

Aus der Klinik für Neurologie

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Direktorin: Prof. Dr. med. Daniela Berg

**Klinische Relevanz von Biomarkern der
Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung beim
akuten ischämischen Schlaganfall**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Olga Stepanow

aus Wiktorowka/Kasachstan

Kiel, 2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. G. Kuhlenbäumer, Klinik für Neurologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Koch, Institut für Experimentelle
Medizin/Sektion Maritime Medizin

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2016

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 18.05.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 TOAST Kriterien.....	2
1.2 National Institutes of Health Stroke Scale.....	2
1.3 Thrombozyt.....	3
1.3.1 Morphologie	3
1.3.2 Funktion.....	4
1.4 Thrombozyten – Leukozyten – Aggregate.....	6
1.4.1 Hintergrund.....	6
1.4.2 Konjugation.....	6
1.5 Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate bei Schlaganfallpatienten.....	8
1.6 Fragestellung dieser Arbeit.....	10
2. Probanden, Material und Methoden.....	11
2.1 Patientengruppe.....	11
2.2 Kontrollgruppe.....	14
2.3 Rahmenbedingungen für beide Gruppen.....	15
2.4 Antikörper und Puffer.....	15
2.5 Versuchsdurchführung: Blutentnahme und Durchflusszytometrie.....	17
2.6 Statistische Analysen.....	19
3. Ergebnisse.....	21
3.1 Charakteristische Merkmale der Patientengruppe.....	21
3.2 Charakteristische Merkmale der Kontrollgruppe.....	21
3.3 Gegenüberstellung beider Gruppen.....	22
3.4 Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate.....	23
3.5 Thrombozytenaktivierung.....	23
3.6 Thrombozytenaktivierung und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate in Korrelation zu NIHSS und TOAST.....	24

3.7 Thrombuslänge in Korrelation zu Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten und Thrombozytenaktivierung	25
3.8 Modellbildung: Welche der von uns erhobenen Parameter sind statistisch signifikant mit dem ischämischen Hirninfarkt assoziiert?	26
3.8.1 Logistisches Regressionsmodell mit ischämischen Schlaganfall als abhängige Variable	26
3.8.2 Regressionsmodell zu Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten.....	27
3.8.3 Regressionsmodell zu Thrombozytenaktivierung.....	27
4. Diskussion	28
4.1 Kernaussagen	28
4.2 Thrombozytenaktivierung und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate	29
4.3 Thrombozytenaktivierung und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate in Korrelation zu klinischen Merkmalen	30
4.4 Interpretation der Regressionsmodelle	32
4.5 Limitationen	34
4.6 Zusammenfassung und Ausblick	35
5. Zusammenfassung	38
Literaturverzeichnis	40
Abstract 29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurointensiv- und Notfallmedizin Berlin, 18.01.2012 - 21.01.2012.....	47
Publikation	49
Danksagung	54
Lebenslauf	55

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
CD	Cluster of differentiation
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 51
cCT	zerebrale Computertomographie
cMRT	zerebrale Kernspintomographie
CRP	c-reaktives Protein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL-2	Fluoreszenzkanal 2
FS	forwardscatter
GP	Glykoprotein
HDL	High Density Lipoprotein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl) ethansulfonsäure
ICAM-2	intercellular adhesion molecule
IL-6	Interleukin-6
INF- γ	Interferon- γ
LDL	Low Density Lipoprotein
LFA-1	Leukozyten Funktions-Antigen
Mac-1	Makrophagen-1 Antigen
MPC-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
NaCl	Natriumchlorid
NIHSS	National Institutes of Health Stroke Scale
nm	Nanometer
OGTT	oraler Glukosetoleranz-Test
PE	Phycoerythrin
PLA	platelet leukocyte aggregates
PSGL-1	P-Selectin glycoprotein ligand-1
PSI-697	2-(4-chlorobenzyl)-3-hydroxy-7,8,9,10 tetrahydrobenzo[h] quinoline-4-carboxylic acid
PTT	partielle Thromboplastinzeit
p-Wert	Signifikanzwert
RNA	ribonucleic acid
RR	Riva-Rocci

R ²	Determinationskoeffizient
SpearmanRho	Spearman-Rangkorrelationskoeffizient
SD	Standardabweichung
SS	sidescatter
Th1-Zellen	T-Helfer 1-Zellen
TIA	Transitorisch ischämische Attacke
TOAST	The Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment
TPZ	Thromboplastinzeit

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten.....	7
Tabelle 2: TOAST-Klassifikation, modifiziert.....	13
Tabelle 3: NIHSS-Punkteübersicht.....	13
Tabelle 4: Übersicht und Definition der Risikofaktoren.....	14
Tabelle 5: Übersicht der Antikörper und ihrer Eigenschaften.....	16
Tabelle 6: Wichtige Merkmale der Patienten mit Apoplex und der Kontrollpersonen.....	22

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: elektronenmikroskopische Aufnahme eines nicht aktivierten und eines aktivierten Thrombozyten.....	4
Abbildung 2: Aktivierung des Thrombozyten, modifiziert.....	5
Abbildung 3: Pathogenese der Inflammation und Atherosklerose an der Gefäßwand und das Mitwirken von Thrombozyten und Leukozyten, modifiziert.....	8
Abbildung 4: Thrombuslängenmessung anhand von CT-Bildern.....	12
Abbildung 5 A: Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate in Prozent bei Schlaganfallpatienten und den Kontrollpersonen.....	24
Abbildung 5 B: Thrombozytenaktivierung in Prozent bei Schlaganfallpatienten und Kontrollpersonen.....	24
Abbildung 5 C: Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate in Prozent in Bezug auf NIHSS-Punkte.....	25
Abbildung 5 D: Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate in Prozent in Bezug auf die einzelnen Unterkategorien der TOAST-Kriterien.....	25

1. Einleitung

Der Schlaganfall ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen und die dritthäufigste Todesursache in Europa [1]. Der Schlaganfall (Synonym: Hirninsult, Apoplex) entsteht durch eine akut auftretende Sauerstoffunterversorgung eines Bereiches des Gehirns, ausgelöst durch eine Unterbrechung der zerebralen Blutzufuhr [1,2]. Das Krankheitsbild führt oftmals zu Langzeitinvalidität, die sich beispielsweise durch eine Einschränkung der Sprache oder der Gehens äußern kann. Weiterhin erkranken viele der Betroffenen nach einem Schlaganfall an einer Depression [3]. Die Inzidenz des Schlaganfalls beträgt in Deutschland ca. 120 – 170/ 100.000 Einwohner pro Jahr (die transitorische ischämische Attacke nicht eingerechnet) und nimmt mit dem Alter zu. Ferner haben Männer ein 25-30% höheres Schlaganfallrisiko als Frauen. Anhand der demographischen Entwicklung lässt sich abschätzen, dass die Häufigkeit für Schlaganfälle bis zum Jahre 2050 um 65% gestiegen sein wird [4]. Dies hat erhebliche ökonomische Folgen, denn alleine im Jahre 2008 betragen die Gesamtkosten für Schlaganfall-Erkrankungen in den EU-Ländern rund 27 Milliarden Euro [5].

Anhand der Ätiologie kann der Schlaganfall in eine ischämische und eine hämorrhagische Form eingeteilt werden, wobei die ischämische Form mit 80-85% die häufigste Form darstellt, die hämorrhagische Form hingegen mit 10-15% deutlich seltener ist. Die ischämische Form lässt sich ätiologisch wiederum in mikroangiopathische (lakunäre Infarkte, subkortikale arteriosklerotische Enzephalopathie) und makroangiopathische Infarktmuster unterteilen, letztere sind häufig kardialer oder arterio-arteriell embolischer Genese. Zu den hämorrhagischen Schlaganfällen zählen die intrazerebralen Blutungen, die Subarachnoidalblutung und die Sinusthrombosen [6]. In der folgenden Arbeit steht die Bezeichnung „Schlaganfall“ ausschließlich für den ischämischen Hirninfarkt.

1.1 TOAST-Kriterien

TOAST steht für „The Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment“. Die TOAST Kriterien erlauben eine ätiologische Einteilung des ischämischen Hirninfarkts. Sie entstanden Anfang der 90er Jahre aus der „Stroke Data Bank“ [7]. Die Einteilung ist wichtig, da die Behandlung und Prognose, der an Schlaganfall erkrankten Patienten, auch von der Ätiologie des Schlaganfalls abhängt. Der ischämische Schlaganfall wird in 5 Subtypen anhand der unterschiedlichen Genese eingeteilt. Dabei steht TOAST 1 für eine makroangiopathische Genese, TOAST 2 für eine kardioembolische Ursache, TOAST 3 für eine Mikroangiopathie als Ursache des Hirninfarktes, TOAST 4 für andere Ätiologien, die den Schlaganfall bedingen, wie z.B. Vaskulitis oder Dissektion und TOAST 5 für einen ischämischen Schlaganfall ungeklärter Genese [8].

