H <sub>2</sub> O (= 1:25)	50 µl DMSO + 450 µl H <sub>2</sub> O (= 20 mM)	50 µl (1:10) + 450 µl H <sub>2</sub> O (= 2 mM)	50 µl (5 mM) + 450 µl H <sub>2</sub> O (= 500 µM)	200 µl (500 µM) + 300 µl H <sub>2</sub> O (= 200 µM)
→ DMSO 1:50	→ DMSO 1:25	→ DMSO 1:1000		→ DMSO 1:25	

↓

25 µl in 250 µl Ansatz ergeben DMSO Endkonzentration von 1:500

800 µl

↘

Je 12,5 µl (bzw. 25 µl 1:2 verdünnt) in 250 µl Ansatz ergeben DMSO Endkonzentration von 1:487  
NO Endkonzentration 10 µM  
Sildenafil Endkonzentration 10 µM

800 µl

↙

Abbildung 14: Pipettierschema

Aus den Basiskomponenten wurden Stocklösungen bzw. Stammlösungen hergestellt. Diese dienten dabei als Grundlage für die Arbeitslösungen. Letztere wurden verdünnt. Die Nitroprussid und die Sildenafillösung wurden in eine Ansatzlösung pipettiert, sodass eine äquimolare Gesamtkonzentration vorlag.

Die [AUC]-Messung mit NO/Sildenafil erfolgte analog zu der Messung der AUC nativ. Verwendet wurde wieder Vollblut. Dieses wurde zur vorgewärmten NaCl-Lösung pipettiert. Als Agonist für die Aggregation diente ADP. Anstatt DMSO wurde im letzten Schritt das verdünnte, äquimolare Nitroprussid-Sildenafilgemisch hinzugefügt.

### 2.4 Datenerfassung

Erhoben wurden patientenspezifische und demographische Daten: Alter, Geschlecht, BMI, internistische und psychiatrische Vorerkrankungen, kardiale Risikofaktoren (Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Nikotinabusus), Medikamentenanamnese (Antihypertensiva, Diuretika, Statine, Antikoagulantien). Die Daten wurden dabei aus der elektronischen Krankenakte in den beiden Dialysezentren „Nierenzentrum24“ an den Standorten Neuperlach und Bogenhausen erhoben. Die gesunden Probanden wurden anamnestisch befragt.

Die Blutentnahmen erfolgten vor den Dialysesitzungen Mitte der Woche in den Dialysezentren. Bei den gesunden Probanden erfolgten sie im Klinikum rechts der Isar. Es wurde ein Blutbild und ein Differenzialblutbild zu jedem Messzeitpunkt erstellt. Die Auswertung der Blutbilder wurde im nephrologischen Routinelabor und in der Klinischen Chemie des Klinikums Rechts der Isar durchgeführt.

Die Thrombozytenfunktionsmessungen wurden direkt im Anschluss an die Blutentnahmen durchgeführt.

Die erhobenen Daten wurden in eine Excel – Tabelle eingetragen.

### 2.5 Statistik

Die erhobenen Daten wurden mithilfe der Analysesoftware SPSS, Version 22 (IBM Statistics SPSS 22, IBM Corp., NY, USA) ausgewertet.

Es wurde als Signifikanzgrenze eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha \leq 0,05$  (entsprechend einem Signifikanzniveau von 95%) gewählt.

Die quantitativen Studienvariablen sind als Mittelwerte mit Standardabweichung oder als Median mit Interquartilbereich (25 Perzentile; 75 Perzentile) beschrieben. Beim Alter wurden neben dem Median das Minimum und das Maximum angegeben. Die qualitativen Studienvariablen sind durch die absolute und die relative Häufigkeit angegeben. Die

## Material und Methoden

absolute Häufigkeit beinhaltet die Anzahl an Probanden. Die relative Häufigkeit bezieht sich auf den prozentualen Anteil am jeweiligen Kollektiv (HD oder gesunde Probanden). Der Gruppenvergleich der Thrombozytenfunktionswerte der Dialysepatienten und der gesunden Probanden erfolgte durch den t-Test für unabhängige Stichproben.

Der Gruppenvergleich der Thrombozytenfunktion vor und nach NO-Zugabe erfolgte durch den t-Test für abhängige Stichproben. Die Untersuchung der Korrelationen der Thrombozytenfunktion mit der Thrombozytenzahl, Hospitalisierungsdauer aufgrund infektiöser sowie kardiovaskulärer Ereignisse erfolgte durch die Ermittlung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakteristika der Kollektive

In der Rekrutierungsstudie (Citrat/Acetat) wurden zum Zeitpunkt der Datenerhebung 88 HD-Patienten und 84 gesunde Probanden gescreent.

Die nachträglich angewandten Ausschlusskriterien sind in Abbildung 15 dargestellt.

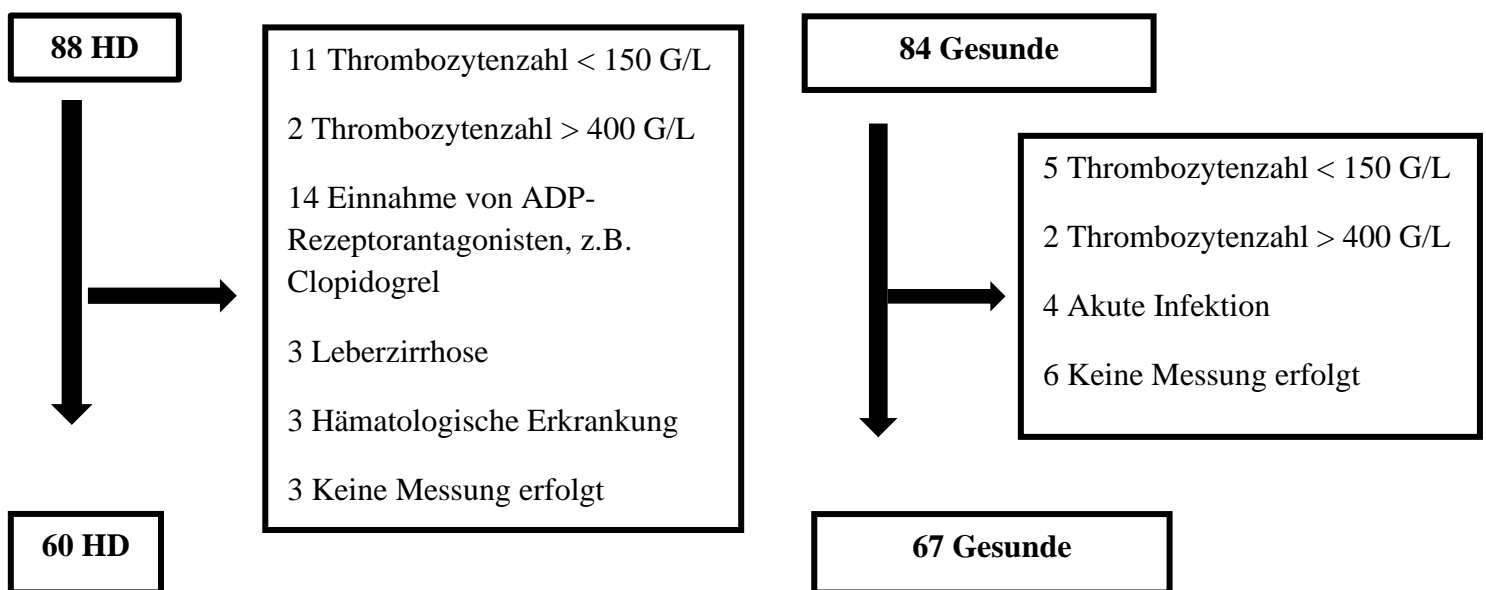


Abbildung 15: Überblick über Ausschlusskriterien

Für meine Studie wurden, wie in Abbildung 15 gezeigt, 3 Patienten mit Leberzirrhose, 3 Patienten mit hämatologischen Erkrankungen und 14 Patienten, welche ADP-Rezeptorantagonisten (z.B. Clopidogrel) einnahmen, ausgeschlossen.

Zu geringe Thrombozytenzahlen, unter 150 G/l, können auch zu ungenauen Messergebnissen für die Thrombozytenfunktion führen (54). Aus diesem Grund wurden Probanden, welche dieses Kriterium erfüllten aus den Analysen ausgeschlossen (n=5). Bei den Dialysepatienten traf dies auf 11 Probanden zu. Bei der Kontrollgruppe mussten 5 Probanden wegen einer zu geringen Thrombozytenzahl ausgeschlossen werden.

Thrombozytenzahlen über 400 G/l sind häufig mit Komorbiditäten assoziiert (z.B. Hämatologische Erkrankungen, M. Crohn...) (27). Probanden, welche dieses Kriterium

## Ergebnisse

erfüllten, wurden aus den Analysen ausgeschlossen. Bei den HD-Patienten traf dieses Kriterium auf 2 Probanden zu, bei der Kontrollgruppe auch auf 2 Probanden.

Bei den gesunden Probanden gaben 4 Probanden an, an einer akuten Infektion (Erkältung) zu leiden. Auch sie wurden aus den Analysen ausgeschlossen.

Bei einigen Probanden konnte keine Messung erfolgen. Beim HD-Kollektiv traf dies auf 3 Probanden zu, wobei ein Proband verstorben war, ein Patient das Zentrum gewechselt hat und die Werte eines HD-Patienten aus technischen Gründen nicht erhoben werden konnten. Bei der Kontrollgruppe konnten aus technischen Gründen die Thrombozytenfunktionsmessungen bei 6 Probanden nicht durchgeführt werden.

Effektiv analysiert wurden 60 HD-Patienten und 67 gesunde Probanden.

Die Basischarakteristika der effektiv analysierten Probanden sind in Tabelle 3 aufgelistet.

*Tabelle 3: Basischarakteristika HD und Kontrollgruppe nach Anwendung der Ausschlusskriterien*

*Angegeben sind die Werte in Median mit Minimum und Maximum für das Alter, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für den BMI und in absoluter und relativer Häufigkeit für die übrigen aufgeführten Werte. Die absolute Häufigkeit bezieht sich dabei auf die Anzahl an Patienten bzw. Probanden, die relative Häufigkeit auf den prozentualen Anteil am jeweiligen Kollektiv, bestehend aus 60 Hämodialyse-Patienten ( $n=60$ ) und 67 Probanden der Kontrollgruppe ( $n=67$ ).*

## Ergebnisse

<b>Charakteristika</b>	<b>Hämodialyse-Patienten</b>	<b>Kontrollgruppe</b>
Anzahl (n)	60	67
Alter (Jahre)	69 (29; 90)	69 (43; 86)
Geschlecht (weiblich) n (%)	30 (50)	38 (56,7)
KHK (n; %)	17 (28)	1 (1)
Zerebrovaskuläre Erkrankung (z.B. Apoplex) (n; %)	10 (17)	0 (0)
Herzinsuffizienz (n; %)	3 (5)	0 (0)
Diabetes mellitus Typ 2 (n; %)	14 (23)	0 (0)
Blutdruckmedikation (n; %)	57 (95)	13 (19)
Antikoagulation (n; %)	14 (23)	1 (1)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,5 ± 5,1	24 ± 4,0
Hypercholesterinämie (n; %)	26 (43)	17 (25)
Nikotinabusus (n; %)	6 (10)	15 (22)

## Ergebnisse

Effektiv analysiert wurden 60 HD-Patienten. Der jüngste Proband war 29 Jahre alt, der älteste 90. Es waren 30 Frauen (50%) und 30 Männer (50%) eingeschlossen. Insgesamt litten 17 Probanden (28%) an einer KHK, 57 Patienten (95%) an behandlungsbedürftigem Bluthochdruck, 10 Patienten (17%) an einer zerebrovaskulären Erkrankung, 3 Probanden (5%) hatten eine Herzinsuffizienz. 14 HD-Patienten (23%) litten an einem Diabetes mellitus Typ 2.

67 Probanden der Kontrollgruppe wurden effektiv analysiert. Der jüngste Proband war 43 Jahre alt, der älteste 86. 38 Probanden (56,7%) waren weiblich, 29 (43,3%) waren männlich.

### **3.2 Die Thrombozytenfunktion beim HD – Patienten ist reduziert**

Durch die Dialysesitzungen sind die Thrombozyten in ständigem Kontakt mit künstlichen Oberflächen (Dialysatormembran). Sie werden dadurch abnorm aktiviert. Im Verlauf der mehrmals pro Woche stattfindenden, mehrere Stunden dauernden Dialysesitzungen kommt es langfristig gesehen zu einer Abnahme der Thrombozytenfunktion und -zahl (1) (55).

Ziel der nachfolgenden Auswertung ist die Untersuchung, ob sich die Thrombozytenfunktion beim Hämodialysepatienten im Vergleich zum Gesunden unterscheidet. Es soll somit ein Parameter erhoben werden, welcher den Funktionszustand der Thrombozyten zuverlässig wiedergibt.

### 3.2.1 Verteilung der AUC – Werte

Abbildung 16 zeigt die Verteilung der AUC – Werte beim HD-Patienten.

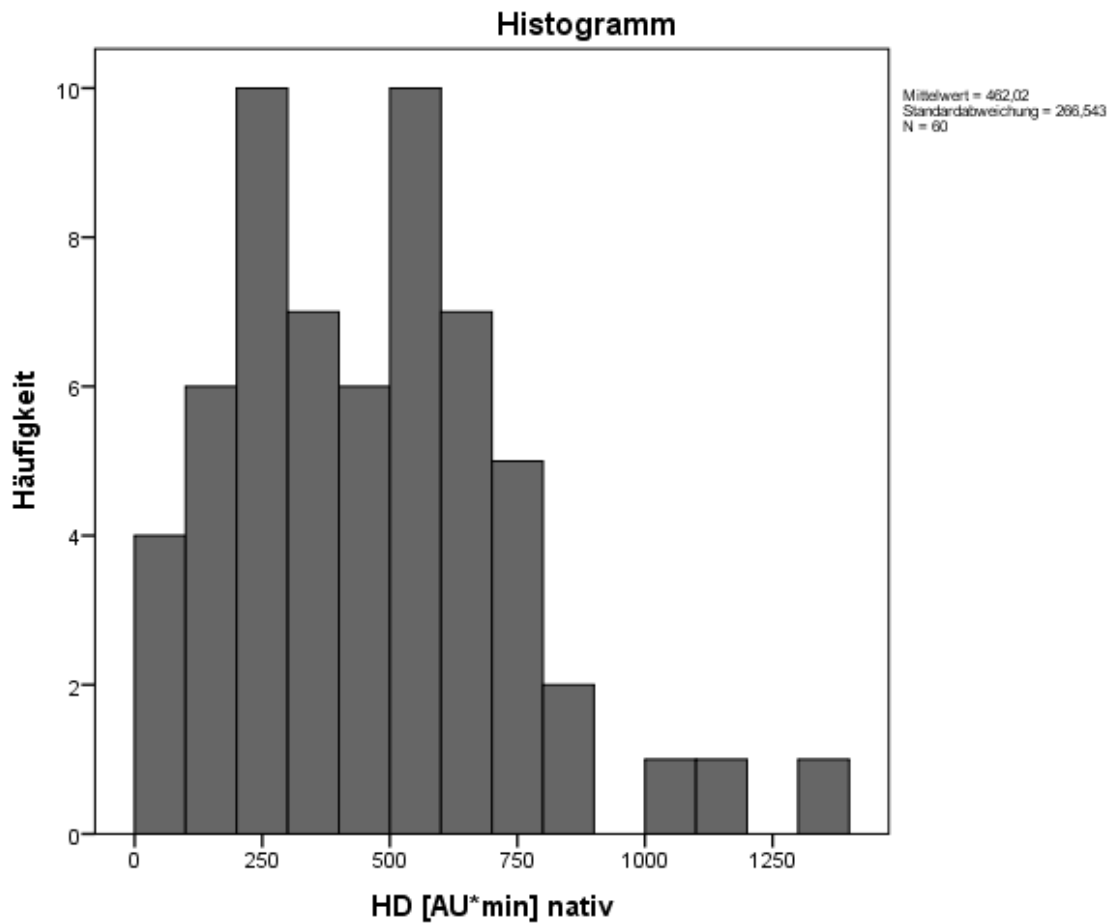
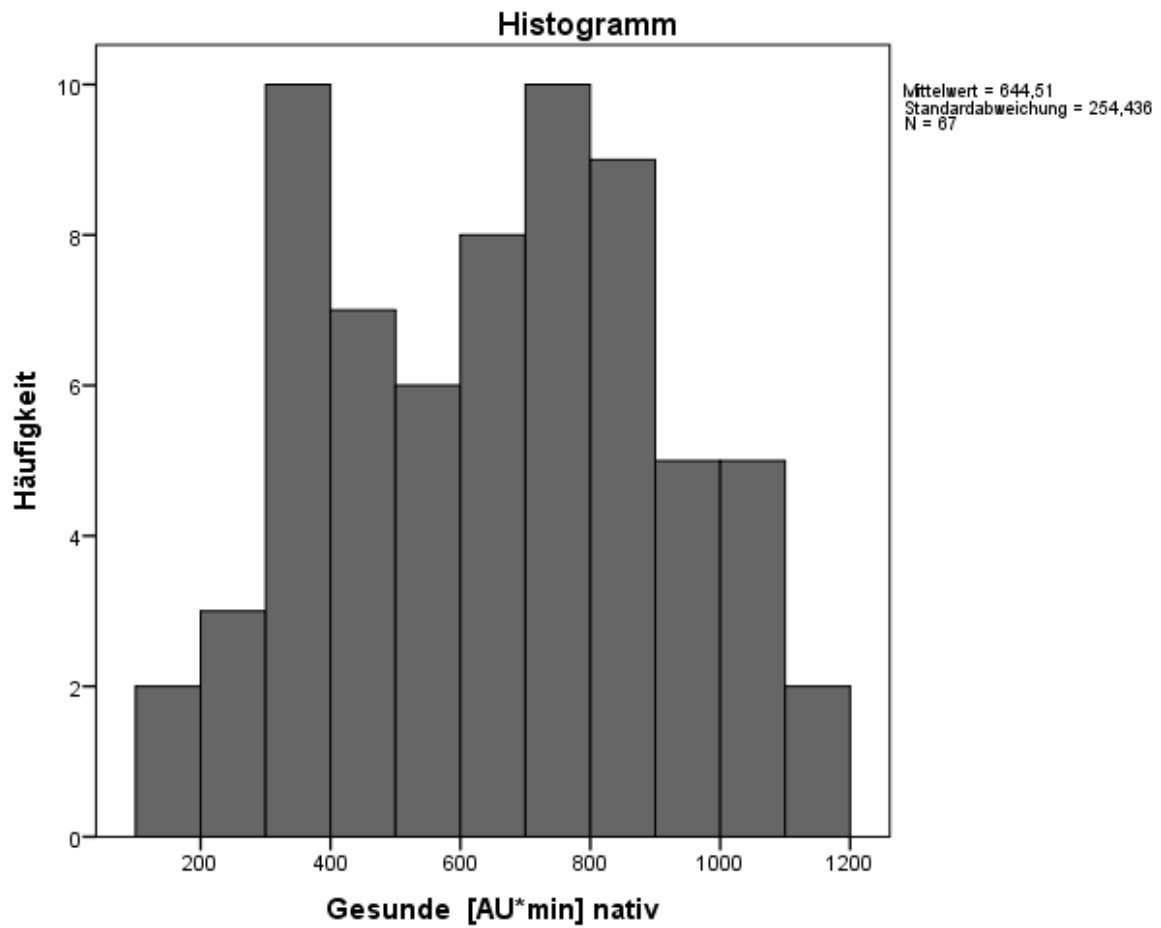


Abbildung 16: Histogramm zur Veranschaulichung der Verteilung der AUC – Werte im Kollektiv der HD – Patienten

## Ergebnisse

Abbildung 17 zeigt die Verteilung der AUC – Werte im Kollektiv der gesunden Probanden.