1.2 National Institutes of Health Stroke Scale

Die National Institutes of Health Stroke Scale (=NIHSS) ist eine klinische Skala, die der primären Einschätzung und Beurteilung der Schwere des akuten Schlaganfalls, aber auch der Entwicklung der Erkrankung im Verlauf dient. In das Punktesystem fließen unterschiedliche Kriterien, wie die Motorik und Sensibilität, Ataxie, die Sprache und die Sprachmotorik, das Bewusstsein und das Gesichtsfeld mit seinen 4 Quadranten ein [9]. Der Maximalwert beträgt 42 Punkte. Der Punktwert der Skala korreliert mit der Schwere des Schlaganfalls, das heißt je höher der Wert, desto ausgeprägter ist die Symptomatik des Schlaganfalls [10].

1.3 Thrombozyt

1.3.1 Morphologie

Die Thrombozyten werden unter dem Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel dem Thrombopoetin aber auch Interleukinen, im Knochenmark gebildet. Thrombozyten entstehen aus ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten. Nachdem die Thrombozyten das Knochenmark verlassen haben, zirkulieren sie im peripheren Blut für 7-10 Tage.

Thrombozyten sind physiologischer Weise bei der Blutstillung, der sogenannten primären Hämostase, beteiligt. Sie spielen jedoch auch eine entscheidende Rolle bei der Entstehung thrombotischer Ereignisse [11].

Im inaktiven Zustand sind sie diskoid geformt und besitzen dabei eine mittlere Fläche von $3,1\mu\text{m}^2$ [12].

Thrombozyten haben, neben Mitochondrien und Glycogen, drei Arten von Granula in ihrem Zytoplasma

- dichte Granula
- α -Granula
- Lysosomen

Lysosomen sind Organellen des Zellstoffwechsels, die unter anderem diverse Proteasen enthalten und für den Kohlenhydrat-, Protein- und Fettstoffwechsel wichtig sind.

Die dichten Granula enthalten Calcium, Serotonin, biogene Amine, ADP und Polyphosphat, welche für die Plättchenaktivierung und –rekrutierung essenziell sind [11,13].

Die α -Granula, die einen großen Teil der Zelle ausmachen, beinhalten Adhäsionsmoleküle wie z.B. Fibrinogen und von-Willebrand-Faktor, gerinnungsfördernde Faktoren wie beispielsweise Faktor-XIII oder Faktor V, viele gerinnungshemmende Faktoren wie Protein C

oder Plättchenfaktor 4, fibrinolytische Bestandteile wie Plasminogen und Membranproteine (Übersicht Tabelle 1) wie das P-Selektin (CD62P) und diverse Integrine [14].

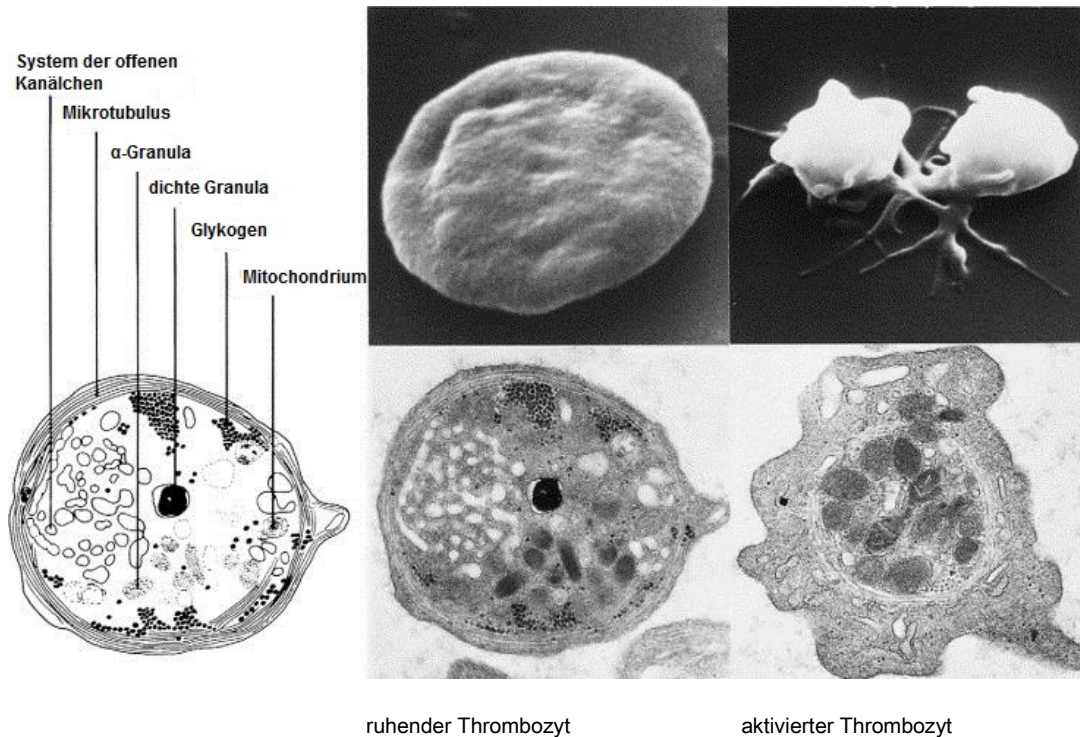


Abbildung 1: elektronenmikroskopische Aufnahme eines nicht aktivierten und eines aktivierten Thrombozyten [11]

1.3.2 Funktion

Thrombozyten können durch mehrere Faktoren aktiviert werden. Dazu gehört das Kollagen der Extrazellulärmatrix, welches bei einer Gefäßverletzung Kontakt zu den Thrombozyten bekommt, die Basallamina des Gefäßendothels, Fibrin, aber auch pathologische Oberflächen wie z.B. Atherome. Bei Kontakt zu Kollagen heften sich die Thrombozyten, anfänglich durch das GPIa/IIa vermittelt, an das Kollagen. Dies führt dazu, dass die Thrombozyten aktiviert werden und intrazelluläre Prozesse initiiert werden. Die Thrombozyten verändern ihre Form durch die Polymerisation und Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts und bilden so genannte Pseudopodien aus. Nach der Aktivierung

zentralisieren und entleeren sich die Granula [15]. Es wird Serotonin ausgeschüttet, welches zur Vasokonstriktion führt, und Thromboxan-A₂, welches weitere Thrombozyten rekrutiert. Es werden außerdem ADP, β -Thromboglobulin, Plättchenfaktor 4, von Willebrand-Faktor, Fibrinogen und weiterer Granulainhalt ausgeschüttet, der über eine Signalkaskade letztendlich zur Thrombozytenaggregation führt. Weiterhin entsteht die Thrombozytenaggregation dadurch, dass die Thrombozyten das frei flotierende Fibrinogen im Blut binden, welches ebenfalls von ihnen selbst ausgeschüttet wurde, um eine Verbindung zu den nahstehenden Thrombozyten zu ermöglichen. Die Bindung an das Fibrinogen wird hierbei vor allem durch das Integrin α IIb β 3 vermittelt. So bildet sich innerhalb weniger Minuten ein Plättchenpfropf (primäre Hämostase) aus aggregierten Thrombozyten [16,17].

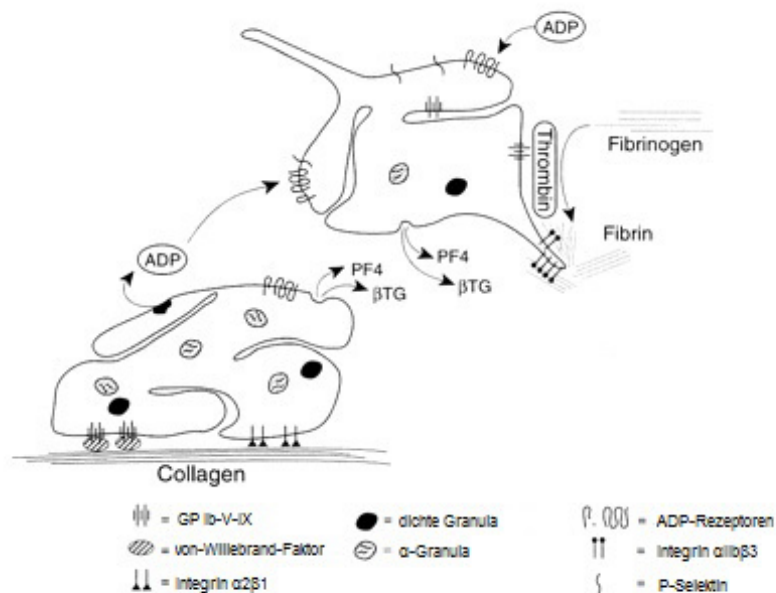


Abbildung 2: Aktivierung des Thrombozyten, modifiziert [17]