*Abbildung 17: Histogramm zur Veranschaulichung der Verteilung der AUC – Werte im Kollektiv der gesunden Probanden*

### 3.2.2 HD - Patienten zeigen eine niedrigere AUC als gesunde Probanden

Wie eingangs erklärt, erwarten wir eine geringere Thrombozytenfunktion im Kollektiv der Hämodialysepatienten.

Die Thrombozytenfunktion der HD – Patienten im Vergleich zu jener vom gesunden Probanden ist in Abbildung 18 gezeigt.

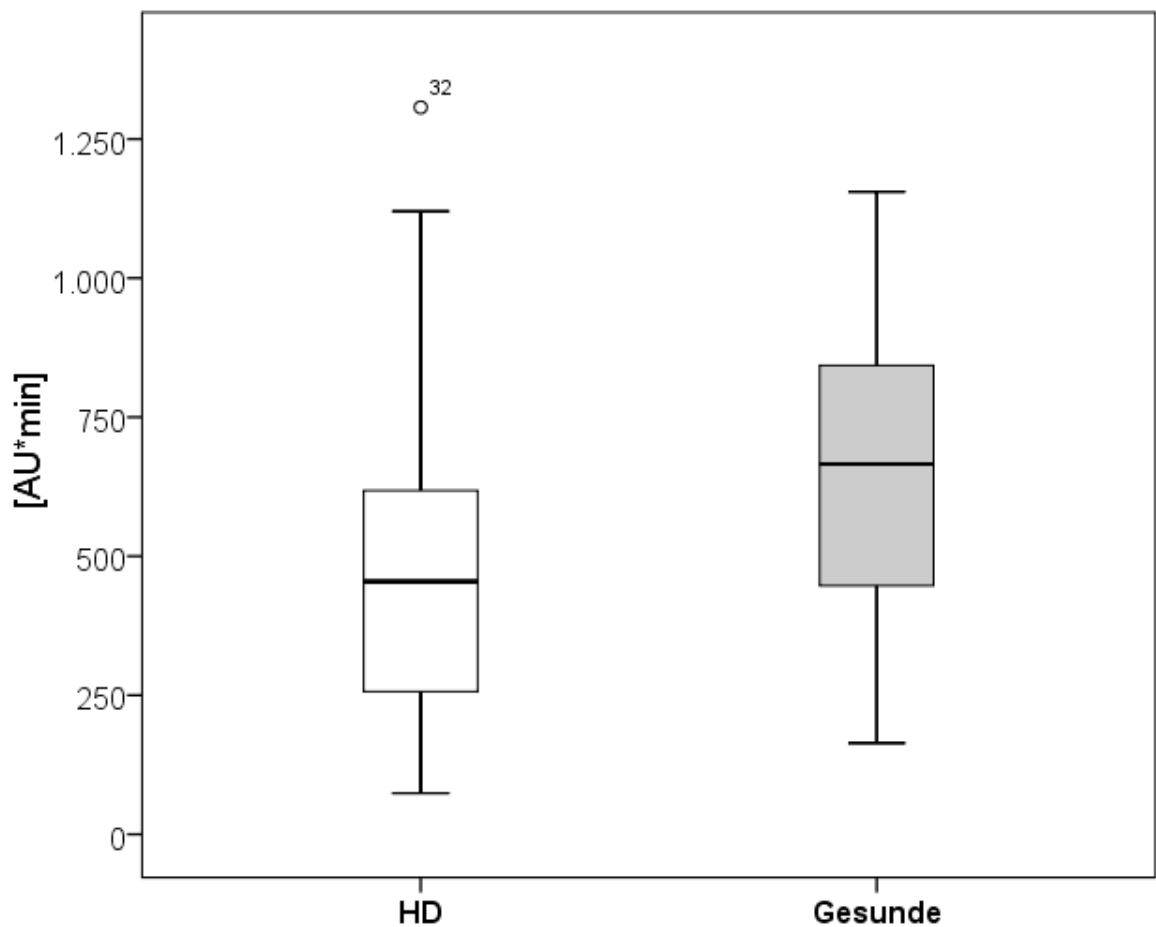


Abbildung 18: Thrombozytenfunktion [AU\*min] HD – Patienten vs. Gesunde

Dargestellt ist die Thrombozytenfunktion [AU\*min] für die beiden Kollektive. Links für die HD-Patienten, rechts für die gesunden Probanden.  $n$  (HD) 60;  $n$  (Gesunde) 67. Das Resultat war höchst signifikant ( $p < 0.001$ )

## Ergebnisse

Die Thrombozytenfunktion, angegeben als [AU\*min], war beim HD-Patienten geringer als beim Gesunden. Das Resultat war signifikant,  $p < 0,001$ . Der Median (25 Perzentile, 75 Perzentile) der AUC beim HD-Patienten betrug 454,50 (255,25; 618,00). Der Mittelwert (Standardabweichung) lag bei 462,02 (266,54).

Die Thrombozytenfunktion vom gesunden Probanden betrug im Median (25 Perzentile; 75 Perzentile) 677,00 (458,00; 841,00). Der Mittelwert  $\pm$ Standardabweichung lag hier bei  $644,51 \pm 254,44$ .



### 3.2.3 Die AUC unterscheidet sich vor und nach NO / Sildenafilzugabe beim HD – Patienten und beim gesunden Probanden

Es sollte weiters in beiden Kollektiven untersucht werden, ob nach der Zugabe von NO/Sildenafil eine Verminderung der Thrombozytenfunktion erreicht wird.

Abbildung 19 zeigt den Mittelwert der AUC – Werte nativ im Vergleich zu den AUC – Werten nach Zugabe von NO / Sildenafil.

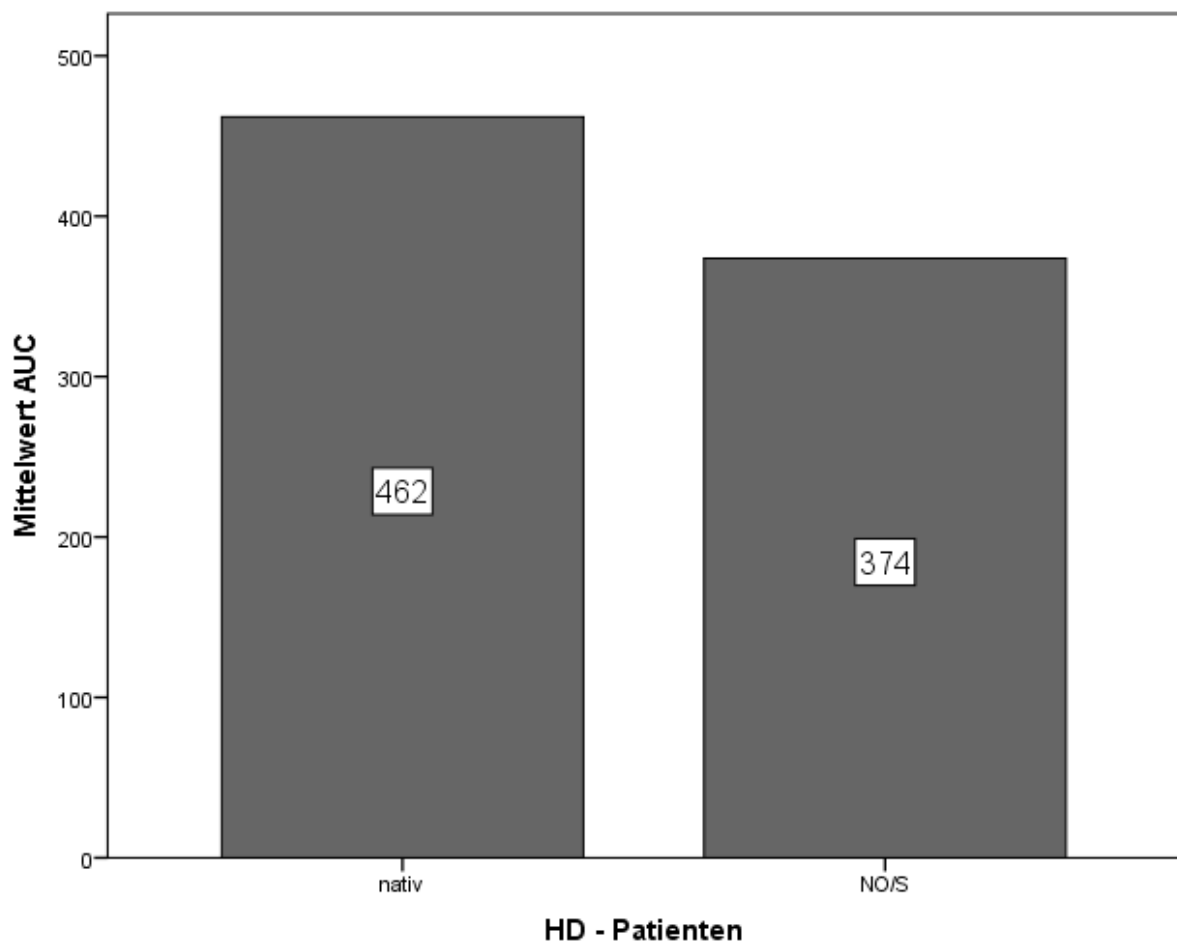
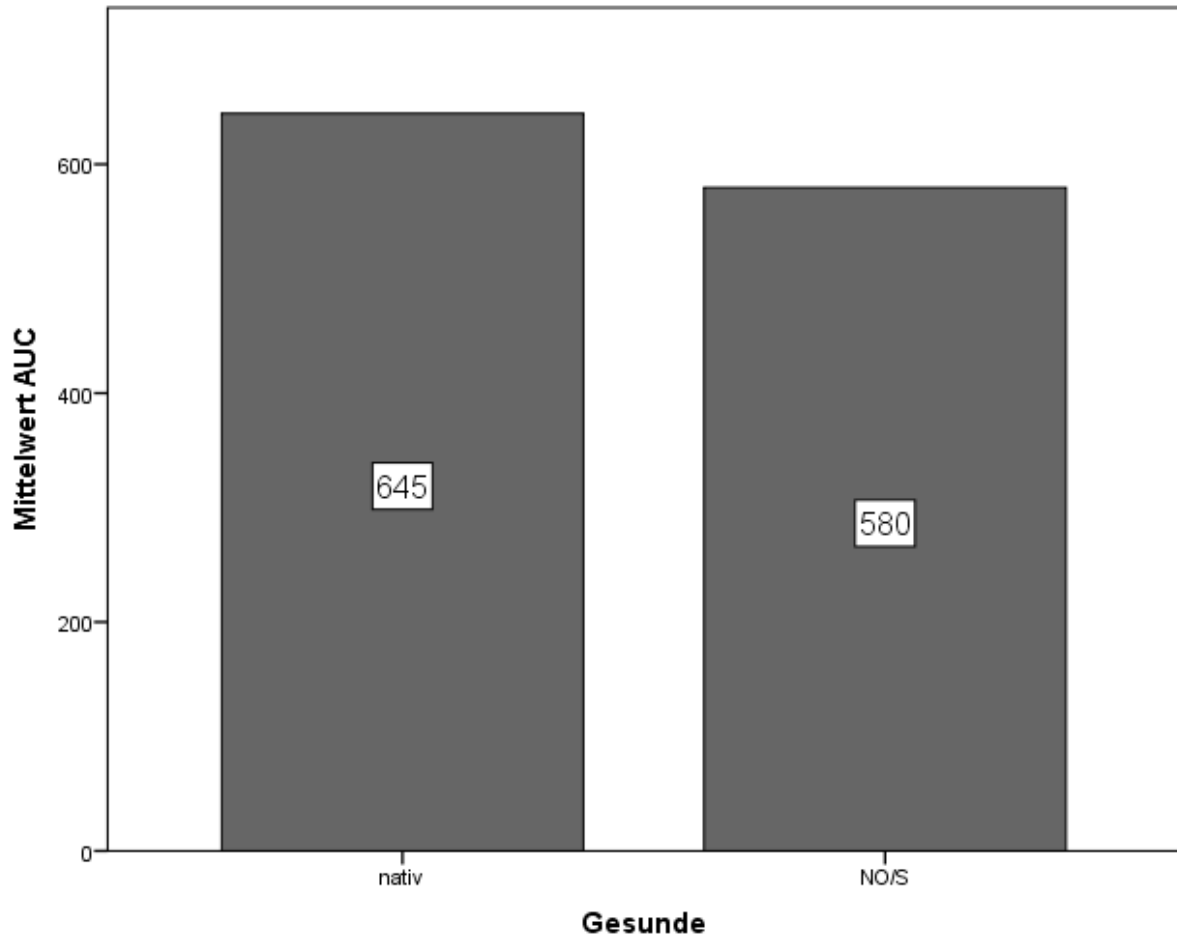


Abbildung 19: Thrombozytenfunktion [AU\*min] nativ und nach NO/Sildenafilzugabe

Die Thrombozytenfunktion [AU\*min] beträgt nativ 462, nach NO / Sildenafilzugabe 374. Der t-Test für abhängige Stichproben hat einen Wert von  $p < 0,001$  ergeben. Das Ergebnis ist somit höchst signifikant

## Ergebnisse

Abbildung 20 zeigt die Mittelwerte nativ und nach NO / Sildenafilzugabe im Kollektiv der gesunden Probanden.



*Abbildung 20: Mittelwert der Thrombozytenfunktion [AU\*min] nativ und nach NO/Sildenafilzugabe*

*Der Mittelwert der Thrombozytenfunktion [AU\*min] der gesunden Probanden beträgt nativ 645, nach NO / Sildenafilzugabe hingegen 580. Der t-Test für abhängige Stichproben hat einen Wert von  $p < 0,001$  ergeben. Das Ergebnis ist somit statistisch höchst signifikant.*

Diese Daten zeigen eine signifikante Reduktion der Thrombozytenfunktion nach der Zugabe von NO/Sildenafil in beiden Kollektiven.

### **3.3 Delta NO unterscheidet sich nicht signifikant zwischen HD-Patienten und Gesunden**

Unter Delta NO versteht man die Differenz der Thrombozytenfunktion [AU\*min] nativ abzüglich der Thrombozytenfunktion [AU\*min] nach NO/Sildenafilzugabe.

Das Ziel war, zu untersuchen, wie stark die Thrombozyten auf externe NO/Sildenafilzugabe ansprechen. Hierbei haben wir beim HD- Patienten im Vergleich zum Gesunden ein höheres Ansprechen auf externe NO/Sildenafilzugabe erwartet, da wir von einem endogenen Mangel und einer erhöhten Rezeptoraffinität und einer höheren Aktivität der Proteinkinasen ausgegangen sind.

### 3.3.2 Verteilung von Delta NO

Abbildung 21 zeigt die Verteilung von Delta NO beim HD-Patienten und 18 b jene beim gesunden Probanden.