1.4. Thrombozyten – Leukozyten – Aggregate

1.4.1 Hintergrund

Thrombozyten sind aufgrund vieler Oberflächenrezeptoren nicht nur in der Lage mit anderen Thrombozyten eine Bindung einzugehen, sondern auch mit Endothelzellen und Leukozyten [18]. Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate wurden in der Vergangenheit schon oftmals beschrieben und untersucht. Zum ersten Mal wurde dieses Phänomen von dem Italiener Bizzozero um 1880 beschrieben. Dabei hat er intensiv die Morphologie und Funktion der Thrombozyten analysiert. Er stellte die These auf, dass sich sowohl Thrombozyten als auch Leukozyten, indem sie eine Fibrinogen vermittelte Bindung miteinander eingehen, an der Blutgerinnung beteiligen [19]. Im Jahre 1963 wurden die Aggregate dann von Field und MacLeod beschrieben. Sie wurden im Blut eines Jungen entdeckt, der mit Synkopen in die Klinik eingeliefert wurde. Dabei sprach man anfangs von Plättchensatellitismus [20]. Weiterhin fielen ca. 10 Jahre später die Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate bei Patienten mit einer sogenannten „falschen“ Thrombozytopenie und aktiviertem Morbus Behçet auf [21]. Im Laufe der Jahre wurde die Bedeutung der Thrombozyten–Leukozyten-Aggregate bei der Entstehung von thrombotischen Ereignissen deutlicher sowie das Verständnis darüber, dass nicht nur eine Aktivierung der Thrombozyten, sondern auch der Leukozyten eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von thrombotischen Ereignissen, wie z.B. der instabilen Angina pectoris oder dem Myokardinfarkt, spielt [22-25].

1.4.2 Konjugation

Aktivierte Thrombozyten sezernieren Chemokine und rekrutieren damit Leukozyten. In Verbindung mit Chemokinen, vor allem dem Chemokin (C-C motif) ligand 5 (CCL5), und der Bindung über das P-Selektin an die Leukozyten, sezernieren die Leukozyten wiederum

Zytokine, wie das Monocyte Chemotactic Protein-1 (MPC-1) oder das Interleukin 6 (IL-6), und bilden darüber hinaus freie Radikale, wie das Superoxid-Anion O_2^- . In der Folge wird aufgrund dieser Faktoren eine Entzündung gefördert. Ferner zirkulieren Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate über eine längere Zeit im Blut und sind so womöglich an dem „Remodelling“ der Gefäßwand beteiligt und erweisen sich als proatherogen [26].

Bei der Verbindung zwischen Thrombozyten und Leukozyten spielt das bereits mehrmals erwähnte Membranprotein P-Selektin, welches auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten exprimiert wird, eine entscheidende Rolle. Das Protein ist wichtig für die Rekrutierung, das Rollen und die Adhäsion der Monozyten an der Gefäßwand. Über den Liganden PSGL-1 (P-Selectin glycoprotein ligand-1), vorzufinden auf der Leukozyten- und vor allem der Monozytenoberfläche, kann der Leukozyt eine Bindung mit dem Thrombozyten eingehen [27,28]. Weitere relevante Rezeptoren für die Interaktion zwischen den beiden Zellreihen sind der GPIIb α - und der ICAM-2-Rezeptor auf den Thrombozyten, die Kontakte über das Integrin $\alpha_M\beta_2$ (= CD11b/CD18, Mac-1) sowie das LFA-1 (=CD11a/CD18) auf den Leukozyten herstellen. Die Adhäsion wird außerdem durch die Verbindung zu Fibrinogen sowohl vom Thrombozyten aus über den GPIIb/IIIa-Rezeptor, als auch vom Leukozyten über CD11b/CD18 nochmals gefestigt [29]. (Tabelle 1)

Oberflächenrezeptor	Ligand
P-Selektin	bindet PSGL-1 auf Neutrophilen, Monozyten, Mikropartikel und Th1-Zellen
ICAM-2	Bindet LFA-1 auf Neutrophilen und Monozyten
vWF	bindet GPIIb α
CD32	Obligatorischer Corezeptor für GP VI
GPIIb α	bindet vWF, P-Selektin und Mac-1
GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$)	Bindet Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, vWF, und Thrombospondin
GP VI	Hauptrezeptor des Thrombozyten für Kollagen
CD40L	bindet CD40 auf Monozyten und Endothelzellen

Tabelle 1: Übersicht der Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten [29]

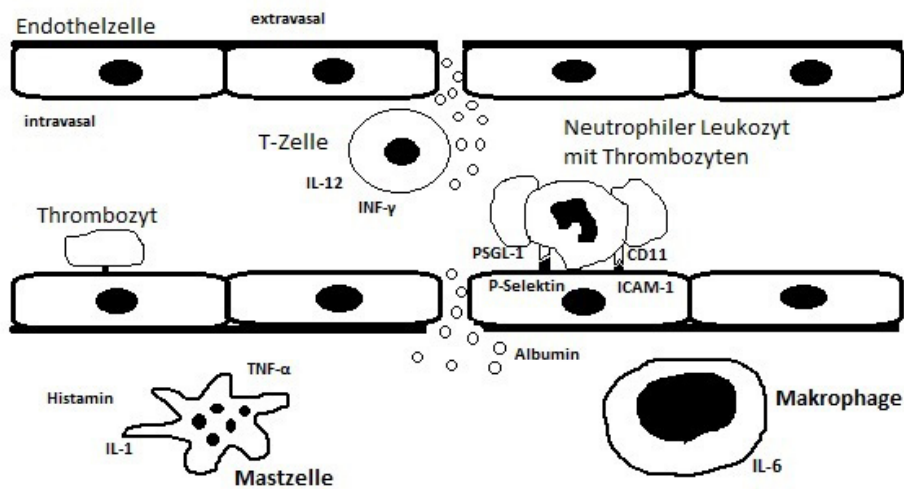


Abbildung 3: Pathogenese der Inflammation und Atherosklerose an der Gefäßwand und das Mitwirken von Thrombozyten und Leukozyten, modifiziert [30]

1.5 Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate bei Schlaganfallpatienten

Aufgrund der vermuteten Beteiligung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten an der Entstehung von Atherosklerose und thrombotischen Ereignissen, sowie dem Zusammenhang von aktivierten Thrombozyten und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten, rückte die Rolle der Aggregate bei der Entstehung des Schlaganfalls in den Fokus des Interesses. Es zeigte sich zunächst eine erhöhte Anzahl an aktivierten Thrombozyten bei Patienten mit einem akuten Schlaganfall und auch nach einem bereits abgelaufenen Schlaganfall, die mithilfe der Durchflusszytometrie und anhand der erhöhten Expression an P-Selektin gemessen wurde [31]. Weitere Studien bestätigten dies und zeigten einen Zusammenhang zwischen aktivierten Thrombozyten und einer verstärkten Entzündungsreaktion bei Schlaganfallpatienten [32,33].

Im Jahre 2004 verglichen McCabe et al. die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten bei Patienten mit akutem Schlaganfall sowie in der Genesungsphase mit gesunden Kontrollpersonen, wobei deutlich mehr Aggregate bei den Schlaganfallpatienten zu finden waren. Es fiel ebenfalls eine positive Korrelation zwischen der Expression von P-Selektin und den Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten, auch in der Genesungsphase, auf. Ferner konnte man trotz Antikoagulationstherapie in der Genesungsphase nach dem Schlaganfall eine vermehrte Aktivierung von Thrombozyten messen [34]. Außerdem stellte sich heraus, dass auch die Leukozytenaktivierung noch Monate nach dem Schlaganfall erhöht war [35].

Weitere Hinweise, die vermuten lassen, dass Thrombozyten und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate einen bedeutsamen Stellenwert in der Pathogenese des Schlaganfalls einnehmen, sind Berichte, wonach eine vermehrte Aktivierung der Thrombozyten bei der Hypercholersterinämie [36] und bei der Entstehung der Atherosklerose der Gefäße eine Rolle spielt. Da beides Risikofaktoren des Schlaganfalls darstellen, wären dies weitere Indizien für die Beteiligung der Thrombozyten und Leukozyten an der Entstehung des Schlaganfalls [37,38].

1.6 Fragestellung dieser Arbeit

Aus der vorangegangenen Darstellung ist die Bedeutung von aktivierten Thrombozyten und ihrer Verbindung zu Leukozyten beim Schlaganfall deutlich geworden.

In unserer Studie wurden folgende Punkte untersucht:

- die Aktivierung von Thrombozyten anhand der Expression von P-Selektin bei Patienten während eines akuten ischämischen Hirninfarkts im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen
- die Neigung zur Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten bei Schlaganfallpatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen

Ferner wurden die Bildung von aktivierten Thrombozyten und der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate in Korrelation zu klinischen Parametern gesetzt. Dazu gehörten

- Ätiologie: TOAST-Kriterien
- Schwere des Schlaganfalls: NIH-Stroke Scale-Punkte
- Größe des Embolus: Thrombuslänge

So sollte die Frage beantwortet werden, ob eine oder mehrere ätiologisch definierte Subformen des ischämischen Hirninfarkts mit einer vermehrten Aktivierung von Thrombozyten und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten verbunden sind und ob die Schwere des Schlaganfalls und die Länge des Thrombus mit den aktivierten Thrombozyten und den Aggregaten in einem Zusammenhang stehen.

2. Probanden, Material und Methoden

2.1 Patientengruppe

Alle Patienten wurden aus dem stationären Bereich der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, ausgewählt. Die Gruppe bestand aus 79 Patienten (48 % ♀, 62% ♂, Durchschnittsalter 72 J.) mit einem akuten ischämischen Schlaganfall, deren Symptome innerhalb von 24 Stunden vor der Blutentnahme begonnen hatten. Die Blutentnahme für die Untersuchung erfolgte vor dem Beginn einer intravenösen oder intraarteriellen Lyse. Die Patienten bekamen alle initial eine zerebrale Computertomographie (cCT) und ein Elektrokardiogramm (EKG). Ebenfalls wurde bei allen Patienten eine Doppler- und Duplexsonographie der hirnzuführenden Arterien durchgeführt, sowie ein zweite zerebrale bildgebende Darstellung mittels cCT oder zerebraler Kernspintomographie (cMRT) und ein 24-Stunden EKG. Auf Basis dieser Untersuchungen wurde die Ätiologie des Hirninfarkts mittels der Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) Kriterien klassifiziert. Dabei stand TOAST 1 für einen Schlaganfall makroangiopathischer Genese, TOAST 2 für einen Schlaganfall kardioembolischer Genese, TOAST 3 für einen Schlaganfall mikroangiopathischer Genese, TOAST 4 für einen Schlaganfall anderer Genese und TOAST 5 für eine unbekannte Genese (Tabelle 2). Der Schweregrad des Schlaganfalls wurde mittels der NIH Stroke Scale (NIHSS) evaluiert (Tabelle 3). Bei Patienten mit einem A. cerebri media - Infarkt wurde zusätzlich im Nativ-cCT mit einer etablierten Methode die Thrombuslänge durch einen Neuroradiologen gemessen. Dabei wurde der vaskuläre Verschluss, der in der CT-Angiographie bestätigt wurde, im nativ-CT in dünnen Schichten rekonstruiert. So konnte die Länge und das Volumen des Thrombus durch Vermessung dessen intraarterieller Hyperdensität erfasst werden (Abbildung 4) [39]. Um eine Korrelation der Höhe, der im Serum gemessenen Konzentration von Thrombozyten-

Leukozyten-Aggregate und der Aktivierung von Thrombozyten mit vaskulären Risikofaktoren vorzunehmen, wurden Grenzbereiche festgelegt. Die arterielle Hypertonie wurde definiert als ein wiederholt gemessener Blutdruck von über 140/90 mmHg und / oder eine bestehende antihypertensive Therapie. Ein Diabetes mellitus wurde definiert als ein HbA1c- Wert höher als 6,5% und / oder ein positiver oraler Glukosetoleranztest und / oder ein Blutzuckerspiegel im nüchternen Zustand über 126 mg/dl sowie einen Blutzuckerspiegel im nicht nüchternen Zustand von über 200 mg/dl und / oder eine vorbestehende antidiabetische Therapie. Eine Hypercholesterinämie wurde definiert als ein Gesamtcholesterinwert von über 240 mg/dl und ein LDL/HDL – Quotient von über 3,5 oder eine bereits diagnostizierte Hypercholesterinämie und / oder eine Cholesterin senkende Therapie. Beim Risikofaktor Nikotinabusus wurden ein aktueller Zigarettenkonsum sowie eine Aufgabe des Konsums innerhalb der letzten 10 Jahre gewertet. (Zusammenfassung siehe Tabelle 4)

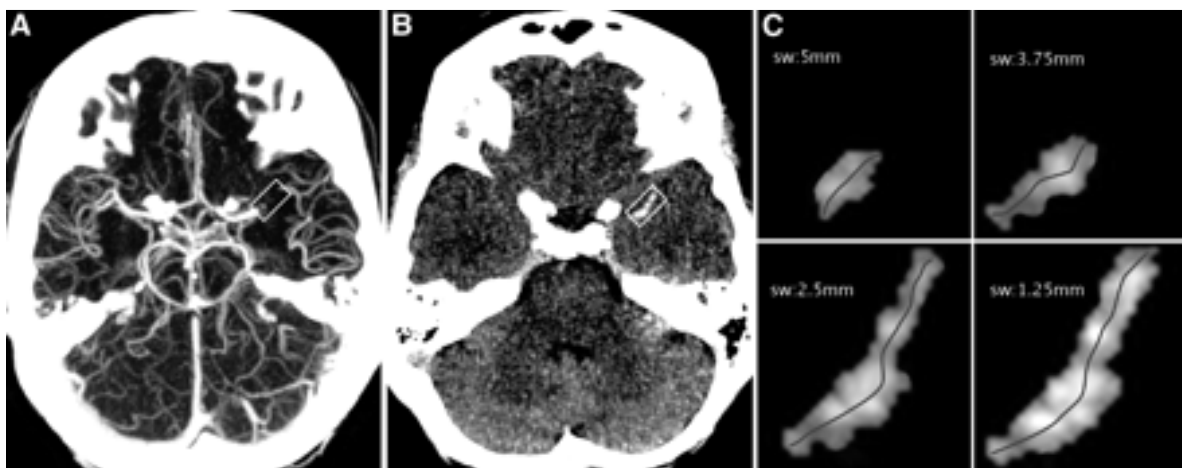


Abbildung 4: Thrombuslängenmessung anhand von CT-Bildern

A: Axiale Ansicht mit Darstellung des Circulus arteriosus Willisii in der CT-Angiographie und akutem ischämischen Insult in der linken Arteria cerebri media. B: Axiale Ansicht im Nativ-CT zeigt ein hyperdenseres Areal im Bereich der linken Arteria cerebri media (an der gleichen Stelle wie die Aussparung in der CT-Angiographie). C: Thrombus aus der Arteria cerebri media, Rekonstruktion aus Bildern des Nativ-CTs aus unterschiedlichen Schichtdicken, die graue Linie zeigt die Mittelaxe des Thrombus [39]

TOAST- Gruppe	Toast-Kriterien
1. Zerebrale Makroangiopathie (= Arteriosklerose der großen hirnversorgenden Arterien)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Symptomatik oder Infarkt auf ein Gefäßterritorium beschränkt ▪ $\geq 50\%$ige Stenose der extra- oder intrakraniellen, hirnversorgenden Arterien ▪ Ausschluss anderer Ätiologie
2. Kardiogene Embolie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Signifikante Emboliequelle ▪ Infarkte in mehreren Gefäßterritorien ▪ Ausschluss anderer Ätiologie
3. Zerebrale Mikroangiopathie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Infarkte mit der Symptomatik eines lakunären Syndroms (z.B. rein motorisch oder sensible Hemiparese, ataktische Hemiparese) ▪ Ausschluss anderer Ätiologie
4. Andere Ätiologie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Zum Beispiel: Gefäßdissektion, zerebrale Vaskulitis, Thrombophilie, iatrogen, etc.
5. unklare Ätiologie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Keine Pathologie nachgewiesen ▪ Mehr als 1 der o.g. Ursachen wurde nachgewiesen

Tabelle 2: TOAST-Klassifikation, modifiziert [40]

1A. Vigilanz (Bewusstsein)	wach (0) – benommen (1) – somnolent (2) – Koma (3)
1B. Fragen zur Orientierung	Beide Fragen richtig beantwortet (0) – 1 Frage richtig beantwortet (1) – keine Frage richtig beantwortet (2)
1C. Aufforderungen befolgen	Beide richtig befolgt (0) – 1 richtig befolgt (1) – keine richtig befolgt (2)
2. Okulomotorik (Blickbewegungen)	Normal (0) – partielle Blickparese (1) – forcierte Blickdeviation (3)
3. Gesichtsfeld	Keine Einschränkungen (0) – partielle Hemianopsie (2) – komplette Hemianopsie (3)
4. Fazialisparese	Normal (0) – gering (1) – partiell (2) – komplett (3)
5. Motorik der Arme a) links b) rechts	Kein Absinken (0) – Absinken (1) – Fallen (2) – kein Anheben gegen Schwerkraft möglich (3) – keine Bewegung (4)
6. Motorik der Beine a) links b) rechts	Kein Absinken (0) – Absinken (1) – Fallen (2) – kein Anheben gegen Schwerkraft möglich (3) – keine Bewegung (4)
7. Ataxie	Fehlend (0) – eine Extremität (1) – zwei Extremitäten (2)
8. Sensibilität	Normal (0) – leichter Sensibilitätsverlust (1) – schwerer Sensibilitätsverlust (2)
9. Sprache	Normal (0) – leichte Aphasie (1) – schwere Aphasie (2) – stumme, globale Aphasie (3)