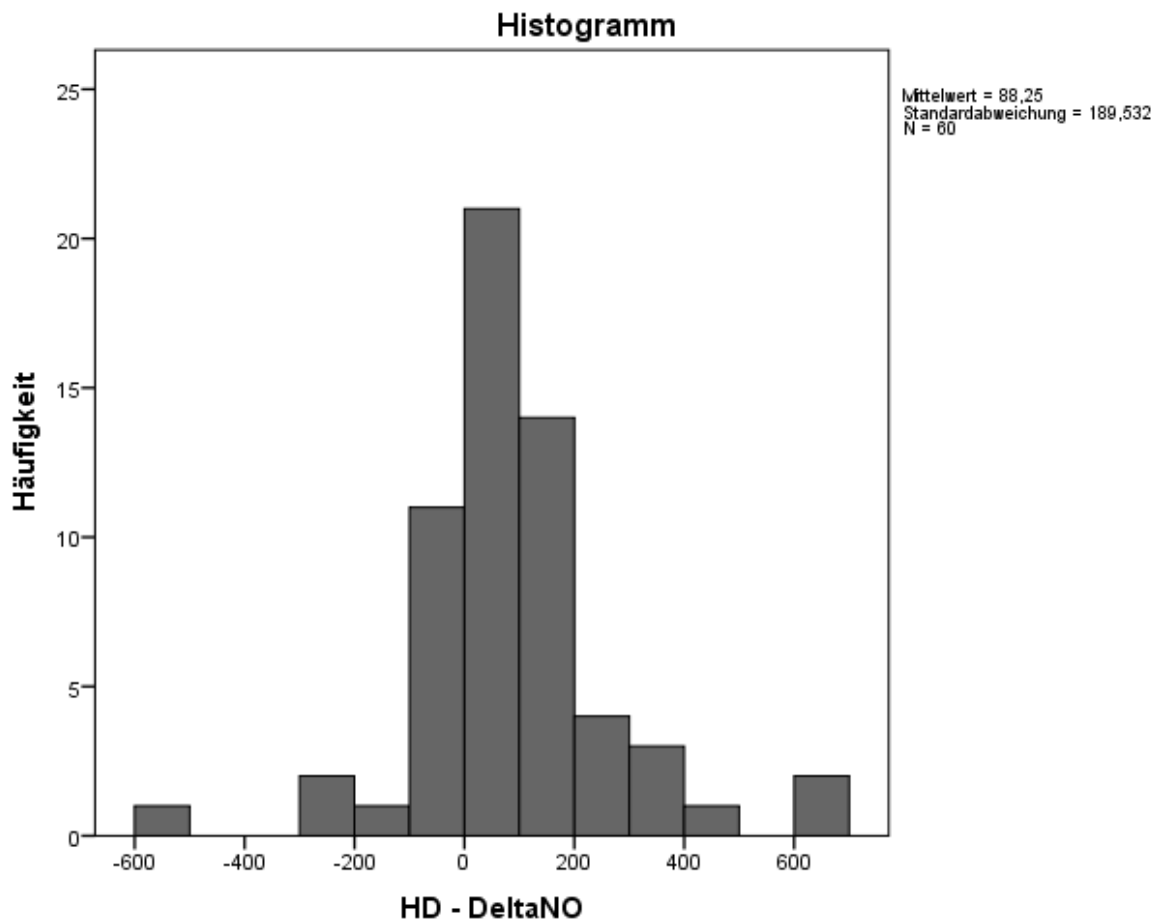


Abbildung 21: Verteilung von Delta NO beim HD – Patienten

# Ergebnisse

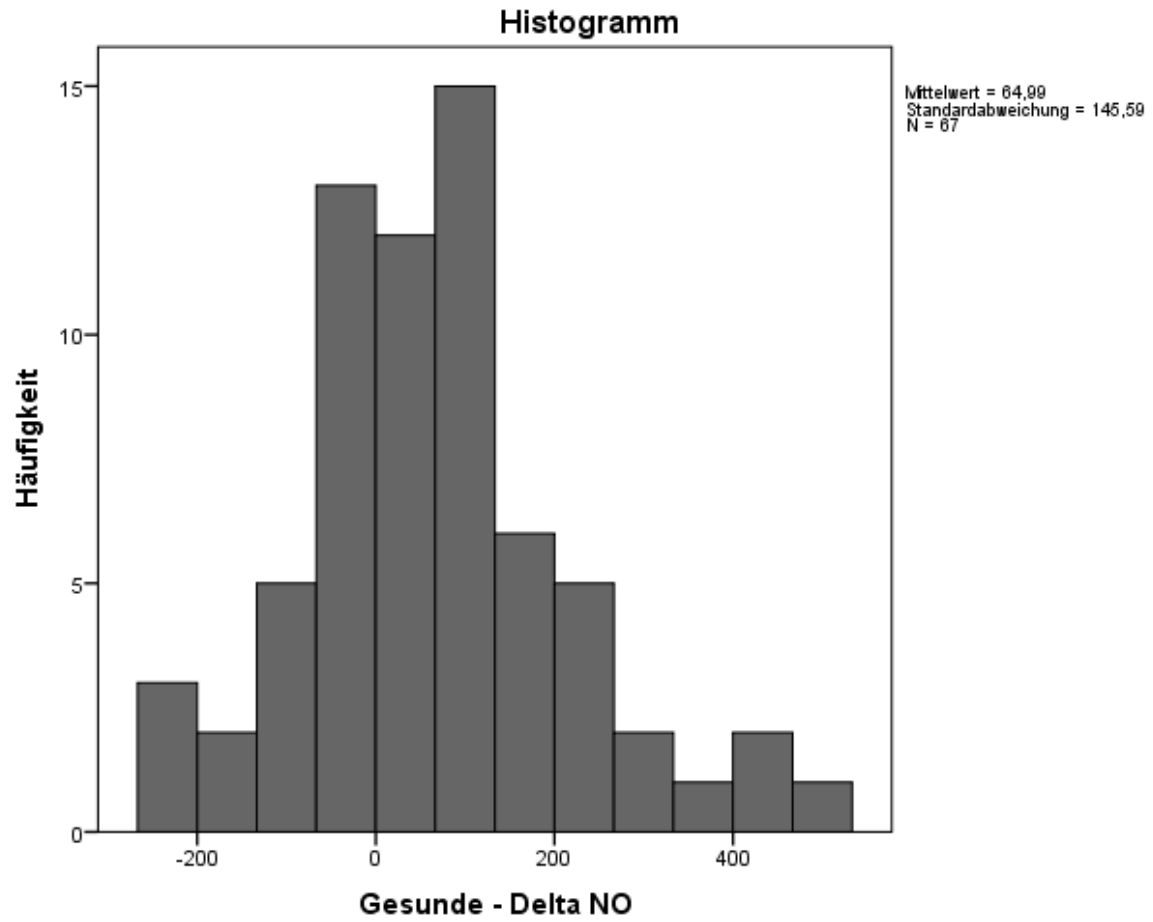


Abbildung 22: Verteilung von Delta NO beim gesunden Probanden

### 3.3.1 Delta NO beim HD – Patienten unterscheidet sich nicht vom Gesunden

Das berechnete Delta NO der HD-Patienten im Vergleich zu jenem der gesunden Probanden zeigt Abbildung 23.

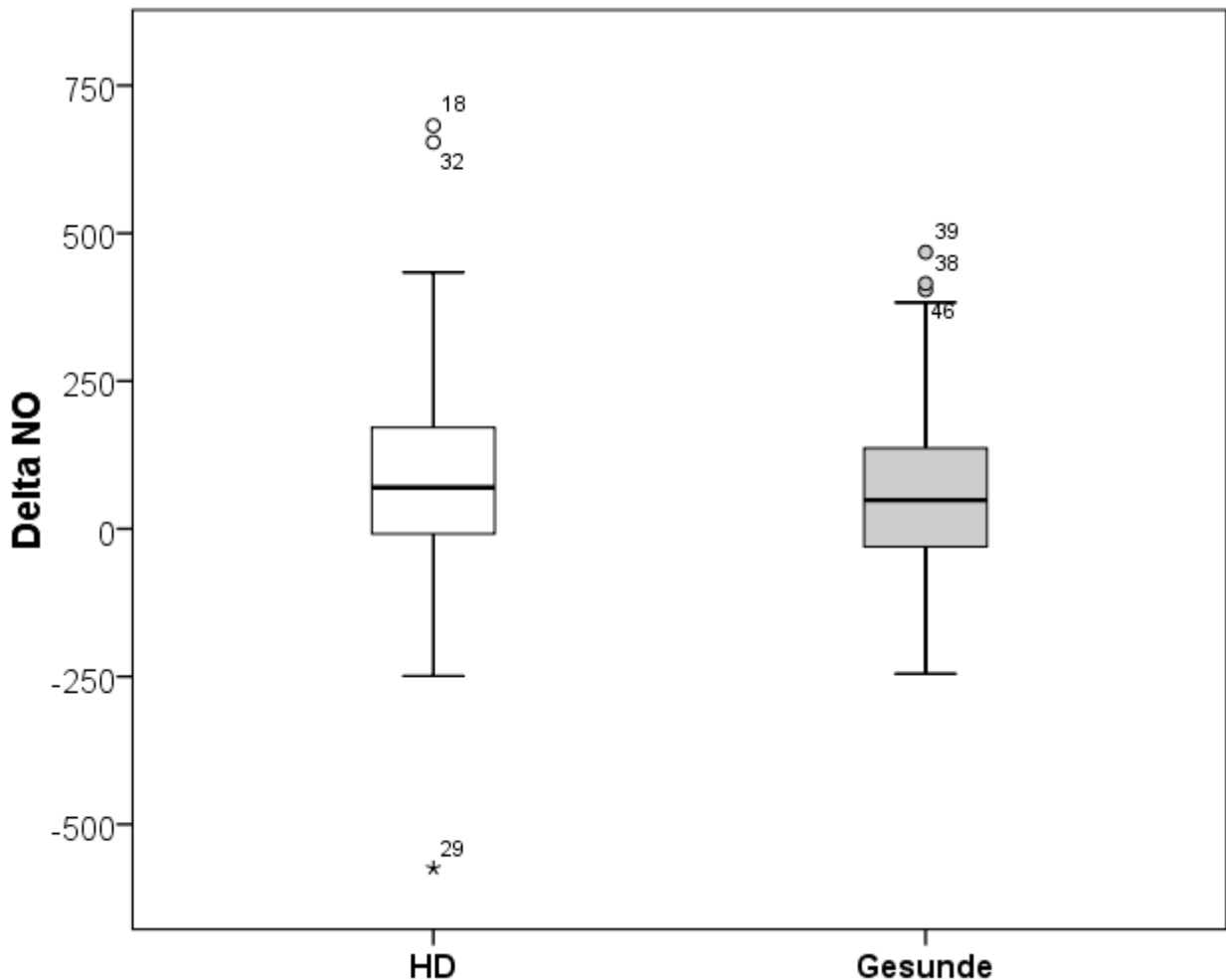


Abbildung 23: Delta NO HD-Patienten vs. Gesunde

Graphische Darstellung von Delta NO. Links bei den HD-Patienten, rechts bei den Probanden der Kontrollgruppe.  $n$  (HD) 60,  $n$  (Gesunde) 67. Das Ergebnis war statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ )

Wir hatten vermutet, dass das Ansprechen auf NO/Sildenafil beim HD – Patienten höher ist, als beim gesunden Probanden. Unsere Daten konnten diese Hypothese nicht bestätigen. Der mediane Wert (Interquartilbereich) für Delta NO betrug bei den Dialysepatienten 70,00 (-14,25; 172,75). Der Mittelwert (Standardabweichung) betrug 88,25 (189,53),  $p = 0,437$ .

## Ergebnisse

Bei den Probanden der Kontrollgruppe war das mediane Delta NO (25 Perzentile; 75 Perzentile) 56,00 (-26,00; 134,00). Der Mittelwert (Standardabweichung) lag bei 64,99 (145,59).

Der t-Test für unabhängige Stichproben hat einen p-Wert von 0,437 ergeben.

### **3.4 Verteilung und Vergleich der Thrombozytenzahl in HD-Patienten und gesunden Probanden**

Neben der Thrombozytenfunktion soll auch die Thrombozytenzahl beim HD – Patienten im Vergleich zum gesunden Probanden untersucht werden. Es soll geprüft werden, ob die Thrombozytenzahl beim HD – Patienten wie angenommen geringer ist.

#### **3.4.1 Verteilungsdiagramme der Thrombozytenzahl beim HD – Patienten und beim gesunden Probanden**

Abbildung 24 zeigt die Verteilung der Werte für die Thrombozytenzahl beim HD-Patienten, Abbildung 25 jene vom gesunden Probanden.



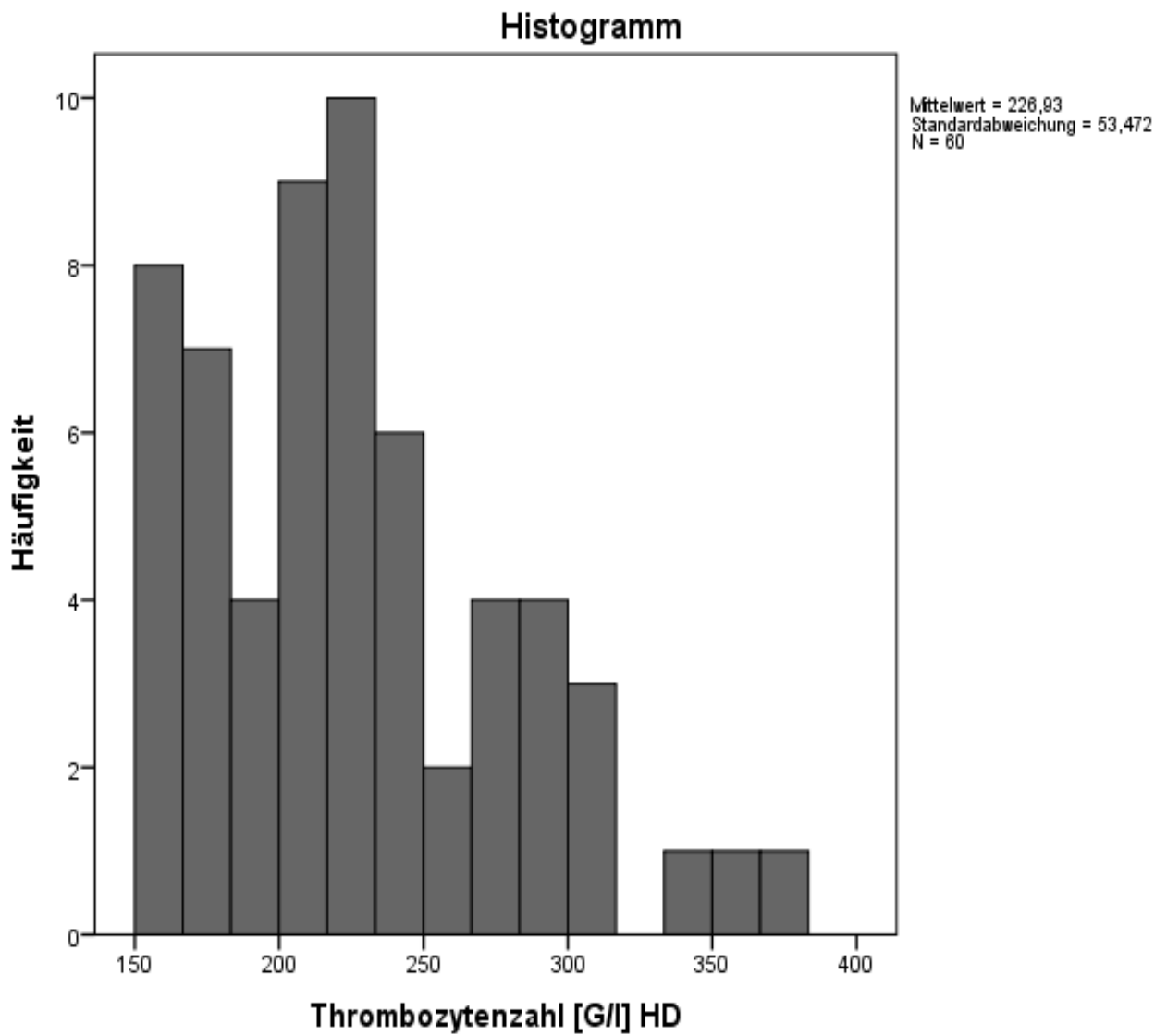
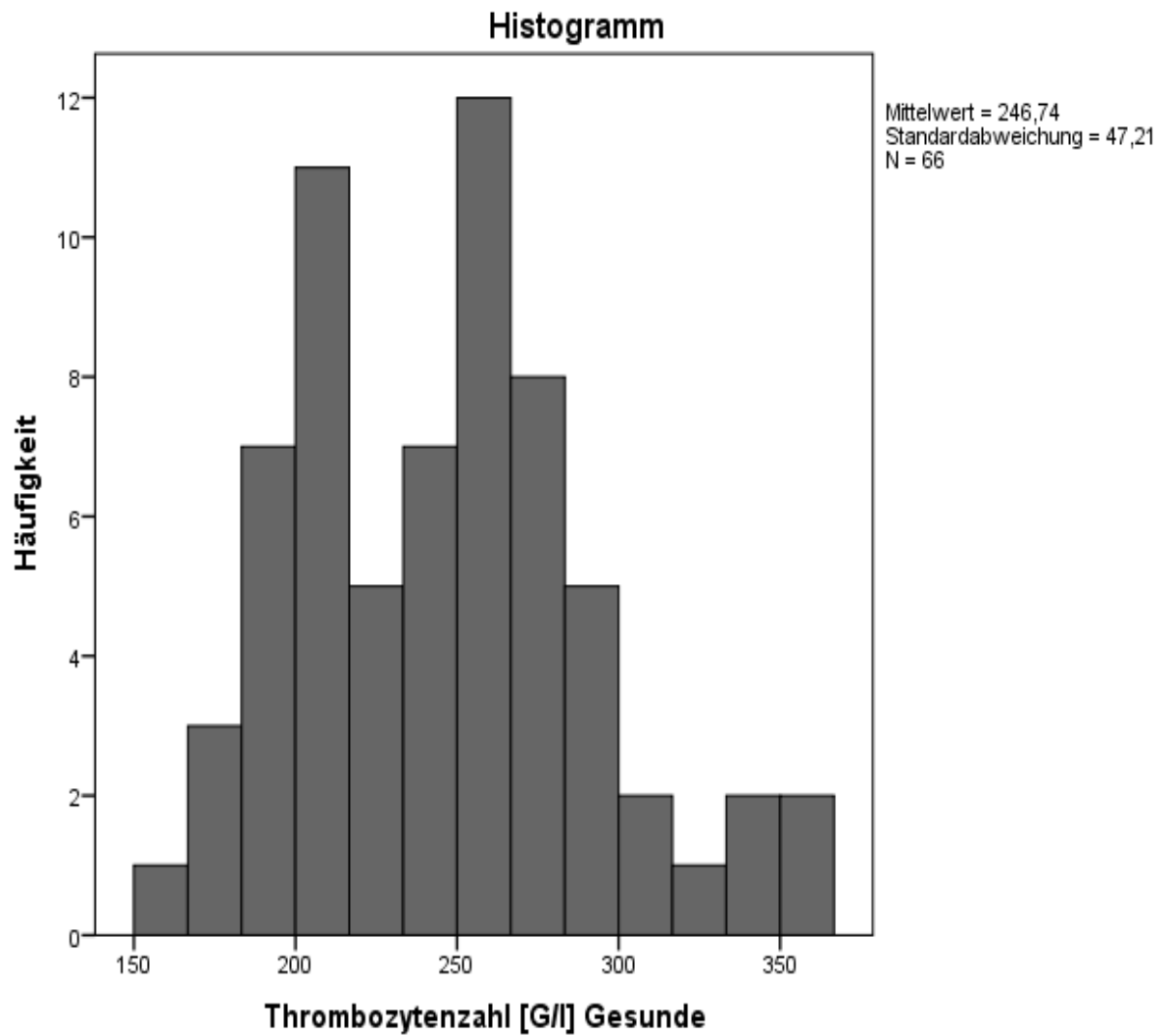


Abbildung 24: Histogramm für die Verteilung der Werte für die Thrombozytenzahl beim HD – Patienten

## Ergebnisse



*Abbildung 25: Histogramm für die Verteilung der Werte der Thrombozytenzahl beim gesunden Probanden*

### 3.4.2 Die Thrombozytenzahl ist beim HD-Patienten signifikant geringer im Vergleich zu jener vom gesunden Probanden

Es ist bekannt, dass Dialysepatienten zu geringeren Thrombozytenzahlen tendieren (55). Diesen Zusammenhang haben wir im Rahmen unserer Studie untersucht.

Die Mittelwerte der Thrombozytenzahl der Hämodialysepatienten im Vergleich jener der gesunden Probanden zeigt Abbildung 26.