10. Dysarthrie	Normal (0) – leichte (1) – schwere (2)
11. Neglect	Kein Neglect (0) – partieller Neglect (1) – vollständiger Neglect

Tabelle 3: NIHSS-Punkteübersicht [41,42]

Risikofaktoren	Höheres Risiko
Arterielle Hypertonie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antihypertensive Therapie ▪ RR > 140/90 mmHg
Diabetes mellitus	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diagnostizierter Diabetes ▪ antidiabetische Therapie ▪ HbA1c > 6,5% ▪ Blutzuckerspiegel nüchtern > 6,993 mmol/l (126 mg/dl) ▪ Positiver OGTT ▪ Blutzuckerspiegel > 11,1 mmol/l (200 mg/dl)
Hypercholesterinämie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diagnostizierte Hypercholesterinämie ▪ Cholesterinsenkende Therapie ▪ Cholesterin > 6,24 mmol/l (240 mg/dl) ▪ LDL/HDL Quotient > 3,5
Nikotinkonsum	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Raucher ▪ Aufgabe des Nikotinkonsum <10 Jahren

Tabelle 4: Übersicht und Definition der Risikofaktoren

2.2 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe bestand aus 154 Personen mit einer ähnlichen Alters- und Geschlechtsverteilung wie die Patientengruppe (58% ♀, 42% ♂, Durchschnittsalter 60 J.). Zu den Probanden gehörten einerseits Eheleute der Patienten aber auch und nicht verwandte Kontrollen kaukasischer Herkunft.

Ausschlusskriterien für die Kontrollgruppe waren kardiovaskuläre Erkrankung, ein Schlaganfall oder eine tiefe Beinvenenthrombose in der Vorgeschichte.

2.3 Rahmenbedingungen für beide Gruppen

Sowohl alle Patienten als auch die Kontrollpersonen hatten eine laborchemische Routineuntersuchung, zu der die Überprüfung des kleinen Blutbildes anhand von Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenanzahl sowie Hämoglobin- und Hämatokritgehalt gehörten. Eine Bestimmung von Cholesterin, High Density Lipoprotein (HDL), Low Density Lipoprotein (LDL) und HbA1c war ebenfalls von Bedeutung. Die Gerinnungsparameter mittels partieller Thromboplastinzeit (PTT) und Thromboplastinzeit (TPZ) und das C-reaktive Protein (CRP) als Hinweis für eine Entzündung wurden gemessen. Darüber hinaus wurden folgende Kriterien für eine Entzündung definiert: Temperatur rektal gemessen $>39^{\circ}\text{C}$, Leukozyten im Blut $> 9000\ \mu\text{l}/\text{mm}^3$ oder ein CRP $> 100\ \text{mg/l}$ ($10\ \text{mg/dl}$). Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie sowohl für die Patienten als auch die Kontrollpersonen waren schwere Lebererkrankungen, terminale Niereninsuffizienz, chronische oder akute Entzündungserkrankungen sowie eine Neoplasie. Ebenfalls wurden von der Studie Personen ausgeschlossen, die vor kurzem einen chirurgischen Eingriff hatten, eine akute Organischämie oder ein schweres Trauma 3 Monate vor der Blutentnahme erlitten hatten.

2.4 Antikörper und Puffer

Für die Durchführung der Durchflusszytometrie und Markierung der Zellen wurden 3 unterschiedliche monoklonale Antikörper verwendet. Diese sind bei Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland im Handel zu erwerben.

Thrombozyten wurden unabhängig von ihrem Stadium (aktiv/inaktiv) von Phycoerythrin (PE) konjugierten CD 41 (Klon P2) Antikörpern markiert, Leukozyten von dem

Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugierten CD 45 (Klon J.33). Die Expression von P-Selektin auf der Zelloberfläche von Thrombozyten wurde von dem FITC konjugierten CD 62P (Klon CLBThromb/6) gekennzeichnet. (Tabelle 5)

Der Puffer wurde aus 0,15 mol/l (150 mM) Natriumchlorid(NaCl), 0,005 mol/l (5mM) Kaliumchlorid, 0,001 mol/l (1mM) Magnesiumsulfat und 0,01 mol/l (10mM) 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure (Hepes) Puffer hergestellt.

Es wurde regelmäßig die Kontrolle mit Flow-Check Fluorospheres (von Beckman Coulter), bestehend aus fluoreszierenden Mikrokügelchen, und Dako Fluorospheres durchgeführt, um die Qualität und Aussagekraft der Durchflusszytometrie zu verifizieren.

Herstellerbezeichnung	CD41	CD45	CD62P
Anbieter	Beckman Coulter GmbH	Beckman Coulter GmbH	Beckman Coulter GmbH
Antigen	CD41	CD45	CD62P
Reaktivität	Mensch	Mensch	Mensch
Klonalität	monoklonal	monoklonal	monoklonal
Klon Nr.	P-2	J.33	CLBThromb/6
Anwendung	Blockierung ELISA Durchflusszytometrie Immunpräzipitation	Durchflusszytometrie	Blockierung Durchflusszytometrie Immunpräzipitation Schnellschnittuntersuchung Western Blot Intrazytoplasmatische Färbung
Konjugat	PE	FITC	FITC
Laseranregung	488 nm	495 nm	495 nm
Emissionsbereich	575 nm	519 nm	519 nm
Menge	100 Tests	100 Tests	100 Tests
Format	Flüssig	Flüssig	Flüssig
Regulationsstatus	CE	CE	CE
Bestellnummer	A07781	A07782	A07790

Tabelle 5: Übersicht der Antikörper und ihrer Eigenschaften

2.5 Versuchsdurchführung: Blutentnahme und Durchflusszytometrie

Die Blutentnahme erfolgte bei beiden Gruppen aus einer nur leicht gestauten Kubitalvene in Supinationsstellung mit einem Butterfly (G 21) und wurde mit 3,8%igem Natriumcitrat antikoaguliert. Dieses Blut wurde sofort in das Labor gebracht und dort für die Analyse mittels der Durchflusszytometrie verwendet. Das Blut befand sich anschließend für 10 Minuten in einem Wasserbad bei 37° C ohne Manipulation. Es wurden ebenfalls noch ein kleines EDTA-Röhrchen für die Bestimmung des kleinen Blutbilds und des HbA1c-Wertes, ein Serum-Röhrchen für die Bestimmung von Cholesterin, LDL, HDL und ein klinisches Chemie Röhrchen zur Untersuchung des C-reaktiven Proteins entnommen. Diese wurden im Institut für Klinischen Chemie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel untersucht. Nach der Inkubation im Wasserbad wurden zwei Ansätze mit den Antikörpern angesetzt. Der erste Ansatz bestand aus jeweils 10 µl CD 41-PE und CD 45-FITC, um Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate zu identifizieren. Der zweite Ansatz beinhaltete jeweils 10 µl CD 41 PE und CD-62P FITC, um den Anteil an aktivierten Thrombozyten zu evaluieren. Nun wurde 1000 µl des warmen Blutes (37°C), das mit 3,8%igem Natriumcitrat antikoaguliert wurde, mit 9000 µl warmen Hepes-Puffer (37° C) 1:10 verdünnt. Anschließend wurden die beiden oben beschriebenen Ansätze mit Antikörpern mit jeweils 25 µl der Blut/Puffer Lösung beimpft. Es folgte die Inkubation für exakt 5 Minuten, die anschließend mit 750 µl kaltem Hepes-Puffer gestoppt wurde und folgend mit der Durchflusszytometrie untersucht wurde. Eine Lyse der Erythrozyten war in diesem Ansatz nicht notwendig.

Die Durchflusszytometrie als FACS (Fluorescence-activated cell sorting)-Analyse, wurde mit einem Gerät vom Typ EPICS XL von Beckman Coulter durchgeführt. Das Gerät wurde vor Beginn und nach Ende der Messung nach einem im Labor ausgearbeiteten und etablierten Protokoll täglich gereinigt. Es ist seit mehreren Jahren in unserem Labor in Betrieb.

Demgemäß wurde mit Hilfe des Vorwärtsstreulicht (FS = forwardscatter) und dem Seitwärtsstreulicht (SS = sidescatter) der Durchflusszytometrie (EPICS XL, Beckman Coulter) anhand der unterschiedlichen Zellgröße und -beschaffenheit die Bindung der Thrombozyten an Leukozyten und ihre Untergruppen wie Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten ermittelt. Dabei wurden zuerst die Thrombozyten, die CD 41 positiv waren, im Fluoreszenzkanal 2 (FL -2) herausgefiltert, in einem anderen Kanal wurden die Thrombozyten auf Grund ihrer Größe und Beschaffenheit durch den Forward- und Sidewordscatter erkannt. Um nun die Anzahl der aktivierten Thrombozyten bestimmen zu können, wurden 10000 Durchläufe, die beide Kriterien erfüllt hatten, weiterhin auf P-Selektin Positivität untersucht. Um das Ausmaß der Thrombozytenaktivierung anzuzeigen, wurde die durchschnittliche Fluoreszenz ermittelt. Ebenso wurde die Anzahl der Thrombozyten, die P-Selektin auf ihrer Oberfläche exprimierten, in Relation zu allen erfassten Thrombozyten gesetzt. Für den Nachweis von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten, wurde die CD45-Fluoreszenz im FL-1 Kanal verwendet. Die unterschiedlichen Leukozyteneigenschaften im Vorwärtsstreulicht (forwardscatter), Seitwärtsstreulicht (sidescatter) und FL-1 Kanal wurden ermittelt um zwischen den einzelnen Leukozytenuntergruppen zu unterscheiden. Mit der gleichzeitigen Bestimmung von CD41-PE markierten Thrombozyten war es möglich Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate und ihre Untergruppen darzustellen. Für die numerische Auswertung wurde der prozentuale Anteil an Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten in Relation zu allen erfassten Leukozyten und ihren Subgruppen gesetzt.

2.6 Statistische Analysen

Die statistischen Untersuchungen und Berechnungen wurden in Kooperation mit Herrn Dipl.-Math. Arne Jochens durchgeführt (Institut für Medizinische Informatik und Statistik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel). Dabei wurden die beiden Gruppen (Patienten und Kontrollen) miteinander verglichen aber auch die Korrelation zu klinischen Parametern berechnet. Um die gemessenen Parameter zwischen den beiden Gruppen vergleichen zu können, wurde der Mann-Whitney-U-Test und der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Beide Testverfahren gehören zu den nicht parametrischen Testverfahren. Die Verfahren setzen keine Normalverteilung voraus. Außerdem reichen ordinalskalierte Daten aus und es werden nicht notwendigerweise Intervall- oder Verhältnisskalierte Daten benötigt. Die verwendeten Testverfahren sind daher statistisch sehr robust. [43].

Der Mann-Whitney-U-Test vergleicht zwei voneinander unabhängige Gruppen und prüft ob zwischen bei beiden Gruppen erhobenen Werten ein signifikanter Unterschied besteht. Dabei wird aber nicht direkt mit den Messwerten gerechnet, sondern mit den Rangplätzen der Messwerte [44].

Der Kruskal-Wallis-Test ist im Prinzip dem Mann-Whitney-U-Test ähnlich, kann aber auch bei einem Vergleich von mehr als 2 Gruppen angewandt werden [45].

Ein weiteres statistisches Verfahren, das angewandt wurde um die unterschiedlichen Merkmale der beiden Gruppen vergleichen zu können, ist der Chi-Quadrat-Test. Der Chi-Quadrat-Test dient zum Vergleich von Häufigkeitsverteilungen von Merkmalen. Dabei wird untersucht inwiefern sich die Merkmalsausprägung, die beobachtet wurde, statistisch signifikant von der erwarteten Verteilung unterscheidet. Der 4-Felder-Chi-Quadrat-Test untersucht, im Gegensatz zu dem eindimensionalen Chi-Quadrat-Test, 2 Merkmale mit 2 Merkmalsausprägungen. [46]

Zum Zweck des Beziehungsvergleichs (Korrelation) zwischen den einzelnen Variablen (z.B. Thrombuslänge in Korrelation zu Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten) wurde der Spearman Rang-Korrelationskoeffizient benutzt. Dieser erlaubt den Vergleich zweier nicht normalverteilten Variablen. Ein linearer Zusammenhang der korrelierten Daten wird dabei nicht vorausgesetzt. Der Korrelationskoeffizient basiert auch hier auf Rängen und nicht den tatsächlichen Daten [47].

Um eine Bewertung und somit eine Aussagekraft über die Ergebnisse zu erzielen, wurde die statistische Signifikanz bestimmt. Diese wird durch den p-Wert repräsentiert. Das Signifikanzniveau = α wurde hierbei mit 5% bzw. 0,05 definiert. Der p-Wert entspricht dem Signifikanzniveau bei dem man die Nullhypothese ablehnt. Wenn der p-Wert also kleiner als das Signifikanzniveau ist, wird die Nullhypothese verworfen und das Ergebnis als signifikant bezeichnet. Logistische und lineare Regressionen wurden mit Hilfe des Computerprogramms „IBM SPSS Statistics, Vs. 18“ berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Charakteristische Merkmale der Patientengruppe

Das Alter der 79 untersuchten Patienten lag im Durchschnitt bei 72 Jahren (SD +/- 14). Fast die Hälfte der Patienten war weiblich (48%) und ein sehr großer Anteil litt an einer arteriellen Hypertonie (81%). Ein Diabetes mellitus war bei 24%, ein Nikotinabusus bei 33% und eine Hyperlipidämie bei 47% der Untersuchten vorzufinden. Etwa ein Viertel der Patienten war unter einer Antikoagulationstherapie mit Heparin oder Marcumar und etwa die Hälfte der Patienten (44%) wurde mit einem Thrombozytenaggregationshemmer therapiert. Eine Erhöhung von Laborparametern, die eine systemische Entzündung spiegeln können (Leukozytose und / oder CRP Erhöhung) ließ sich bei fast einem Drittel der Patienten feststellen (Tabelle 6). Wie zu erwarten, hatten Patienten signifikant häufiger eine Hypertonus, einen Diabetes mellitus, eine Hyperlipidämie und eine laborchemisch nachweisbare Entzündungsreaktion als Kontrollpersonen (Tabelle 6).

3.2 Charakteristische Merkmale der Kontrollgruppe

Die untersuchten Personen der Kontrollgruppe waren im Durchschnitt 60 Jahre alt (SD +/- 14) und damit signifikant jünger als die Patientengruppe (Tabelle 6), da es uns leider nicht gelang eine Kontrollgruppe zu rekrutieren, die in ihrer Altersverteilung exakt der Patientengruppe entsprach. Die Geschlechterverteilung in der Gruppe war relativ ausgeglichen (58% weiblich) und vergleichbar mit der Fallgruppe. 43% der Kontrollpersonen waren an einer arteriellen Hypertonie erkrankt, an einem Diabetes mellitus waren nur 5% der Kontrollpersonen erkrankt. Etwa ein Drittel der Kontrollpersonen hatte laborchemisch eine Hyperlipidämie und 23% der Kontrollpersonen betrieben einen Nikotinkonsum. Eine

Antikoagulationstherapie oder eine Behandlung mit einem Thrombozytenaggregationshemmer sowie eine Entzündung spielten in der Kontrollgruppe keine große Rolle (Tabelle 6).

3.3 Gegenüberstellung der beiden Gruppen

Das Durchschnittsalter der untersuchten Patienten war signifikant höher als das der Kontrollgruppe. Vergleicht man die Risikofaktoren wie arterieller Hypertonus, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus, so waren diese bei der Patientengruppe ebenfalls signifikant erhöht. Beim Vergleich der Geschlechterverteilung fällt kein großer und signifikanter Unterschied auf. Beim Vergleich des Nikotinkonsums unterscheiden sich die Gruppen kaum voneinander. Deutlich mehr Patienten bekamen eine Antikoagulationstherapie, sowie eine Thrombozytenaggregationshemmung im Vergleich zu den untersuchten Kontrollpersonen (Tabelle 6).

	Kontrollen	Patienten	p-Wert	Testverfahren
Alter	60 (SD+/-14)	72 (SD+/-14)	p<0.01	Mann-Whitney-Test
Weiblich (%)	87 (58)	38 (48)	0.169	Chi-Quadrat-Test
Art. Hypertonus (%)	64 (43)	63 (81)	<0.01	Chi-Quadrat-Test
Diabetes mellitus (%)	7 (5)	19 (24)	<0.01	Chi-Quadrat-Test
Nikotinabusus (%)	35 (23)	23 (33)	0.13	Chi-Quadrat-Test
Hyperlipidämie (%)	44 (29)	35 (47)	0,01	Chi-Quadrat-Test
Thrombozytenagg.hemmer(%)	11 (8)	37 (44)	<0.01	Chi-Quadrat-Test
Antikoagulation (%)	1 (0,7)	20 (24)	<0.01	Chi-Quadrat-Test
Entzündung (%)	11 (8)	29 (37)	<0.01	Chi-Quadrat-Test

Tabelle 6: Wichtige Merkmale der Patienten mit Apoplex und der Kontrollpersonen

3.4 Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate

Wir untersuchten das Auftreten von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten (engl.: platelet-leukocyte-aggregates, PLA) bei den Schlaganfallpatienten, sowie bei den Kontrollpersonen und verglichen diese miteinander. Wie in vorausgehenden Studien beschrieben, hatten die Patienten deutliche höhere Werte bei den Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten als die Kontrollpersonen. Abbildung 5 A zeigt hierbei die in Prozent dargestellten Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate bezogen auf die Gesamtzahl an Leukozyten. Die Berechnung mit dem Mann-Whitney-U-Test zeigte, dass dieser Unterschied mit einem p-Wert von $<0,001$ statistisch hoch signifikant ist.