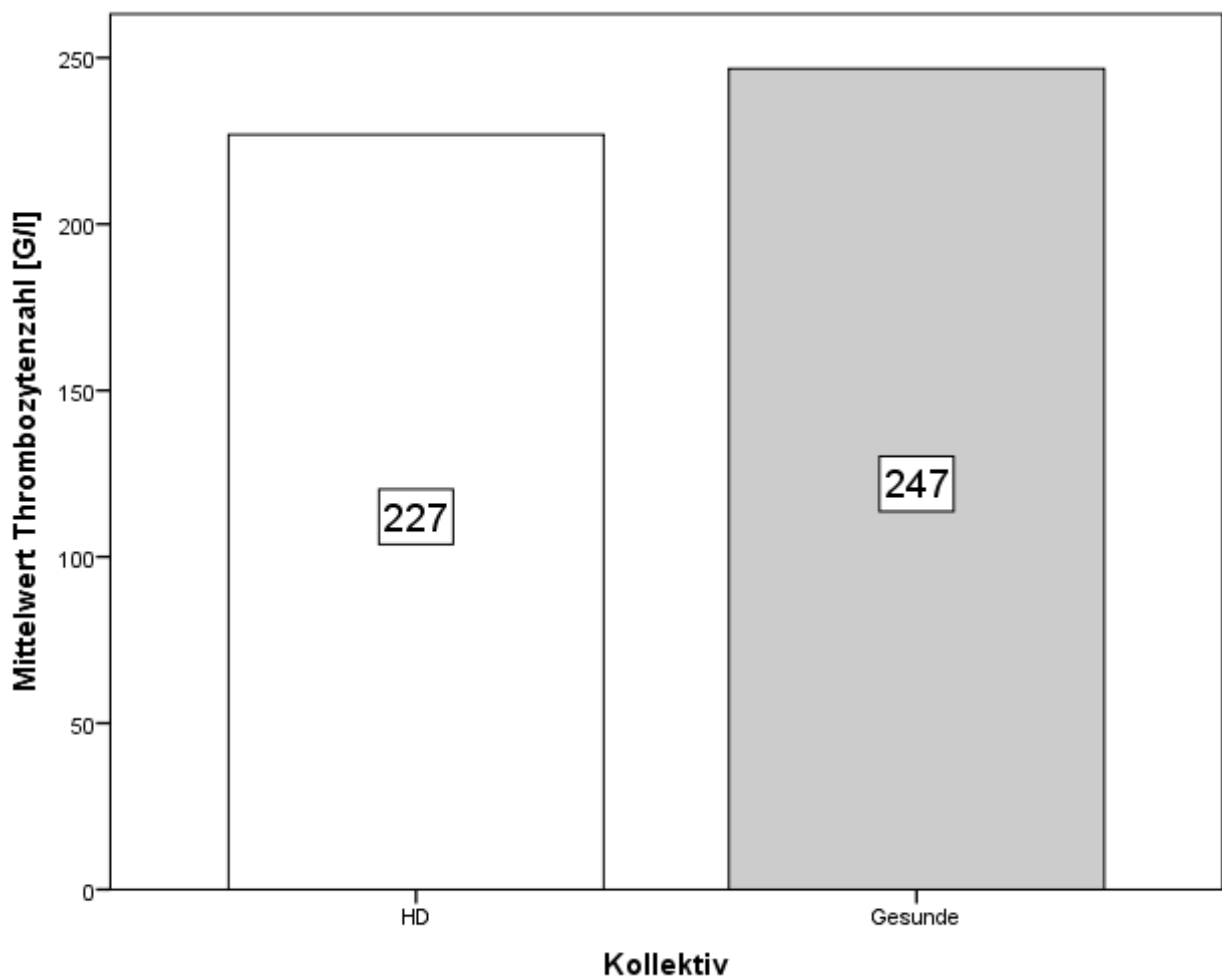


Abbildung 26: Thrombozytenzahl HD – Patienten vs. Gesunde

Darstellung der Thrombozytenzahl. Links jene der HD-Patienten, rechts jene der Probanden der Kontrollgruppe.  $n$  (HD) 60,  $n$  (Gesunde) 66.  $p < 0,05$ .

## Ergebnisse

Auch bei der Analyse der Thrombozytenzahl wurden die anfangs genannten Ausschlusskriterien angewandt. Ziel war hierbei die Untersuchung, wie sich isoliert die Niereninsuffizienz / die Dialysebehandlungen auf die Thrombozytenzahl auswirken.

Der Mittelwert der Thrombozytenzahl [G/l] ( $\pm$ Standardabweichung) der HD-Patienten betrug  $227 \pm 53,47$ . Der Median [G/l] (25 Perzentile; 75 Perzentile) lag bei 220,50 (184; 261).

Bei den Probanden der Kontrollgruppe lag der Mittelwert [G/l] ( $\pm$ Standardabweichung) bei  $247 \pm 47,21$ ). Der Median [G/l] (25 Perzentile; 75 Perzentile) betrug 245 (208; 274). Das Resultat war mit einem p-Wert von 0,029 signifikant.

Hieraus ergab sich demnach die Frage, ob eine reduzierte Thrombozytenzahl auch mit einer, wie oben beschrieben, reduzierten Thrombozytenfunktion im HD-Kollektiv assoziiert sein würde. Auf die Untersuchung nach Assoziationen wird in Abschnitt 3.5 eingegangen.

### **3.5 Assoziation der Thrombozytenfunktion mit Thrombozytenzahl, chronischer Inflammation und Querschnitts-Endpunkten.**

Im nachfolgenden Abschnitt sollen Korrelationen der Thrombozytenfunktion mit weiteren Parametern untersucht werden. Dafür wurde der Korrelations – Koeffizient nach Pearson ermittelt.

Zunächst soll untersucht werden, ob eine Assoziation der Thrombozytenfunktion mit der Thrombozytenzahl besteht.

Des Weiteren soll geprüft werden, ob ein Zusammenhang der Thrombozyten mit chronischer Inflammation besteht.

Auch das Vorhandensein einer Korrelation der Thrombozytenfunktion mit kardiovaskulären Hospitalisierungen soll untersucht werden.

### 3.5.1 Die Thrombozytenzahl korreliert mit der Thrombozytenfunktion

Unsere Analysen konnten eine signifikant reduzierte Thrombozytenfunktion und – zahl im HD – Patienten zeigen. Nun sollte untersucht werden ob eine Assoziation dieser beiden Untersuchungsparameter besteht.

Abbildung 27 zeigt graphisch eine relevante Korrelation zwischen Thrombozytenzahl und – funktion im Kollektiv der Hämodialysepatienten.

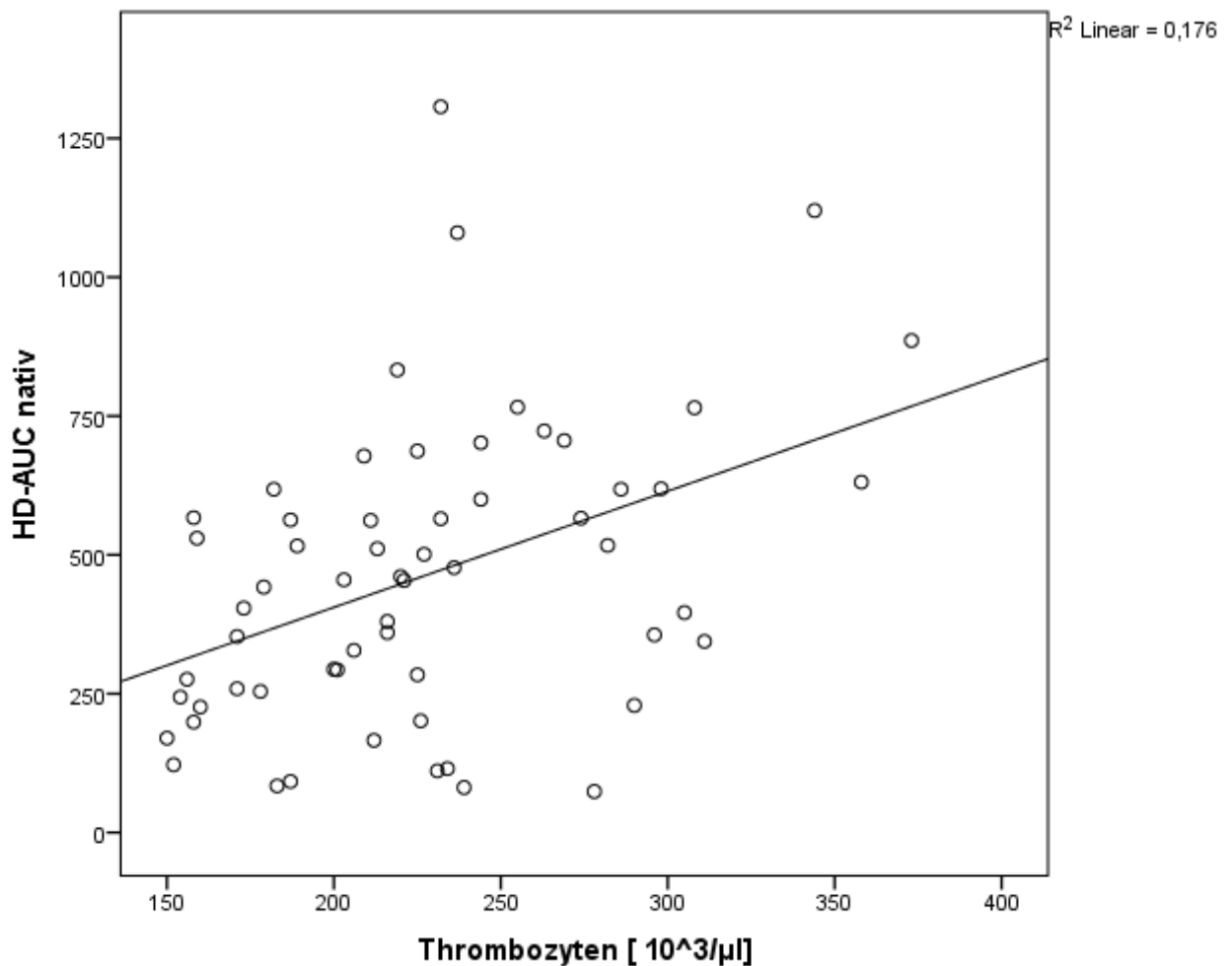


Abbildung 27: Korrelation der Thrombozytenfunktion (AUC) und der Thrombozytenzahl beim HD – Patienten

Der Pearson – Korrelationskoeffizient ( $r$ ) beträgt 0,42.  $p = 0,001$

## Ergebnisse

Die Korrelation zwischen Thrombozytenzahl und – funktion im Kollektiv der gesunden Probanden zeigt Abbildung 28.

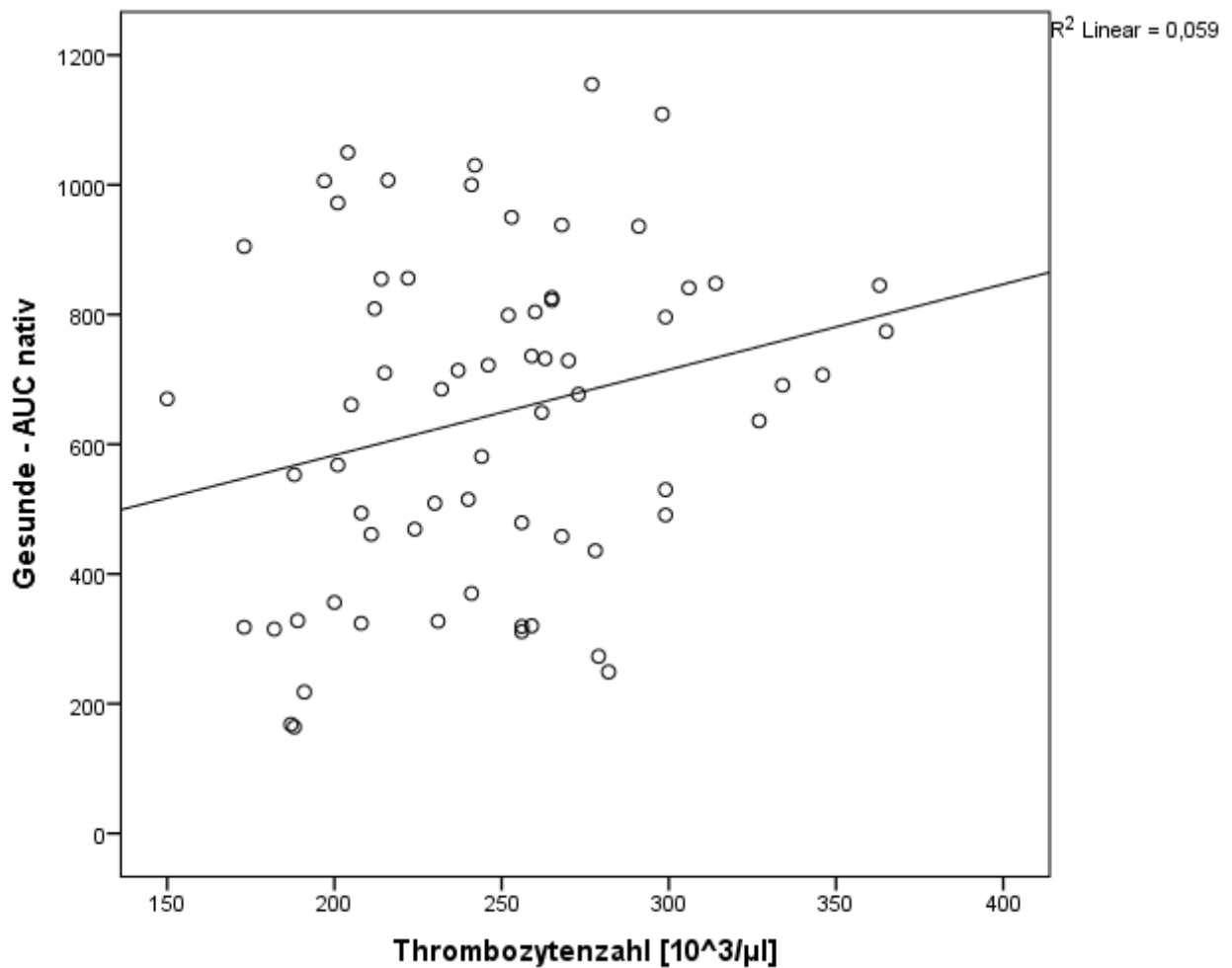


Abbildung 28: Korrelation der Thrombozytenfunktion (AUC) und der Thrombozytenzahl beim Gesunden

Der Pearson – Korrelationskoeffizient ( $r$ ) beträgt 0,24.  $p = 0,05$

Es besteht also ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Thrombozytenfunktion und der Thrombozytenzahl, beim HD – Patienten und auch beim Gesunden.

### **3.5.2 Es besteht ein Zusammenhang zwischen Thrombozytenfunktion und chronischer Inflammation**

Beim Dialysepatienten laufen aufgrund der sich ansammelnden Urämietoxine kontinuierlich Entzündungsreaktionen ab. Die Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle bei diesen Inflammationsprozessen, indem sie proinflammatorische Mediatoren freisetzen und so die Entzündungsreaktion aufrecht erhalten (20). Aus diesem Grund soll untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen der Thrombozytenfunktion und chronischer Inflammation besteht.

Als Inflammationsmarker wurde dabei CRP gewählt. Es wurde der Logarithmus berechnet. Im folgenden Abschnitt wird auf das Ergebnis eingegangen.



### 3.5.2.1 Die Thrombozytenfunktion korreliert beim HD – Patienten signifikant mit dem CRP – Wert

Abbildung 29 zeigt die statistisch signifikante Korrelation der Thrombozytenfunktion mit dem Entzündungsmarker CRP, angegeben als  $\ln(\text{CRP}+1)$ .

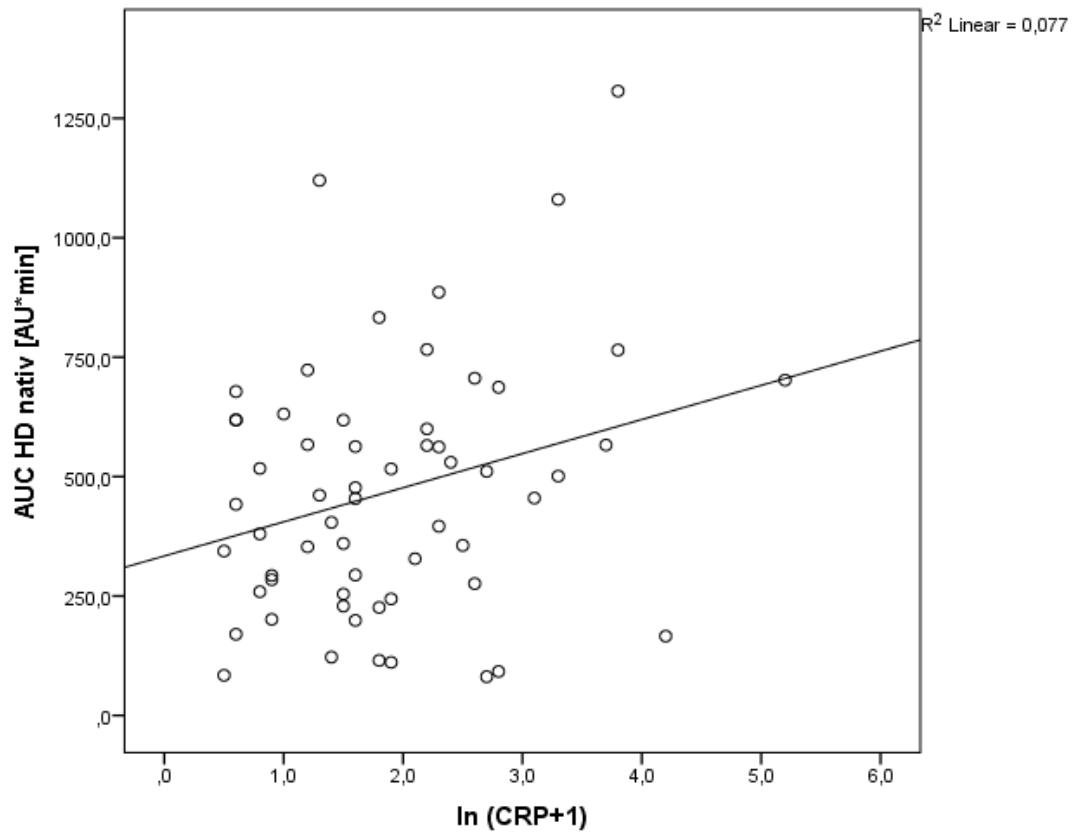


Abbildung 29: Korrelation der Thrombozytenfunktion mit CRP

*Graphische Darstellung der Korrelation der Thrombozytenfunktion nativ im Kollektiv der HD – Patienten mit dem CRP (berechnet als  $\ln(\text{CRP}+1)$ ). Pearson – Korrelationskoeffizient ( $r$ ) 0,28.  $p = 0,033$*

### 3.5.2.2 Die Thrombozytenfunktion ist im Kollektiv der HD – Patienten mit der Dauer der stationären Aufenthalte aufgrund einer Infektion assoziiert

Die Thrombozytenfunktion spielt eine wichtige Rolle bei Inflammationsprozessen. Es soll aus diesem Grund untersucht werden, ob eine Korrelation der Thrombozytenfunktion mit der stationären Aufenthaltsdauer aufgrund eines infektiösen Ereignisses besteht.