3.5 Thrombozytenaktivierung

Die Thrombozytenaktivierung wurde über die Expression von P-Selektin (CD62P) im Durchflusszytometer gemessen. Die absolute Anzahl aktivierter Thrombozyten wurde auf die Gesamtzahl der Thrombozyten bezogen. Die Ergebnisse beider Gruppen wurden ebenfalls miteinander verglichen. Hier zeigte sich eine signifikant höhere Menge an aktivierten Thrombozyten im Blut der Schlaganfallpatienten im Vergleich zu der Kontrollgruppe. (Abbildung 5 B).

Auch dieser Unterschied ist mit einem p-Wert im Mann-Whitney-U-Test von $<0,001$ hoch signifikant.

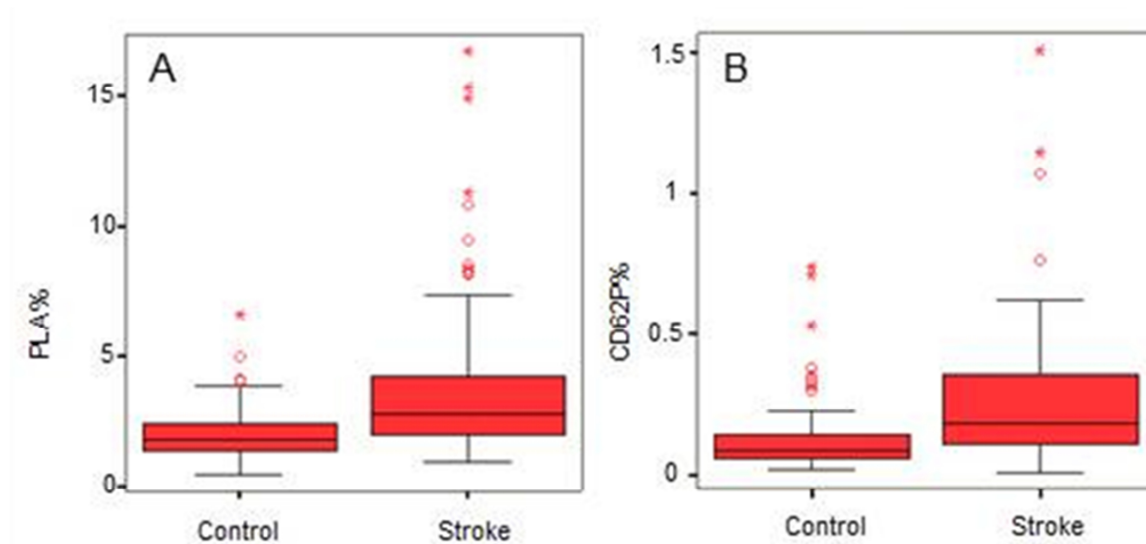


Abbildung 5 A, B:

A: Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate in Prozent bei Schlaganfallpatienten und den Kontrollpersonen

B: Thrombozytenaktivierung in Prozent bei Schlaganfallpatienten und Kontrollpersonen

3.6 Thrombozytenaktivierung und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate in Korrelation zu NIHSS und TOAST

Des Weiteren wurden die Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate und die aktivierten Thrombozyten mit der klinischen Infarktschwere korreliert, die mit Hilfe des Wertes auf der NIH-Stroke Scale gemessen wurde. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient (Spearman-Rho) zeigte eine geringe aber statistisch signifikante Korrelation zwischen Thrombozyten-Leukozyten-Aggregation und NIHSS-Punkten mit einem p-Wert von 0,011. Zwischen Thrombozytenaktivierung und NIHSS-Punkten fand sich keine statistisch signifikante Korrelation (Spearman-Rho Test, $p=0,344$) (Abbildung 5 C)

Außerdem wurden die Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate und die Thrombozytenaktivierung anhand der TOAST Kriterien untersuchten Ätiologie des Schlaganfalls korreliert. Dieser Vergleich wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Die Anzahl der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate waren ebenso wie die Anzahl der

aktivierten Thrombozyten in den fünf TOAST-Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Bei den Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten ergab die Berechnung einen p-Wert von 0,632 und bei den aktivierten Thrombozyten einen p-Wert von 0,693. (Abbildung 5 D)

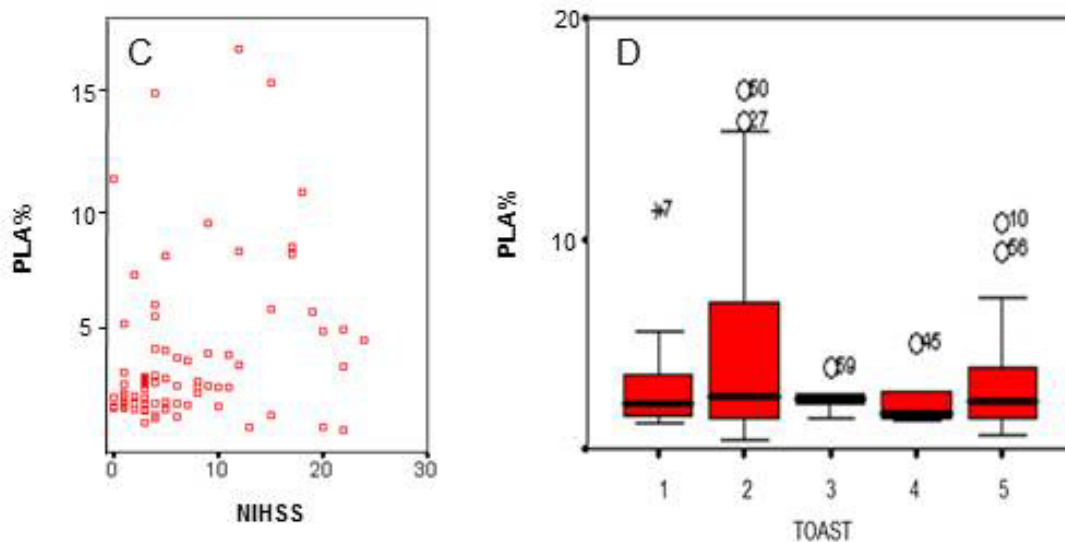


Abbildung 5 C, D:

C: Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate in Prozent in Bezug auf NIHSS-Punkte

D: Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate in Prozent in Bezug auf die einzelnen Unterkategorien der TOAST-Kriterien (s. S. 2)

3.7 Thrombuslänge in Korrelation zu Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten und Thrombozytenaktivierung

Es wurde bei 36 Patienten mit Arteria cerebri media Infarkt die Länge des Thrombus in der Arteria cerebri media gemessen [39]. Die Thrombuslänge wurde daraufhin mit der Menge der aktivierten Thrombozyten und den Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten verglichen. Hierbei wurde auch der Spearman-Rho zum Vergleich der Variablen eingesetzt. Es zeigten jedoch weder die Anzahl der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate ($p=0,671$), noch die Menge der aktivierten Thrombozyten ($p=0,880$) eine statistisch signifikante Korrelation zu der

Thrombuslänge. Die Korrelation zwischen NIHSS-Punkten und Thrombuslänge war, wie erwartet, mit einem p-Wert von $<0,001$ hoch signifikant.

3.8 Modellbildung: Welche der von uns erhobenen Parameter sind statistisch signifikant mit dem ischämischen Hirninfarkt assoziiert?

Es wurde analysiert welche Merkmale einen signifikanten Zusammenhang zu dem Schlaganfall, der Thrombozytenaktivierung und der Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten darstellen. Hierzu wurden Regressionsmodelle benutzt. Logistische – und lineare Regressionsanalysen wurden mittels manueller Rückwärtsselektion in SPSS mit einem Ausschluss p-Wert von >0.1 und einem Einschluss p-Wert von <0.05 durchgeführt.

3.8.1 Logistisches Regressionsmodell mit ischämischen Schlaganfall als abhängige Variable

Bei der logistischen Regression werden dichotom abhängige Variablen untersucht, d.h. in unserem Fall die Unterteilung in Fälle und Kontrollen. Für den ischämischen Schlaganfall wurde die Variable P-Selektin nicht mitberücksichtigt, da die Aktivierung der Thrombozyten eine Grundvoraussetzung für die Bildung der Aggregate von Thrombozyten mit Leukozyten ist und daher per se einen sehr starken Zusammenhang mit der Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten zeigt. Geschlecht, Alter, kardio-vaskuläre Risikofaktoren wie Hypertonus, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Rauchen, Entzündungswerte und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate sind die unabhängigen Variablen.