Die Korrelation der Thrombozytenfunktion mit der Hospitalisierungsdauer aufgrund eines infektiösen Ereignisses im Zeitraum von 24 Monaten zum Zeitpunkt der Datenanalyse zeigt Abbildung 30.

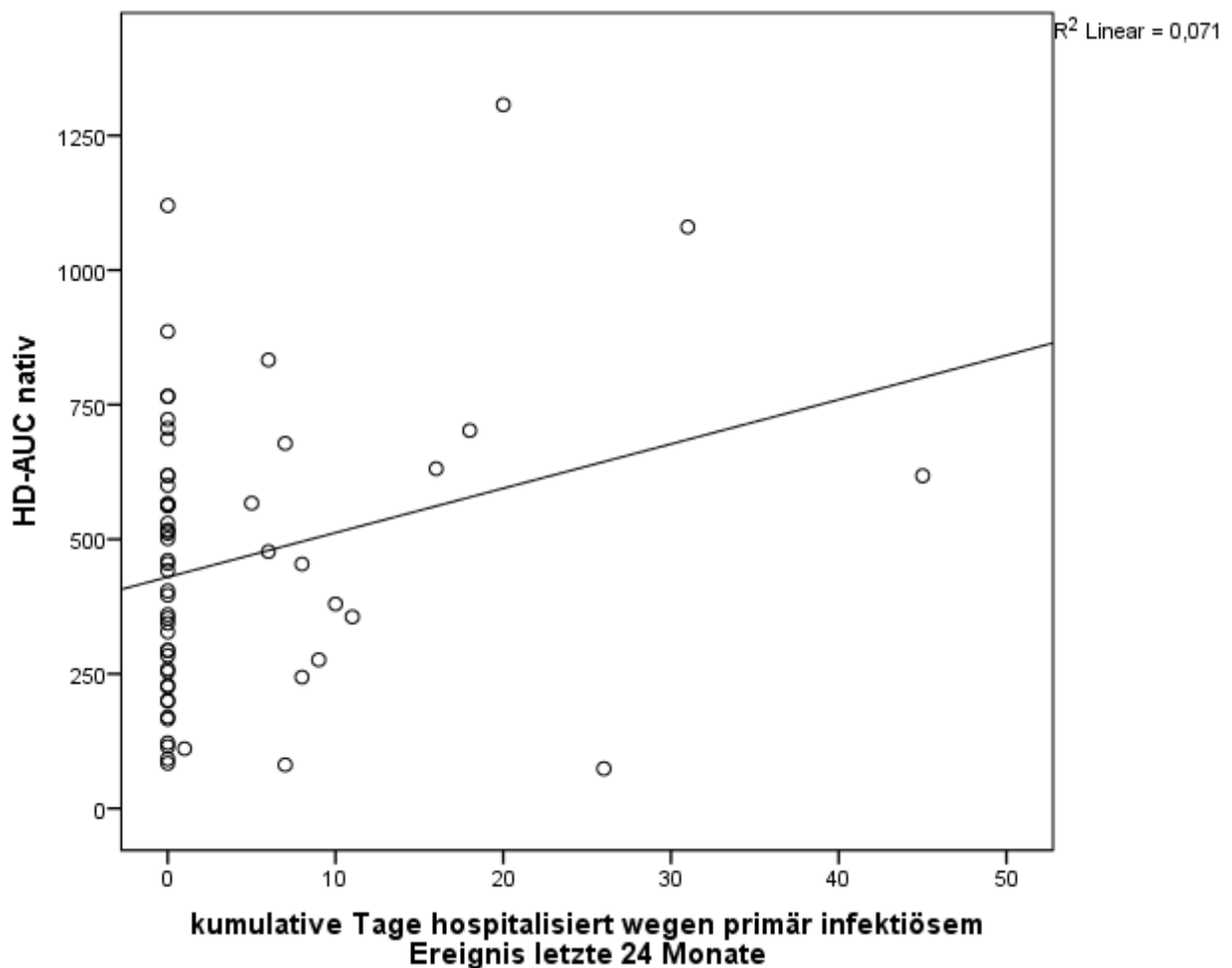
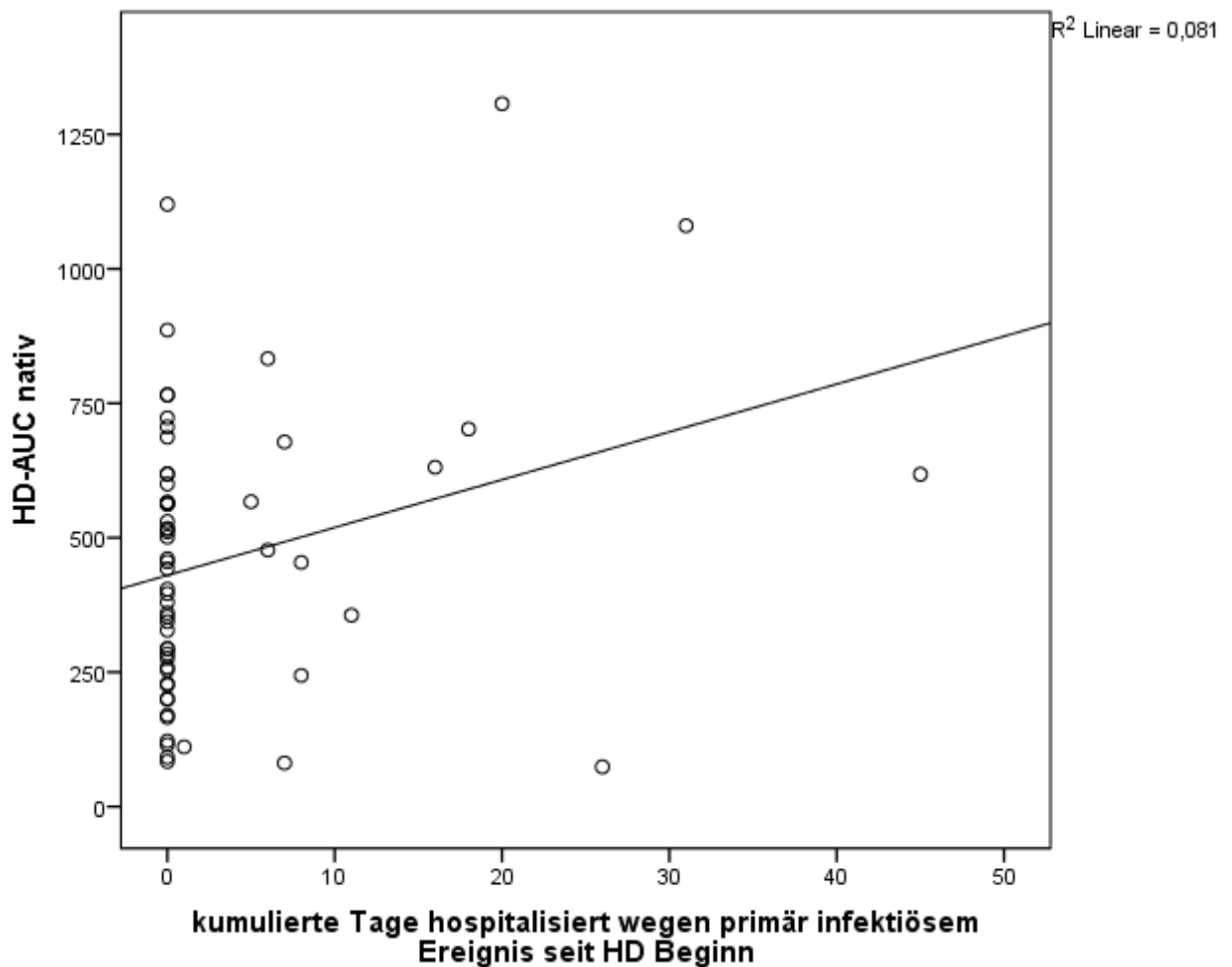


Abbildung 30: Korrelation der Thrombozytenfunktion mit Hospitalisierung wegen Infektion

## Ergebnisse

*Darstellung der Korrelation der Thrombozytenfunktion mit der Dauer der stationären Aufenthalte, welche durch eine Infektion bedingt sind. Pearson – Korrelationskoeffizient (r) 0,27.  $p = 0,04$*

Auch die Hospitalisierungsdauer aufgrund eines infektiösen Ereignisses seit HD – Beginn ist signifikant mit der Thrombozytenfunktion korreliert. Graphisch zeigt diesen Zusammenhang Abbildung 31.



*Abbildung 31: Korrelation der Thrombozytenfunktion mit Hospitalisierung wegen Infektion seit HD – Beginn*

*Korrelation der Thrombozytenfunktion mit den summierten Tagen einer stationären Aufnahme aufgrund eines infektiösen Ereignisses seit HD – Beginn. Pearson – Korrelationskoeffizient (r) 0,29.  $p < 0,05$*

## Ergebnisse

Die durchgeführten Korrelationsanalysen zeigen einen Zusammenhang der Thrombozytenfunktion mit stationären Aufenthalten aufgrund eines infektiösen Ereignisses.

So wurde ein Korrelationskoeffizient ( $r$ ) von 0,27 für die stationären Aufenthalte in den letzten 24 Monaten zum Zeitpunkt der Datenanalyse ermittelt. In diesem Fall bleibt die Korrelation stabil, auch bei Adjustierung auf die Thrombozytenzahl.  $r = 0,27$ ,  $p = 0,036$ . Der Korrelationskoeffizient ( $r$ ) für die stationären Aufnahmen seit HD – Beginn beträgt hingegen 0,29.

### **3.5.3 Die Thrombozytenfunktion ist mit der Dauer der stationären Aufenthalte aufgrund eines kardiovaskulären Ereignisses assoziiert**

Es ist bekannt, dass beim HD- Patienten eine höhere Thromboseneigung besteht. Gefürchtete Manifestationen sind Myokardinfarkt und Apoplex (9). Aus diesem Grund soll untersucht werden, ob eine Korrelation der Thrombozytenfunktion mit der Dauer stationärer Aufenthalte aufgrund eines kardiovaskulären Ereignisses besteht. Dabei wurden Klinikaufenthalte mit folgenden Entlassungsdiagnosen erhoben: Myokardinfarkt, Apoplex, Lungenarterienembolie, peripher arterielle Verschlusskrankheit.

Es besteht eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Thrombozytenfunktion und der Hospitalisierungsdauer aufgrund eines kardiovaskulären Ereignisses, wie Abbildung 32 veranschaulicht. Die erhobene Zeitspanne entspricht dabei jener vom Einschluss in die Studie bis zum definierten Endpunkt am 22.11.2017. Bei der Interpretation ist hierbei zu beachten, dass ein geringerer Wert für die Thrombozytenfunktion kein geringeres Risiko für thrombotische Ereignisse ausdrückt. Grund hierfür ist die beim HD-Patienten höhere Blutungsneigung, welche mit geringeren Thrombozytenfunktionswerten assoziiert ist.

## Ergebnisse

Die Korrelation der Thrombozytenfunktion mit der kumulativen Dauer der stationären Aufenthalte aufgrund eines kardiovaskulären Ereignisses zeigt Abbildung 32.

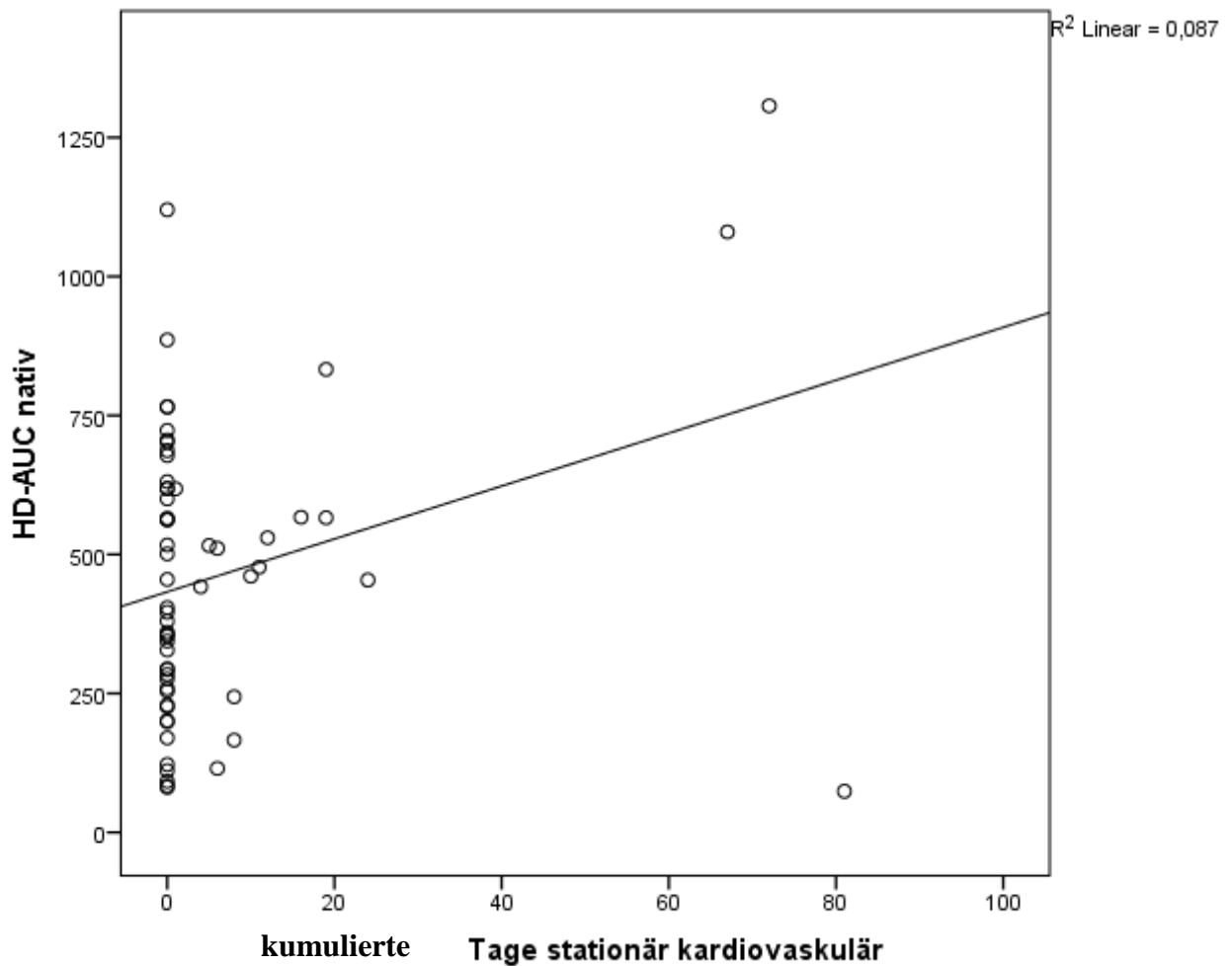


Abbildung 32: Korrelation der Thrombozytenfunktion mit Hospitalisierung wegen kardiovaskulärem Event

Graphische Darstellung der Korrelation zwischen der Thrombozytenfunktion und der kumulierten Tage einer stationären Aufnahme wegen eines kardiovaskulären Events. Pearson – Korrelation ( $r$ ) 0,3.  $p = 0,022$

Die Korrelationsanalyse nach Pearson hat eine signifikante Korrelation der Thrombozytenfunktion im HD – Patienten mit der stationären Aufenthaltsdauer aufgrund eines kardiovaskulären Ereignisses gezeigt. Der Korrelationskoeffizient ( $r$ ) betrug 0,3.

## 4. Diskussion

Das Management der Blutgerinnung stellt beim HD-Patienten eine Herausforderung dar. Einerseits besteht eine erhöhte Neigung zu thrombotischen Ereignissen, andererseits ist auch die Blutungsneigung erhöht.

Routinemäßig gemessene Laborparameter reichen oft nicht aus, um klinischen Manifestationen vorzubeugen.

Die Thrombozytenfunktionsmessung mittels Multiplate bietet eine gute Möglichkeit, eine Aussage über den Funktionszustand der Thrombozyten zu erhalten.

Die vorliegenden Untersuchungen dienen der Bestimmung der Thrombozytenfunktion beim Dialysepatienten. Ziel hierbei ist der Vergleich der Thrombozytenfunktion von Dialysepatienten mit gesunden Probanden.

Wir konnten eine signifikant geringere Thrombozytenfunktion mittels Multiplate nachweisen. Diese Ergebnisse bestätigen die angenommene Hypothese und zeigen, dass Multiplate als Messinstrument für diese Fragestellung geeignet ist.

Zudem sollten weitere Aspekte in die Untersuchung integriert werden. Interessant war hierbei die Frage, wie sich die externe NO/Sildenafil Zugabe auf die Thrombozytenfunktion auswirkt. Beim HD-Patienten wurde ein endogener NO-Mangel erwartet. Einen Beitrag hierzu liefert einerseits der Verbrauch, durch die abnorme Thrombozytenaktivierung durch die Dialyse bedingt. Andererseits gibt es Inhibitoren für die NO – Synthese (ADMA) (56), welche beim Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz identifiziert werden konnten. Die Annahme war folglich, dass HD-Patienten stärker auf die externe Zugabe von NO/Sildenafil ansprechen.

Wir konnten zeigen, dass die Thrombozytenfunktion nach Zugabe von NO/Sildenafil sowohl bei den HD – Patienten als auch bei den gesunden Probanden geringer ist. Jedoch konnten wir nicht, wie angenommen, ein Unterschied im Ansprechen auf NO/Sildenafil nachweisen. Die HD- Patienten haben also nicht stärker auf das NO/Sildenafil angesprochen. Daraus können wir schlussfolgern, dass es hierfür wahrscheinlich einen anderen Grund gibt. Grund hierfür kann eine verminderte Aktivität der löslichen Guanylatcyclase (sGC) sein, was dazu führt, dass das NO schlechter verwertet wird. Auch die Proteinkinasen, welche im Endeffekt die Thrombozytenfunktionshemmung bewirken, können in ihrer Funktion vermindert sein.

Abschließend wurde evaluiert, ob die gemessenen Thrombozytenfunktionswerte einen Zusammenhang mit definierten Untersuchungsparametern aufweisen. Dabei wurde die Thrombozytenfunktion mit der Thrombozytenzahl verglichen. Es wurde weiters untersucht, ob eine Korrelation zwischen der Thrombozytenfunktion und der bisherigen stationären Aufnahme wegen infektiöser, sowie kardiovaskulärer Ereignisse besteht.

Hierbei konnten wir zeigen, dass die Thrombozytenfunktion mit der Thrombozytenzahl zusammenhängt.

Auch in Bezug auf die Korrelation der Thrombozytenfunktion mit chronischer Inflammation konnten wir einen Zusammenhang zeigen.

Ebenfalls belegen unsere Daten einen Zusammenhang der Thrombozytenfunktion mit der stationären Aufenthaltsdauer aufgrund kardiovaskulärer Ereignisse.

### **4.1 Thrombozytenfunktion [AU\*min] im Gruppenvergleich**

Unsere Analysen haben beim HD-Kollektiv eine signifikant geringere Thrombozytenfunktion [AU\*min] im Vergleich zum Gesunden ergeben. Der Median lag beim HD-Kollektiv bei 454,5 und bei den gesunden Probanden bei 677,0.

Als Ursache hierfür nehmen wir einen durch die Dialysesitzungen endogenen Verbrauch der Thrombozyten an. Dieser Verbrauch bedingt eine Reduktion der Thrombozyten, welcher sich in einer reduzierten Thrombozytenzahl, wie auch durch unsere Daten gezeigt, und in einer reduzierte Thrombozytenfunktion auswirkt.

NO und Sildenafil bewirken eine Thrombozytenfunktionshemmung beim HD – Patienten und auch beim gesunden Probanden, wie unsere Daten zeigen.

Einen Beitrag zur reduzierten Thrombozytenfunktion liefert sicherlich die reduzierten Thrombozytenzahl im HD- Patienten. Dabei fiel auf, dass die Thrombozytenzahlen dennoch im Normbereich lagen. Aus diesem Grund nehmen wir andere Faktoren an, welche die geringere Thrombozytenfunktion im HD-Patienten erklären könnten. Dazu gehören v.a. die Urämietoxine, welche beim HD- Patienten in einer erhöhten Konzentration auftreten (57) Faktoren, welche zu einer reduzierten Thrombozytenfunktion beitrage , könnten die renale Anämie, Antikoagulation während

der Dialyse und Medikamenteneinnahme (z.B. NSAIDs) sein. Gemäß Kaw et al. sind diese Faktoren ursächlich für die reduzierte Thrombozytenfunktion (4).

Unsere Resultate decken sich mit jenen bereits publizierter Studien. AGGARWAL et al. haben Thrombozytenfunktionsmarker beim Dialysepatienten untersucht und anschließend einen Vergleich mit gesunden Probanden durchgeführt. Als Marker wurde P-Selectin, ein Degranulationsprodukt der  $\alpha$ -Granula, verwendet. Die Messungen erfolgten mittels Durchflusszytometrie. Auch hier war das Resultat eine signifikant geringere Thrombozytenfunktion beim HD-Patienten (1).

Weitere Untersuchungen haben sich mit dem Verlauf der Thrombozytenfunktion während einer Dialysesitzung beschäftigt. Als Marker diente P-Selectin, als Messmethode die Durchflusszytometrie (siehe Tabelle im Anhang). Beobachtet wurde, dass die Thrombozytenaktivierung am Beginn der Dialysesitzung sehr hoch war. Gegen Ende der Dialysesitzung waren die P-Selectinlevel hingegen unter denen des Ausgangsniveaus abgesunken. Diese Messergebnisse sprechen für einen durch die Dialyse bedingten Verbrauch der Degranulationsprodukte. Es wurde auch die intradialytische Änderung von Platelet factor 4 (PF4) und Beta-Thromboglobulin ( $\beta$ -TG), weitere Degranulationsprodukte, untersucht. Die Untersuchungsergebnisse deckten sich mit jenen vom P-Selectin (58).

Es wurde auch die Struktur der Thrombozyten beim Dialysepatienten untersucht. Im Fokus standen dabei die GP-Rezeptoren Ib (wichtig für die Interaktion mit vWF und Gefäßendothel) und die GPIIb/IIIa-Rezeptoren (wichtig für die Interaktion mit Fibrinogen). Als Messmethode diente die Durchflusszytometrie. Das Ergebnis war eine reduzierte Expression von GPIb und eine Funktionsminderung vom GPIIb/IIIa-Rezeptor (10). Folglich sind die Thrombozytenadhäsion und – aggregation und somit die Thrombozytenfunktion durch die Rezeptorveränderungen gestört. Durchflusszytometrische Untersuchungen der Zytoskelettproteine Aktin und Myosin konnten eine verminderte Aktivität der Thrombozytenfunktion beim Hämodialysepatienten zeigen (10). Dies spricht für Thrombozytenmotilitätsstörungen. BONOMINI et al. haben die Expression von P-Selectin an der Oberfläche der Leukozyten untersucht. Ziel war der Nachweis der Interaktion der Thrombozyten mit den Leukozyten und deren Konsequenz. Die Leukozyten-Thrombozytenaggregate wurden mit dem



Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies korreliert. Das Ergebnis war, dass Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate mit den reaktiven Sauerstoffspezies positiv korrelierten (59). Bei den vorher beschriebenen publizierten Untersuchungen, welche sich mit der Thrombozytenfunktion beim HD-Patienten beschäftigt haben, wurde als Messmethode die Durchflusszytometrie bevorzugt.

Die höchst signifikanten Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Impedanzaggregometrie für diese Untersuchung geeignet ist. Als Vorteile zu erwähnen sind die vergleichsweise einfache Bedienung und der verhältnismäßig geringe Zeitaufwand. Es können so in einem Untersuchungsgang bis zu fünf Proben gleichzeitig gemessen werden und höhere Probandenzahlen realisiert werden.

Die Untersuchungsergebnisse lassen sich pathophysiologisch gut erklären. Die Struktur der Thrombozyten ist beim HD-Patienten gestört. Diese äußern sich durch Veränderungen der Strukturoberfläche (CD 62 bzw. P-Selectin, GPIb, GPIIb/IIIa), der Zytoskelettproteine (Aktin, Myosin) und der intrazellulären Proteine (u.a. PF4 und  $\beta$ -TG). Ein interessanter Aspekt ist das dialysebedingt gehäufte Auftreten von Leukozyten-Thrombozytenaggregaten. Die Assoziation mit den reaktiven Sauerstoffspezies könnte ein weiterer Risikofaktor für eine KHK sein.

Zu erwähnen ist, dass wir die Blutentnahmen für die Thrombozytenfunktionsmessung vor der jeweiligen Dialysesitzung durchgeführt haben. Hier wäre ein Vergleich der Thrombozytenfunktion vor und nach der Hämodialyse interessant. Das Ziel hierbei ist es, zu untersuchen, wie groß der Einfluss der Urämietoxine auf die Thrombozytenfunktion ist. Wir nehmen nämlich an, dass die Urämietoxine ursächlich für die reduzierte Thrombozytenfunktion sind. Somit sollten die Werte für die Thrombozytenfunktion nach der Hämodialyse, bei welcher die Urämietoxine entzogen werden, höher als vorher sein. Andererseits bedingen die Dialysesitzungen eine Abnahme der Thrombozytenfunktion. Die Ermittlung der Differenz AUC vor HD und AUC nach HD könnte Aufschluss geben, welcher Effekt hierbei überwiegt.

## 4.2 Ansprechen auf NO/Sildenafil im Gruppenvergleich

NO ist ein endogener Inhibitor der Thrombozytenfunktion. Es wird u.a. vom Gefäßendothel freigesetzt, um einer zu starken Thrombozytenaktivierung entgegenzuwirken.

Im Rahmen unserer Untersuchungen haben wir die Reaktion der Thrombozyten auf externe NO/Sildenafil-Zugabe ermittelt. Dazu haben wir die Differenz der beiden AUC-Werte, also AUC nativ abzüglich AUC mit NO/Sildenafil, gebildet.

Der Median von Delta NO beim HD-Patienten lag bei 70, jener der Probanden der Kontrollgruppe bei 56. Das Ergebnis war statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

Dieses Resultat bedeutet, dass HD-Patienten nicht stärker auf externe NO/Sildenafil - Gabe ansprechen im Vergleich zum Gesunden.

Die erhöhte Blutungsneigung beim HD – Patienten kann durch die NO – Signalkaskade erklärt werden. Dass die endogene Generation von NO beim HD-Patienten im Vergleich zum Gesunden erhöht ist, haben NORIS et al. und AIELLO et al. gezeigt (60), (61). Bezüglich des Pathomechanismus konnte eine urämietoxinbedingte Aktivierung der NO-Synthase nachgewiesen werden. Ferner konnte eine Induzierbarkeit durch Endotoxine und Zytokine, welche beim Dialysepatienten in erhöhter Konzentration auftreten, festgestellt werden (60). Weiters wurden beim HD-Patienten erhöhte cGMP-Levels im Vergleich zum gesunden Probanden ermittelt (60). Folge hiervon ist eine vermehrte Hemmung der Thrombozytenadhäsion und - aggregation. Hieraus folgt eine stärkere Blutungsneigung (60).

Andererseits gibt es wissenschaftliche Daten, welche einen Mangel des vasodilatatorischen Effektes im Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz belegen. Einen Beitrag hierzu liefern endogene, im urämischen Blut vorkommende, NO-Synthase-Inhibitoren, beispielsweise Assymetric Di-methylarginin (ADMA) (56). Des Weiteren sind reduzierte cGMP – Level im Urin bei erhöhter Expression der renalen löslichen Guanylat-Zyklase (sGC) suggestiv für eine Dysfunktion der sGC (56). Diese in Kombination mit oxidativem Stress liefern einen entscheidenden Beitrag zu Hypertension und Fortschreiten der chronischen Niereninsuffizienz (56). P-Cresyl Sulfat (PCS), ein proteingebundenes Urämietoxin, konnte als unabhängiger Prädiktor für Mortalität und

kardiovaskuläre Erkrankungen identifiziert werden (62). Als Erklärung wurde eine Interferenz von PCS mit der sGC angenommen (62).

Der NO-Pathway ist aus therapeutischer Sicht relevant. Neben den vielseitig eingesetzten NO-Donatoren wie Nitroglycerin und Molsidomin werden sGC – Stimulatoren und – Aktivatoren genauer untersucht. Diese wirken vasodilatatorisch, antiproliferativ, antifibrotisch und antiinflammatorisch. Zudem reduzieren sie das Fortschreiten der chronischen Niereninsuffizienz und der diabetischen Nephropathie (63). Kalk et al. haben BAY 58-2667, einen NO- unabhängigen Aktivator der sGC genauer untersucht (64). Additiv konnte eine antihypertensive und antiproteinurische Wirkung der PDE – 5 Inhibitoren nachgewiesen werden (64).

Unsere Annahme war, dass HD- Patienten verstärkt auf externe NO-Sildenafilzugabe ansprechen. Grund für diese Annahme ist ein endogener Verbrauch durch die abnorme Thrombozytenaktivierung, welche durch die Dialyse bedingt ist. Hier nahmen wir eine höhere Empfindlichkeit der löslichen Guanylatcyclase und der Proteinkinasen im Signalweg an. In der vorliegenden Studie wurde mehr Substrat der sGC zur Verfügung gestellt, sowie der cGMP-Abbau gestoppt. Somit wurde der Effekt von NO potenziert. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die NO/Sildenafilzugabe die Thrombozytenfunktion nicht stärker als bei der Kontrollgruppe beeinflusst werden konnte. Diesen Zusammenhang kann teilweise dadurch erklärt werden, dass im HD-Patienten eine vermehrte Aktivität der NO-Synthase – Inhibitoren und eine reduzierte Aktivität der löslichen Guanylatcyclase vorliegt. Da die PDE – Inhibitoren unabhängig von der sGC agieren, liegt wahrscheinlich eine verminderte Aktivität der Proteinkinasen vor, welche die zellulären Effekte (Thrombozytenfunktionshemmung) bewirken.

Es gab im Rahmen dieser Studie 2 weitere Messzeitpunkte. Das Delta NO hat sich auch in beiden weiteren Messzeitpunkten in beiden Kollektiven nicht signifikant unterschieden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Thrombozyten der HD-Patienten nicht, wie angenommen, stärker auf NO/Sildenafil ansprechen.

Angesichts dieser Studienergebnisse erweist sich der therapeutische Einsatz von PDE-Hemmer und Aktivator der löslichen Guanylatcyclase als diskussionswürdig.

Hier sind weitere Untersuchungen in einem größeren Kollektiv denkbar um Medikamente dieser Wirkgruppe v.a. sGC-Aktivatoren und PDE-Hemmer genauer zu untersuchen, insbesondere in Hinblick auf ihren Einsatz zur Nephroprotektion. Bei Einsatz dieser Wirkgruppe ist auch das höhere Blutungsrisiko in Betracht zu ziehen.

### 4.3 Thrombozytenzahl im Gruppenvergleich

Unsere Analysen haben bei den HD-Patienten eine signifikant ( $p < 0,05$ ) reduzierte Thrombozytenzahl im Vergleich zu dem gesunden Probanden ergeben. Der Mittelwert betrug bei den HD-Patienten 227 G/l, bei den gesunden Probanden hingegen 247 G/L. Dabei lag die Thrombozytenzahl auch bei den Dialysepatienten noch im Normbereich. Allerdings suggerieren die Daten, dass die Anzahl an Thrombozyten von der terminalen Niereninsuffizienz bzw. der Hämodialyse abhängig zu sein scheinen

Dieses Ergebnis deckt sich mit jenen anderen Publikationen. GAFTER et al. stellten eine höchst signifikante Reduktion der Thrombozytenzahl bei den chronisch niereninsuffizienten Patienten fest, unabhängig davon, ob sie dialysiert wurden (65).

HAKIM et al. untersuchten den Verlauf der Thrombozytenzahl innerhalb einer Dialysesitzung. Das Resultat war ein Absinken der Thrombozytenzahl um 5-15% vom Ausgangswert (prä-dialytisch gemessen) innerhalb der ersten 30 Minuten der Dialysesitzung. Gegen Ende der Dialysesitzung näherte sich die Thrombozytenzahl wieder dem Ausgangsniveau (55),(58). Klinisch relevante Blutungen während der Hämodialyse wurden kaum beobachtet (58).

Bei der Interpretation der Thrombozytenzahl sind die verschiedenen Faktoren, welche Veränderungen bewirken können zu berücksichtigen. Dazu gehören beispielsweise eine akute Infektion, Sport, Vitaminmangel, chronische Entzündungen. In diesen Fällen kann die Thrombozytenzahl erhöht sein (66).

Unsere Daten haben eine signifikante Korrelation der Thrombozytenzahl mit der Thrombozytenfunktion ergeben. Somit kann durch die Thrombozytopenie teilweise die reduzierte Thrombozytenfunktion und die damit assoziierte erhöhte Blutungsneigung der HD- Patienten erklärt werden.

Auch hier ist es interessant, zu untersuchen, wie sich die Thrombozytenzahl vor und nach der Hämodialyse unterscheidet, um zu erheben welche Bedeutung die Urämietoxine in Hinblick auf die Thrombozytenzahl haben. Einerseits nehmen wir eine Zunahme der Thrombozytenzahl durch Entzug der Urämietoxine an, andererseits eine Abnahme durch die Dialysesitzung selbst.

#### **4.4 Korrelation der Thrombozytenfunktion mit infektiösen Ereignissen**

Unsere Daten zeigen im Kollektiv der HD – Patienten einen signifikanten Zusammenhang zwischen CRP – Werten und der Thrombozytenfunktion. Pathophysiologisch lässt sich diese Korrelation durch die im HD – Patienten chronisch ablaufende Inflammationsreaktion erklären. Die subendothelial lokalisierten Thrombozyten setzen kontinuierlich Mediatoren frei, welche wiederum Leukozyten und weitere Zielzellen aktivieren und so eine Entzündung aufrecht erhalten (35).

Zudem konnten unsere Daten einen signifikanten Zusammenhang der Thrombozytenfunktion mit der Hospitalisierungsdauer aufgrund eines infektiösen Ereignisses zeigen. Dass Dialysepatienten aufgrund ihrer Komorbiditäten (v.a. KHK) eine erhöhte Infektanfälligkeit aufweisen, haben Eleftheriadis et al. beschrieben. Infektiöse Ereignisse sind nach den kardiovaskulären Events die zweithäufigste Todesursache beim HD-Patienten (67).

Es ist zu erwähnen, dass es sich bei den Daten um Querschnittsdaten handelt, d.h. dass keine Aussagen zum Rückschluss über Ursache und Wirkung möglich sind. Weitere Untersuchungen, beispielsweise als prospektive Längsschnittstudien, die sich mit dem Zusammenhang zwischen Thrombozytenfunktion und Inflammation beschäftigen, sind denkbar. Hierbei könnten neben dem CRP auch weitere Inflammationsmarker erhoben werden, z.B. Interleukin–1 (IL-1) , IL-6, Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ).

#### **4.5 Korrelation der Thrombozytenfunktion mit Hospitalisierungsdauer aufgrund kardiovaskulärer Ereignissen**

Im Rahmen unserer Studie konnten wir zeigen, dass die Thrombozytenfunktion signifikant mit der Hospitalisierungsdauer aufgrund eines kardiovaskulären Events korreliert. Somit konnte ein tendenzieller Zusammenhang zwischen Thrombozytenfunktion und kardiovaskulärem Outcome gezeigt werden. Es ist hierbei zu erwähnen, dass es sich um Querschnittsdaten handelt. Somit lassen sich keine Rückschlüsse zu Ursache, Wirkungsrichtung und Kausalität treffen.

Diese Beobachtung deckt sich mit dem aktuellen Wissensstand (68). Thaulow et al. haben die Thrombozytenzahl und -funktion von 487 gesunden Probanden erhoben. Die Thrombozytenfunktionsmessung wurde mittels Lichttransmissionsaggregometrie (LTA)

und ADP als Agonist durchgeführt. Nach 13,5 Jahren wurde die Mortalität aufgrund eines kardiovaskulären Ereignisses erhoben. Es konnte eine signifikant höhere kardiovaskuläre Mortalität bei höheren Thrombozytenzahlen und bei einer höheren Thrombozytenfunktion festgestellt werden (69). In einer Studie von Foley et al. wurde bei den HD-Patienten eine kardiovaskuläre Mortalität von 50% erhoben, sowie eine Prävalenz der KHK von 40% detektiert (68). Eine Erklärung liegt im Risikoprofil. Zahlreiche Risikofaktoren, die beim HD-Patienten gehäuft auftreten, begünstigen auch eine KHK bzw. deren klinische Manifestation als Apoplex oder Myokardinfarkt. Zu diesen Risikofaktoren zählen beispielsweise die Hypertonie und der Diabetes mellitus (22). Bei unserem effektiv analysierten HD – Kollektiv fiel auf, dass 95% eine therapiebedürftige arteriellen Hypertonie, 28% eine Koronare Herzkrankheit (KHK) und 17% eine zerebrovaskuläre Erkrankung in der Anamnese hatten.

Im Rahmen unserer Studie konnten wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Thrombozytenfunktion und kardiovaskulären Hospitalisierungen zeigen. Hier sind weitere Untersuchung zu dieser Fragestellung denkbar, auch Mortalitätsanalysen.

Der Einsatz der AUC als Parameter für kardiovaskuläres Outcome im Kollektiv der Hämodialysepatienten ist dennoch diskussionswürdig. Beim HD – Patienten ist die AUC nämlich signifikant reduziert. Bei thrombotischen Ereignissen werden hingegen erhöhte Werte für die AUC erwartet.

### **Neue Studienergebnisse im Hinblick auf die Detektion von Markern für kardiovaskuläre Ereignisse und kardiovaskuläre Mortalität**

Die Identifikation von Markern, welche prädiktiv sind für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse und kardiovaskulärer Mortalität, ist Gegenstand intensiver Forschung.

Eine Untersuchung zu dieser Fragestellung wurde von MALCHOW et al. publiziert. Dabei wurden Thrombozyten isoliert, lysiert und mittels Massenspektrometrie Proteine quantifiziert. Vorteil der Massenspektrometrie ist, dass bis zu 4000 Proteine gleichzeitig quantifiziert werden können. Dabei lag das Augenmerk auf bekannten Funktionsparametern und auf neuen Biomarkern. Insbesondere wurden hier Veränderungen in den intrazellulären Signalkaskaden detektiert, welche gehäuft bei Patienten mit Arteriosklerose auftraten (z.B. PKC (Proteinkinase C)-Signalweg) (70).

PARK et al. haben mittels Immunomagnetic-Assay löslichen CD40-Liganden quantifiziert und eine Korrelation mit kardiovaskulären Erkrankungen festgestellt (71).

### 4.6 Kritische Betrachtung der Analyseergebnisse

Die mittels Multiplate gemessene AUC zeigt als Thrombozytenfunktionsmarker gut die Aktivität der Thrombozyten an. Je höher die Thrombozytenaktivität, umso höher ist der Wert der AUC. Die AUC wurde im Zusammenhang mit dem klinischen Outcome (Tod, Stentthrombosen) bereits untersucht. In einer Studie von Mayer et al. konnte gezeigt werden, dass bei Probanden mit hyperreaktiven Thrombozyten nach ASS-Gabe häufiger Tod oder Stentthrombosen auftraten (32).

Wir konnten ebenfalls zeigen, dass bei Dialysepatienten die Thrombozytenfunktion im Vergleich zum gesunden Probanden höchst signifikant reduziert ist

Eine große Stärke unserer Auswertungen ist der strenge Ausschluss von Einflussfaktoren, welche die Messergebnisse vom Multiplate beeinflussen. Dazu gehören insbesondere die Thrombozytenzahl unter 150 G/l und die Einnahme von ADP-Rezeptorantagonisten, z.B. Clopidogrel. Auch Komorbiditäten, welche die Thrombozytenfunktion beeinträchtigen, wurden berücksichtigt. Dazu zählen z.B. Leberinsuffizienz, hämatologische Erkrankungen und enorm hohe Thrombozytenzahlen.

So konnte isoliert der Einfluss der Niereninsuffizienz bzw. der Dialyse auf die Thrombozytenfunktion betrachtet werden.

Ein weiteres Qualitätsmerkmal unserer Untersuchung ist die im Vergleich mit anderen Studien hohe Probandenanzahl.

Nachteilig an der Messmethode ist die Abhängigkeit von Einflussfaktoren, welche das Messergebnis verändern können. Es mussten so 11 Patienten wegen einer Thrombozytenzahl unter 150 G/l und 14 HD - Patienten aufgrund der Einnahme von ADP-Rezeptorantagonisten (Clopidogrel) aus den Auswertungen ausgeschlossen werden. Hier ist die Anwendung weiterer Agonisten (TRAP, ASPI, RISTOCETIN...) für die Multiplate – Untersuchungen sinnvoll.

Als Limitation ist auch zu erwähnen, dass es sich bei den Korrelationen der Thrombozytenfunktion mit den Outcomedaten (Hospitalisierung aufgrund Infektion und aufgrund kardiovaskulärer Ereignisse) um Querschnittsdaten handelt. Somit kann kein Rückschluss über Kausalität und Folge gezogen werden. Dennoch zeigt sich ein

## Diskussion

tendenzieller Zusammenhang der Thrombozytenfunktion mit der Hospitalisierungsdauer aufgrund einer kardialen oder infektiösen Ursache. Hier sind Untersuchungen an größeren Kollektiven, auch im Rahmen als prospektive Längsschnittstudie denkbar.

Als Endpunkt sollten auch die Blutungsereignisse erhoben werden (z.B. gastrointestinale Blutung, Epistaxis, retroperitoneale Blutung nach Nierenbiopsie, etc.).

Die Thrombozytenfunktion ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Einige ausgewählte Faktoren, welche die Thrombozytenfunktionsstörung im HD – Patienten erklärt, wurden im Rahmen der Studie untersucht. So konnte ein Beitrag der Thrombozytenzahl und der chronischen Inflammation gezeigt werden. Wahrscheinlich liefern auch die akkumulierten Urämietoxine einen entscheidenden Beitrag zur Thrombozytenfunktionsstörung.

Es ist zu erwähnen, dass wir die Blutentnahmen für die Thrombozytenfunktionsmessungen vor den Hämodialyse-Sitzungen durchgeführt haben. Hier wäre ein Vergleich mit den Werten nach der Dialysesitzung sinnvoll, um zu untersuchen, wie sich die Thrombozytenfunktion vor und nach der HD - Sitzung unterscheidet. Dabei ist einerseits eine durch die Dialysesitzung selbst bedingte Abnahme der Thrombozytenfunktion zu erwarten. Andererseits ist eine Verbesserung der Thrombozytenfunktion durch Entzug der Urämietoxine durch die Dialysesitzung wahrscheinlich. Auch in Hinblick auf die Thrombozytenzahl ist dieser Vergleich vor und nach Hämodialyse interessant.



## 5. Zusammenfassung

Gerinnungsstörungen sind beim Dialysepatienten häufig und komplex in ihrer Ausprägung. Es ist bekannt, dass einerseits das Risiko für thrombotische Ereignisse, andererseits auch die Blutungsneigung beim Dialysepatienten erhöht ist. Es stellt sich deshalb die Frage, wie die Thrombozytenfunktion beim Hämodialysepatienten verändert ist im Vergleich zu jener vom gesunden Probanden.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen der Citrat-Acetat-Studie die Thrombozytenfunktion an 60 Hämodialysepatienten und 67 gesunden Probanden untersucht. Als Messmethode wurde das auf dem Prinzip der Impedanzaggregometrie beruhende Multiplate gewählt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine signifikant geringere Thrombozytenaktivität gemessen anhand des zeitlichen Verlaufs der Thrombozytenaggregation [Aggregation Units\*minutes], graphisch dargestellt als Area under the curve (AUC) beim HD-Patienten im Vergleich zum gesunden Probanden besteht. Dabei ist der Wert für [AU\*min] höher bei höherer Thrombozytenfunktion und klinisch mit einer erhöhten Thromboseneigung assoziiert. Ein geringer Wert für [AU\*min] ist hingegen mit einer geringen Thrombozytenfunktion und einer hohen Blutungsneigung assoziiert. Bei der Auswertung der Messwerte wurden Probanden, welche Einflussfaktoren auf die Thrombozytenfunktion aufwiesen, welche nicht mit der Hämodialyse in Zusammenhang stehen, aus den Analysen ausgeschlossen. Ziel war es hierbei, zu untersuchen, wie groß der Einfluss der terminalen Niereninsuffizienz unter Hämodialysebehandlung auf die Thrombozytenfunktion ist. Zu diesen Einflussfaktoren gehören: Hämatologische Erkrankungen, Leberzirrhose, akuter Infekt, abnorme Thrombozytenzahl, Einnahme von ADP – Rezeptorantagonisten (Clopidogrel). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen die Eignung der Impedanzaggregometrie für die Untersuchung der Thrombozytenfunktion bei terminaler Niereninsuffizienz unter Hämodialyse.

Das Ansprechen der Thrombozyten auf eine externe nitric oxide (NO) / Sildenafilgabe unterschied sich nicht zwischen Hämodialysepatienten und gesunden Probanden.

Diese Ergebnisse stellen den therapeutischen Einsatz von Aktivator der löslichen Guanylatzyklase (sGC) und Phosphodiesterase-Hemmer im Kollektiv der Hämodialysepatienten in Frage. Aus experimentellen Studien sind zwar inhibitorische

## Zusammenfassung

Einflüsse in der NO - Signalkaskade bekannt (56), (62), welche die Messergebnisse erklären könnten, allerdings sind weitere Untersuchungen in größeren Patientenkollektiven notwendig, um zu überprüfen, ob sich die Beobachtung bestätigt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Thrombozytenzahl beim Hämodialysepatienten geringer ist im Vergleich zum Gesunden. Die Werte sind dennoch im Normbereich. Somit kann die reduzierte Thrombozytenfunktion teilweise durch geringere Thrombozytenzahlen erklärt werden.

Untersucht wurde ferner speziell im Kollektiv der HD-Patienten, ob ein Zusammenhang besteht bei der gemessenen Thrombozytenfunktion mit Inflammation und infektiösen sowie kardiovaskulären Ereignissen. Dabei korrelierte der CRP – Wert mit der Thrombozytenfunktion.

Auch konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Thrombozytenfunktion und der Hospitalisierungsdauer aufgrund eines infektiösen oder kardiovaskulären Ereignisses gezeigt werden. Inwieweit sich die Thrombozytenfunktion als Marker für klinisches Outcome oder als Ansatzpunkt zur präventiven Intervention eignet, bleibt Gegenstand weiterer Forschung.

Insgesamt sind weitere prospektive Studien in einem größeren Kollektiv notwendig unter Berücksichtigung klinisch relevanter Endpunkte, wie der Erhebung von Blutungsereignissen kardiovaskulärer Mortalität, sowie Mortalität aufgrund von Infektion.

## Anhang

Tabelle 1: Messmethoden

Messmethode	Funktionsprinzip	Einsatzgebiet	Vorteile	Nachteile
<b>Blutungszeit</b>	Künstliches Zuführen einer Verletzung – Messung der Zeit bis zum Ende der Blutung	<p>Obsolet:</p> <p>Früher als Screening-Test für die Diagnostik von angeborenen und erworbenen Thrombozytenfunktionsstörungen (z.B. Von WillebrandSyndrom)</p>	<p>Schneller Test</p> <p>Keine Prozessierung von Vollblut nötig</p>	<p>Invasiv</p> <p>Schlecht standartisierbar</p> <p>Abhängigkeit von Hautdicke, -temperatur und korrekter Durchführung der Untersuchung</p>
<b>Thrombozyten-</b>	Photometrische Messung der Änderung der Lichttransmission	<p>Screening-Test für angeborene und erworbene Thrombozytopathien</p>	<p>Verschiedene Pathways werden genutzt</p>	<p>Zeitaufwand</p> <p>Vollblut muss prozessiert werden</p>

Anhang

<p><b>aggregometrie</b> nach Born – LTA (Light Transmission Aggregometry (Lichttransmissions – aggregometrie))</p>	<p>nach Zugabe eines Agonisten (z.B. ADP)</p>	<p>Überprüfung der Wirksamkeit von Thrombozytenfunktionshemmer (ASS/Clopidogrel)</p>		<p>Großes Probenvolumen ist nötig</p>
<p><b>Impedanz-aggregometrie</b></p>	<p>Messung der Impedanz-änderung nach Zugabe eines Agonisten (z.B. ADP)</p>	<p>Monitoring der antiaggregatorischen Therapie Screening – Test von angeborenen und erworbenen Thrombozytopathien Monitoring bei postoperativen Blutungen</p>	<p>Wie LTA nach Born Keine Prozessierung von Vollblut notwendig geringere Blutmenge nötig</p>	<p>Störfaktoren: Thrombozytopenie (unter 150 G/l)</p>

Anhang

<p><b>PFA-100</b></p> <p>Platelet function analyzer – 100</p>	<p>Misst die Zeit, die zwischen Scherstress und Schließen einer Lücke durch aktivierte (Epinephrin, ADP) Thrombozyten vergeht</p>	<p>Diagnostik von Thrombozytopathien (v.a. vWD, Thrombasthenie Glanzmann, Bernard Soulier-Syndrom)</p> <p>postoperatives Blutungsmanagement (u.a. zur Indikationsstellung von Transfusionen)</p>	<p>einfach, schnelles Ergebnis</p>	<p>abhängig von verschiedenen Faktoren:</p> <p>(<i>verlängerte</i> Closuretime: Thrombozytenzahl gering, geringer Hkt; <i>verkürzte</i> Closuretime: hoher Hk)</p>
<p><b>VerifyNow - System</b></p>	<p>Wie LTA (Agonistenzugabe) nur viel schneller, Vollblut wird verwendet, Lichtquelle ist ein Laser – gemessen wird die Lichttransmission, die sich durch die Thrombozytenaggregation an fibrinogenüberzogenen Kügelchen ergibt.</p> <p>Die Einheit sind sog. platelet reaction units“ (PRU)</p>	<p>Monitoring der antiaggregatorischen Therapie</p> <p>Kardiologische Notfälle</p> <p>Prä - und postoperatives Monitoring</p>	<p>Schnell: keine Vollblutprozessierung nötig</p>	<p>Teuer</p> <p>Einflussfaktoren (u.a. Thrombozytenzahl)</p>

	Je höher die Turbidität, d.h. die Thrombozytenaggregationsneigung, umso höher der Wert für die PRU			
<b>Durchflusszytometrie</b>	Fluoreszenzmarkierte Antikörper werden eingesetzt, um bestimmte Oberflächenproteine (z.B. Glykoproteinrezeptoren) nachzuweisen. Auch intrazelluläre Mediatoren (z.B. Bestandteile der Granula wie Platelet factor 4 (PF-4) können so identifiziert werden	<p>Nachweis von hereditären Defekten von Oberflächenproteinen der Thrombozyten</p> <p>Nachweis einer in vivo Thrombozytenaktivierung</p> <p>Qualitätssicherung von Thrombozytenkonzentraten, welche für Transfusionen verwendet werden</p>	Unabhängig von Störfaktoren, v.a. zuverlässige Ergebnisse auch bei Thrombozytenzahlen < 150 G/L	<p>Technisch aufwändig</p> <p>Teuer</p>

Tab. 1: Übersicht über Methoden für die Thrombozytenfunktionsmessung (54)

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
ADP	Adenosindiphosphat
$\alpha$	Alpha
AML	Akut myeloische Leukämie
ASPI Arachnoidonsäure)	Aspirin (hier: Thrombozytenaktivierung durch
ASS	Aspirin
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Aggregation units (Aggregationseinheiten)
AUC	Area under the curve
min	Minute
AU/min	Aggregationseinheiten pro Minute
$\beta$ -Blocker	Beta-Blocker
BMI	Body Mass Index
$\beta$ -TG	Beta-Thromboglobulin
CD 40L	CD 40-Ligand
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
COL	Kollagen
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
CYP	Cytochrom Peroxidase
$\delta$	Delta
d.h.	das heißt

## Abkürzungsverzeichnis

DMSO	Dimethylsulfoxid
et al	et alii (und andere)
F	Faktor
G/l	Giga pro Liter
G	Gramm
GP Ib	Glykoprotein Ib
GP IIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
G/l	Giga pro Liter; Giga = $10^9$
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HAPR	high – on aspirin treatment platelet reactivity (hohe Plättchenreaktivität bei Aspirineinnahme)
HD-Patient	Hämodialyse - Patient
Hk	Hämatokrit
H <sub>2</sub> O	Wasser
IL	Interleukin
kg/m <sup>2</sup>	Kilogramm pro Quadratmeter
KHK	Koronare Herzkrankheit
λ	Lambda
LTA Aggregometrie)	Light Transmission Aggregometry (Lichttransmissions -
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
μg	Mikrogramm = $10^{-6}$ Gramm
μl	Mikroliter = $10^{-6}$ Liter
μm	Mikrometer = $10^{-6}$ Meter
mM	Millimolar
mRNA	Messenger - Ribonukleinsäure
n	Anzahl der Probanden



## Abkürzungsverzeichnis

NO	Stickstoffmonoxid
NSAIDs	Nicht steroidale Antirheumatika
PCI	Perkutane Koronarintervention
PCR	Polymerase - Kettenreaktion
PCS	P-Cresyl Sulfat
PDE	Phosphodiesteraseinhibitor
PDGF	Platelet-derived growth factor (von den Thrombozyten abstammender Wachstumsfaktor)
PFA-100	Platelet function analyzer – 100 (Messgerät zur Analyse der Thrombozytenfunktion)
PF4	Platelet factor 4
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin 2 (auch Prostaglandin)
PIK3	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PRU	Platelet reaction unit
RNA	Ribonukleinsäure
sGC	lösliche Guanylat-Zyklase
Tab.	Tabelle
T1	Messzeitpunkt 1
TF	Tissue factor (Gewebefaktor)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRAP	Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan-A <sub>2</sub>
U	Unit
u.a.	unter anderem
vWD	Von Willebrand disease (Von-Willebrand-Syndrom)
vWF	Von-Willebrand-Faktor
z.B.	zum Beisp

## 7. Literaturverzeichnis

1. Aggarwal A, Kabbani SS, Rimmer JM, Gennari FJ, Taatjes DJ, Sobel BE, et al. Biphasic effects of hemodialysis on platelet reactivity in patients with end-stage renal disease: a potential contributor to cardiovascular risk. *Am J Kidney Dis.* 2002;40(2):315-22.
61. Aiello S, Noris M, Remuzzi G. Nitric oxide/L-arginine in uremia. *Miner Electrolyte Metab.* 1999;25(4-6):384-90.
50. Bernlochner I, Morath T, Brown PB, Zhou C, Baker BA, Gupta N, et al. A prospective randomized trial comparing the recovery of platelet function after loading dose administration of prasugrel or clopidogrel. *Platelets.* 2013;24(1):15-25.
28. Beyan C, Kaptan K, Ifran A. Platelet count, mean platelet volume, platelet distribution width, and plateletcrit do not correlate with optical platelet aggregation responses in healthy volunteers. *J Thromb Thrombolysis.* 2007;22:161-4.
37. Bilen Y, Cankaya E, Keles M, Gulcan E, Uyanik A, Turkeli M, et al. Does decreased mean platelet volume predict inflammation in chronic renal failure, dialysis, and transplanted patients? *Ren Fail.* 2014;36(1):69-72.
57. Boccardo P, Remuzzi G, Galbusera M. Platelet dysfunction in renal failure. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30(5):579-89.
41. Bonello L, Tantry US, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, et al. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(12):919-33.
59. Bonomini M, Sirolli V, Stuard S, Settefrati N. Interactions between platelets and leukocytes during hemodialysis. *Artif Organs.* 1999;23(1):23-8.
8. Breuch G, Servos W. Kapitel 12 - Behandlungsverfahren der terminalen Niereninsuffizienz. In: Breuch G, Servos W, editors. *Dialyse Für Einsteiger (Vierte Ausgabe).* Munich: Urban & Fischer; 2017. p. 131-68.
31. Calatzis A, Spannagl M, Loreth R. Multiplate® platelet function analysis - application and interpretation. 2007.
36. Caliskan TA. Evaluation of platelet function in uremic patients. *Research.* 2014.
39. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods.* 1980;3(2):135-58.
42. Christ G, Siller-Matula JM, Francesconi M, Dechant C, Grohs K, Podczeck-Schweighofer A. Individualising dual antiplatelet therapy after percutaneous coronary intervention: the IDEAL-PCI registry. *BMJ Open.* 2014;4(10):e005781.

## Literaturverzeichnis

24. Clinic C. Thrombocytopenia 2016 [Available from: <https://my.clevelandclinic.org/health/articles/thrombocytopenia>].
22. Culleton BF, Larson MG, Wilson PW, Evans JC, Parfrey PS, Levy D. Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency. *Kidney Int.* 1999;56(6):2214-9.
58. Daugirdas JT, Bernardo AA. Hemodialysis effect on platelet count and function and hemodialysis-associated thrombocytopenia. *Kidney Int.* 2012;82(2):147-57.
67. Eleftheriadis T, Liakopoulos V, Leivaditis K, Antoniadi G, Stefanidis I. Infections in hemodialysis: a concise review - Part 1: bacteremia and respiratory infections. *Hippokratia.* 2011;15(1):12-7.
10. Escolar G, Diaz-Ricart M, Cases A. Uremic platelet dysfunction: past and present. *Curr Hematol Rep.* 2005;4(5):359-67.
68. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 1998;9(12 Suppl):S16-23.
38. Fox SC, Behan MWH, Heptinstall S. Inhibition of ADP-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> responses and platelet aggregation by the P2Y<sub>12</sub> receptor antagonists AR-C69931MX and clopidogrel is enhanced by prostaglandin E<sub>1</sub>. *Cell Calcium.* 2004;35(1):39-46.
17. Friebe A, Koesling D. Regulation of Nitric Oxide-Sensitive Guanylyl Cyclase. *Circulation Research - Journal of the American Heart Association.* 2003;93(2):96-105.
34. Gäckler A, Rohn H, Lisman T, Benkö T, Witzke O, Kribben A, et al. Evaluation of hemostasis in patients with end-stage renal disease. *PLoS One.* 2019;14(2):e0212237.
65. Gafter U, Bessler H, Malachi T, Zevin D, Djaldetti M, Levi J. Platelet count and thrombopoietic activity in patients with chronic renal failure. *Nephron.* 1987;45(3):207-10.
19. Garibotto G, Sofia A, Saffioti S, Bonanni A, Mannucci I, Verzola D. Amino acid and protein metabolism in the human kidney and in patients with chronic kidney disease. *Clin Nutr.* 2010;29.
14. George JN. Platelets. *The Lancet.* 2000;355(9214):1531-9.
13. George JN. Platelets. *The Lancet.* 355(9214):1531-9.
12. Gremmel T, Frelinger AL, 3rd, Michelson AD. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost.* 2016;42(3):191-204.
18. Gresele P, Momi S, Falcinelli E. Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;72(4):634-46.
55. Hakim RM, Schafer AI. Hemodialysis-associated platelet activation and thrombocytopenia. *Am J Med.* 1985;78(4):575-80.

43. Hazarbasanov D, Velchev V, Finkov B, Postadjian A, Kostov E, Rifai N, et al. Tailoring clopidogrel dose according to multiple electrode aggregometry decreases the rate of ischemic complications after percutaneous coronary intervention. *J Thromb Thrombolysis*. 2012;34(1):85-90.
26. J. KD. Overview of Platelet Disorders 2017 [Available from: <http://www.merckmanuals.com/professional/hematology-and-oncology/thrombocytopenia-and-platelet-dysfunction/overview-of-platelet-disorders>].
64. Kalk P, Godes M, Relle K, Rothkegel C, Hucke A, Stasch J-P, et al. NO-independent activation of soluble guanylate cyclase prevents disease progression in rats with 5/6 nephrectomy. *Br J Pharmacol*. 2006;148(6):853-9.
4. Kaw D, Malhotra D. Platelet dysfunction and end-stage renal disease. *Semin Dial*. 2006;19(4):317-22.
52. Kehrel B, Brodde M. State of the Art in Platelet Function Testing. *Transfus Med Hemother*. 2013;40(2):73-86.
20. Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res*. 2002;22(9):913-22.
63. Krishnan SM, Kraehling JR, Eitner F, Benardeau A, Sandner P. The Impact of the Nitric Oxide (NO)/Soluble Guanylyl Cyclase (sGC) Signaling Cascade on Kidney Health and Disease: A Preclinical Perspective. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6).
53. Lorenz G, Mayer CC, Bachmann Q, Stryeck S, Braunisch MC, Haller B, et al. Acetate-free, citrate-acidified bicarbonate dialysis improves serum calcification propensity-a preliminary study. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;33(11):2043-51.
25. MacGill M. Low Platelet Count: Causes, Symptoms, and Treatment 2016 [Available from: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/314123.php#Medical%20conditions%20that%20can%20cause%20low%20platelet%20counts>].
7. Mackenzie TA, Zawada ET, Jr., Stacy WK. Hemodialysis. Basic principles and practice. *Postgrad Med*. 1985;77(1):95-101, 4.
70. Malchow S, Loosse C, Sickmann A, Lorenz C. Quantification of Cardiovascular Disease Biomarkers in Human Platelets by Targeted Mass Spectrometry. *Proteomes*. 2017;5(4):31.
32. Mayer K, Bernlochner I, Braun S, Schulz S, Orban M, Morath T, et al. Aspirin treatment and outcomes after percutaneous coronary intervention: results of the ISAR-ASPI registry. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(9):863-71.
62. Meijers BK, Meye C, Stasch J-P, Gross P, Evenepoel P. The uremic retention solute p-cresyl sulfate alters NO signal transduction by alteration of the soluble guanylate cyclase redox state. *BMC Pharmacol*. 2009;9(1):P47.

29. Muller-Schunk S, Linn J, Peters N, Spannagl M, Deisenberg M, Bruckmann H, et al. Monitoring of clopidogrel-related platelet inhibition: correlation of nonresponse with clinical outcome in supra-aortic stenting. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008;29(4):786-91.
66. National Heart L, and Blood Institute (NHLBI) I. What Are Thrombocytopenia and Thrombocytosis? 2012 [Available from: <https://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/thrm>].
27. Nilsson A. Thrombozytose – Definition der Blutstörung 2017 [Available from: <http://www.thrombozyten-info.de/thrombozytose>].
60. Noris M, Benigni A, Boccardo P, Aiello S, Gaspari F, Todeschini M, et al. Enhanced nitric oxide synthesis in uremia: implications for platelet dysfunction and dialysis hypotension. *Kidney Int.* 1993;44(2):445-50.
9. Ocak G, Vossen CY, Rotmans JI, Lijfering WM, Rosendaal FR, Parlevliet KJ, et al. Venous and arterial thrombosis in dialysis patients. *Thromb Haemost.* 2011;106(6):1046-52.
54. Panicia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag.* 2015;11:133-48.
71. Park H, Lee J-W, Hwang MP, Lee KH. Quantification of cardiovascular disease biomarkers via functionalized magnetic beads and on-demand detachable quantum dots. *Nanoscale.* 2013;5(18):8609-15.
33. Pluta J, Nicinska B, Grzeszczyk M, Kolacz M, Jureczko L, Kwiatkowski A, et al. Assessment of the Hemostatic Parameters and Platelet Function on Thromboelastometry and Impedance Aggregometry in Hemodialysis Patients Qualified for Kidney Transplantation: Preliminary Report. *Transplant Proc.* 2016;48(5):1431-4.
72. Pluta J, Nicińska B, Grzeszczyk M, Kołacz M, Jureczko L, Kwiatkowski A, et al. Assessment of the Hemostatic Parameters and Platelet Function on Thromboelastometry and Impedance Aggregometry in Hemodialysis Patients Qualified for Kidney Transplantation: Preliminary Report. *Transplant Proc.* 2016;48(5):1431-4.
5. Potthoff F, Münscher C, Berendes A, Weber W. Jahresbericht Datenanalyse Dialyse 2013. In: GmbH M-MN, editor. 2014. p. 97.
47. Rahe-Meyer N, Winterhalter M, Boden A, Froemke C, Piepenbrock S, Calatzis A, et al. Platelet concentrates transfusion in cardiac surgery and platelet function assessment by multiple electrode aggregometry. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009;53(2):168-75.
48. Rahe-Meyer N, Winterhalter M, Hartmann J, Pattison A, Hecker H, Calatzis A, et al. An evaluation of cyclooxygenase-1 inhibition before coronary artery surgery: aggregometry versus patient self-reporting. *Anesth Analg.* 2008;107(6):1791-7.
44. Ranucci M, Baryshnikova E, Soro G, Ballotta A, De Benedetti D, Conti D. Multiple electrode whole-blood aggregometry and bleeding in cardiac surgery patients receiving thienopyridines. *Ann Thorac Surg.* 2011;91(1):123-9.

49. Reece MJ, Klein AA, Salviz EA, Hastings A, Ashworth A, Freeman C, et al. Near-patient platelet function testing in patients undergoing coronary artery surgery: a pilot study. *Anaesthesia*. 2011;66(2):97-103.
21. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*. 2002;8(11):1227-34.
15. Salvati F, Liani M. Role of platelet surface receptor abnormalities in the bleeding and thrombotic diathesis of uremic patients on hemodialysis and peritoneal dialysis. *Int J Artif Organs*. 2001;24(3):131-5.
3. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2003;108.
40. Scharf RE. Angeborene und erworbene Thrombozytenfunktionsstörungen. *Hämostaseologie* 4/2003. 2003.
56. Schmidt RJ, Domico J, Samsell LS, Yokota S, Tracy TS, Sorkin MI, et al. Indices of activity of the nitric oxide system in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 1999;34(2):228-34.
2. Schoorl M, Grooteman MPC, Bartels PCM, Nubé MJ. Aspects of platelet disturbances in haemodialysis patients. *Clin Kidney J*. 2013;6(3):266-71.
51. Sibbing D, Braun S, Jawansky S, Vogt W, Mehilli J, Schomig A, et al. Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb Haemost*. 2008;99(1):121-6.
46. Sibbing D, Koch W, Gebhard D, Schuster T, Braun S, Stegherr J, Morath T, Schömig A, von Beckerath N, Kastrati A. Cytochrome 2C19\*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation*. 2010 Feb 2;121(4):512-8. doi:
30. Sibbing D, Steinhubl SR, Schulz S, Schomig A, Kastrati A. Platelet aggregation and its association with stent thrombosis and bleeding in clopidogrel-treated patients: initial evidence of a therapeutic window. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(4):317-8.
45. Siller-Matula JM, Delle-Karth G, Lang IM, Neunteufl T, Kozinski M, Kubica J, et al. Phenotyping vs. genotyping for prediction of clopidogrel efficacy and safety: the PEGASUS-PCI study. *J Thromb Haemost*. 2012;10(4):529-42.
35. Stokes KY, Granger DN. Platelets: a critical link between inflammation and microvascular dysfunction. *The Journal of physiology*. 2012;590(5):1023-34.

## Literaturverzeichnis

69. Thaulow E, Erikssen J, Sandvik L, Stormorken H, Cohn PF. Blood platelet count and function are related to total and cardiovascular death in apparently healthy men. *Circulation*. 1991;84(2):613-7.
6. Vadakedath S, Kandi V. Dialysis: A Review of the Mechanisms Underlying Complications in the Management of Chronic Renal Failure. *Cureus*. 2017;9(8):e1603.
11. van Bladel ER, de Jager RL, Walter D, Cornelissen L, Gaillard CA, Boven LA, et al. Platelets of patients with chronic kidney disease demonstrate deficient platelet reactivity in vitro. *BMC Nephrol*. 2012;13:127-.
23. Wanner C, Hörl MP. *Dialyseverfahren in Klinik und Praxis: Technik und Klinik*: Thieme; 2003.
73. Yagmur E, Frank RD, Neulen J, Floege J, Mühlfeld AS. Platelet Hyperaggregability is Highly Prevalent in Patients With Chronic Kidney Disease: An Underestimated Risk Indicator of Thromboembolic Events. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2013;21(2):132-8.
16. Zucker MB, Nachmias VT. Platelet activation. *Arteriosclerosis*. 1985;5(1):2-18.

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der Hämodialyse modifiziert nach BREUCH et al. (8).....	2
Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Darstellung eines Thrombozyten modifiziert nach GEORGE et al. (14) .....	4
Abbildung 3: Thrombozytenaktivierung, modifiziert nach SALVATI et al. (15).....	5
Abbildung 4: Die Wirkung von NO/cGMP modifiziert nach FRIEBE et al. (17).....	6
Abbildung 5: Übergang von der primären zur sekundären Gerinnung modifiziert nach SCHOORL et al. (2).....	8
Abbildung 6: Multiplate – Analyser (31).....	11
Abbildung 7: Aggregierte Thrombozyten haften an den Sensordrähten, modifiziert nach CALATZIS et al. (31) .....	12
Abbildung 8: Aggregationskurve .....	13
Abbildung 9: Aggregationskurve gesunder Proband .....	14
Abbildung 10: Aggregationskurve mit ASS antiaggregierter Patient.....	14
Abbildung 11: Agonisten für die Thrombozytenfunktionsmessung .....	15
Abbildung 12: Darstellung der Messzeitpunkte .....	22
Abbildung 13: Darstellung vom Messprinzip .....	24
Abbildung 14: Pipettierschema .....	26
Abbildung 15: Überblick über Ausschlusskriterien .....	29
Abbildung 16: Histogramm zur Veranschaulichung der Verteilung der AUC – Werte im Kollektiv der HD – Patienten .....	33
Abbildung 17: Histogramm zur Veranschaulichung der Verteilung der AUC – Werte im Kollektiv der gesunden Probanden .....	34
Abbildung 18: Thrombozytenfunktion [AU*min] HD – Patienten vs. Gesunde.....	35
Abbildung 19: Thrombozytenfunktion [AU*min] nativ und nach NO/Sildenafilzugabe.....	37
Abbildung 20: Mittelwert der Thrombozytenfunktion [AU*min] nativ und nach NO/Sildenafilzugabe .....	38
Abbildung 21: Verteilung von Delta NO beim HD – Patienten.....	40
Abbildung 22: Verteilung von Delta NO beim gesunden Probanden .....	41
Abbildung 23: Delta NO HD-Patienten vs. Gesunde.....	42
Abbildung 24: Histogramm für die Verteilung der Werte für die Thrombozytenzahl beim HD – Patienten .....	45
Abbildung 25: Histogramm für die Verteilung der Werte der Thrombozytenzahl beim gesunden Probanden.....	46
Abbildung 26: Thrombozytenzahl HD – Patienten vs. Gesunde .....	47
Abbildung 27: Korrelation der Thrombozytenfunktion (AUC) und der Thrombozytenzahl beim HD – Patienten .....	50
Abbildung 28: Korrelation der Thrombozytenfunktion (AUC) und der Thrombozytenzahl beim Gesunden.....	51
Abbildung 29: Korrelation der Thrombozytenfunktion mit CRP .....	53
Abbildung 30: Korrelation der Thrombozytenfunktion mit Hospitalisierung wegen Infektion .....	54



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 31: Korrelation der Thrombozytenfunktion mit Hospitalisierung wegen Infektion seit HD – Beginn .....	55
Abbildung 32: Korrelation der Thrombozytenfunktion mit Hospitalisierung wegen kardiovaskulärem Event .....	57

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einschlusskriterien HD und Kontrollgruppe.....	21
Tabelle 2: Ablauf der Messung der [AUC] nativ .....	25
Tabelle 3: Basischarakteristika HD und Kontrollgruppe nach Anwendung der Ausschlusskriterien .....	31

## **10. Veröffentlichungen**

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert:

Bonell V, Lorenz G, Kessler T, Heemann U, Schmaderer C, Kemmner S.

MO739EX VIVO THROMBOCYTE FUNCTION IN HEMODIALYSIS PATIENTS.

Nephrology Dialysis Transplantation. 2021;36 (Supplement\_1).

## 11. Danksagung

Zum Gelingen dieser Doktorarbeit haben verschiedene Personen beigetragen. Ihnen möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Dr. h.c. Uwe Heemann, dass er mir die Möglichkeit geboten hat, meine Dissertation an der Abteilung Nephrologie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München durchzuführen.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Christoph Schmaderer für die Zuteilung dieses sehr interessanten Themas und sein Engagement. Auch bei Dr. Stephan Kemmer und Dr. Georg Lorenz möchte ich mich für die wertvolle Unterstützung und die Ansprechbarkeit bedanken. Sie alle haben mir die Möglichkeit geboten, eigene Ideen einzubringen und mich gut beraten. Auch für die Beratung von Dr. Thorsten Kessler als Mentor möchte ich mich bedanken.

Mein Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung, das Verständnis und die Wertschätzung, die sie mir entgegengebracht haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei meiner Tante Elsa Thalmann.