In der logistischen Regression stellten sich folgende Faktoren als unabhängige Determinanten des ischämischen Hirninfarkts heraus:

Geschlecht ($p=0,038$), Alter ($p=0,001$), Hypertension ($p= 0,009$), Diabetes mellitus ($p=0,028$), Entzündung ($p<0,001$), Nikotinabusus ($p=0,001$), Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate ($p< 0,001$). Nagelkerkes R^2 , ein Maß für den erklärenden Beitrag der Faktoren an der abhängigen Variable ischämischer Hirninfarkt, betrug 0,53.

3.8.2 Regressionsmodell zu Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten

Bei diesem Regressionsmodell wurden die Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate als abhängige Variable gesetzt und als unabhängige Variablen Geschlecht, Alter, die kardiovaskulären Risikofaktoren, Entzündungswerte und Thrombozytenaktivität (P-Selektin).

Bei dieser Analyse stellten sich folgende Faktoren als Determinanten der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate heraus:

Geschlecht ($p= 0,039$), Alter ($p= 0,029$), Erkrankungsstatus ($p= 0,001$), Thrombozytenaktivität ($p< 0,001$). Nagelkerkes R^2 betrug 0,36.

3.8.3 Regressionsmodell zu Thrombozytenaktivierung

Als drittes wurde nun die Thrombozytenaktivität als abhängige Variable angenommen. Die unabhängigen Variablen stellten wieder die gleichen Faktoren dar.

Hier zeigte sich nur der Erkrankungsstatus als ein signifikanter Faktor mit $p< 0,001$ bei einem korrigiertem $R^2=0,13$.

4. Diskussion

4.1. Kernaussagen

Klinisch und laborchemisch wurde eine Vielzahl von Parametern untersucht, zu denen unter anderem klinische Rating Skalen wie die NIHSS, die ätiologisch orientierte TOAST Klassifikation, bildgebende Parameter wie die Thrombuslänge und Laborwerte wie z.B. Blutzucker und Cholesterin zählen. In unserem Labor wurden die Aktivierung von Thrombozyten sowie die Bildung von Aggregaten, bestehend aus Thrombozyten und Leukozyten, während des akuten Schlaganfalls mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

- Es zeigte sich eine höhere Anzahl an aktivierten Thrombozyten und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten bei Patienten mit akutem Schlaganfall im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen.
- Es zeigte sich keine Korrelation von Thrombozytenaktivierung und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten zu der Ätiologie des Schlaganfalls bestimmt anhand der TOAST-Kriterien.
- Es zeigte sich keine Korrelation der Thrombozytenaktivierung und nur eine schwache Korrelation der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate zur klinischen Ausprägung des Schlaganfalls bestimmt mithilfe der NIH-Stroke Scale.
- Es zeigte sich keine Korrelation von Thrombozytenaktivierung und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten zu der gemessenen Thrombuslänge in der A. cerebri media.
- Hingegen zeigte sich eine starke Korrelation der Thrombuslänge zur klinischen Ausprägung des Schlaganfalls gemessen mit der NIH-Stroke Scale.

- Es zeigte sich jedoch eine signifikante Korrelation zwischen Schlaganfall und vaskulären Risikofaktoren Geschlecht, Alter, Hypertension, Diabetes mellitus, Inflammation und Nikotinabusus im Regressionsmodell.
- Es zeigte sich eine signifikante Abhängigkeit des Schlaganfalls von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten im Regressionsmodell.
- Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten und Geschlecht, Alter, Schwere des Hirninsultes und Thrombozytenaktivierung im Regressionsmodell.

4.2 Thrombozytenaktivierung und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass aktivierte Thrombozyten und die Anzahl der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate beim akuten Schlaganfall im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht waren. Die Aktivierung der Thrombozyten wurde anhand der Expression von P-Selektin (CD 62P), einem Thrombozytenaktivierungsmarker, gemessen. Somit stimmen unsere Ergebnisse mit den Ergebnissen der wichtigsten Studien der letzten Jahre überein [32,34,35]. Gegenteilige Ergebnisse, die keine vermehrte Thrombozytenaktivierung beim akuten Schlaganfall zeigten, wurden in der Vergangenheit auch vereinzelt beschrieben [48].

Einige Studien, die sich mit der Aktivierung von Thrombozyten beschäftigen, zeigten die Wichtigkeit des CD40L-Rezeptors. Dieser Rezeptor befindet sich ebenfalls, wie das P-Selektin, auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten und kann somit auch ein Maß für die Aktivierung von Thrombozyten sein. Es wurde in diesen Studien ein Zusammenhang zwischen dem CD40-System und dem akuten Schlaganfall festgestellt. So zeigten Patienten

mit einem akuten Schlaganfall eine höhere Aktivität des CD40-Systems, sprich eine höhere Thrombozytenaktivierung neben einer höheren Bildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten [49]. Neuere Studien zu diesem Thema gehen noch weiter. So wird postuliert, dass eine erhöhte Aktivität von CD40L im Serum in Korrelation zu einem schlechteren klinischen Outcome und somit einer schlechteren Prognose steht und damit CD40L die Bedeutung eines Biomarkers bezüglich Prognose des Schlaganfalls zuteilwerden würde [50]. In unserer Studie haben wir die Aktivität der Thrombozyten anhand des P-Selektins mittels Durchflusszytometrie gemessen, da diese Methode am besten für unsere Fragestellung geeignet war und darüber hinaus bereits gut etabliert ist und schon in verschiedenen Studien zuvor verwendet wurde [32,34,35].

4.3 Thrombozytenaktivierung und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate in Korrelation zu klinischen Merkmalen

Es wurde in der Literatur ein eindeutiger Zusammenhang zwischen einer vermehrten Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten sowie einer vermehrten Aktivierung von Thrombozyten und dem akuten Schlaganfall beschrieben, was wir in unseren Untersuchungen bestätigen konnten. Die Korrelation der Thrombozytenaktivierung und der Bildung von Aggregaten mit Leukozyten mit klinischen Parametern beim akuten Schlaganfall war bisher jedoch nicht eindeutig möglich und es gibt in der Literatur durchaus widersprüchliche Ergebnisse. So wurde beispielsweise eine vermehrte Thrombozytenaktivierung anhand einer vermehrten P-Selektin Expression und eine vermehrte Aggregatbildung bei Schlaganfällen makro- und mikroangiopathischer Genese, jedoch nicht bei einer kardio-embolischen Ätiologie beschrieben [51,52,53]. Andere

Untersuchungen beschrieben eine vermehrte P-Selektin Expression und somit eine vermehrte Thrombozytenaktivierung und Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten beim akuten Schlaganfall und der Transitorischen Ischämischen Attacke (TIA) sowohl in der akuten Phase (vor allem in den ersten 24 Stunden) als auch in der Phase der Genesung, in der sie sich dann abfallend zeigen. Betrachtet man die Beteiligung der Subpopulationen der Leukozyten an der Aggregatbildung mit Thrombozyten zu unterschiedlichen Phasen, so waren Monozyten-Thrombozyten-Aggregate vermehrt in der akuten Phase vorzufinden, während Granulozyten-Thrombozyten-Aggregate auch in der subakuten Phase nachzuweisen waren [32,34,35,54].

In unserer Studie konnten wir keine Korrelation zur Infarktetiologie nachweisen, die wir anhand der TOAST-Kriterien (s.o.) klassifizierten.

Weiterhin wurde die Beziehung zwischen aktivierten Thrombozyten sowie Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten und der klinischen Ausprägung des Schlaganfalls untersucht. Die klinische Ausprägung wurde mit Hilfe der NIH-Stroke Scale quantifiziert. Es zeigte sich in unserer Untersuchung nur in Bezug auf die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten Aggregaten eine schwache positive Korrelation zur Schwere des klinischen Bildes. Beim Blick in die Literatur konnten andere Studien eine positive Korrelation von P-Selektin und dem Punktwert auf der NIH-Stroke Scale, d.h. der klinischen Ausprägung, nachweisen [55]. Eine andere Untersuchung setzte die Schwere des Hirninfarkts, gemessen anhand der NIH-Stroke Scale, in Korrelation zur Expression des Liganden des P-Selektins, also zu PSGL-1. Weiterhin wurde eine Korrelation zwischen Punktwert auf NIHSS und der Expression von Mac-1 und LFA-1 erhoben. Beide sind auf Leukozyten vorzufinden und zur Interaktion von Leukozyten mit aktivierten Thrombozyten notwendig. Dabei korrelierte das monozytäre Mac-

1 positiv mit dem NIHSS-Punktesystem und PSGL-1 mit vermutlich einer frühen neurologischen Verschlechterung der Symptomatik [56].

Andere klinische Parameter, die in Bezug auf die Thrombozytenaktivierung und Aggregatbildung untersucht werden, sind Infarktgröße und / oder Volumen. Da bei diesen Untersuchungen jedoch auch sehr widersprüchliche und wenig überzeugende Ergebnisse publiziert wurden, entschieden wir uns für einen bildmorphologischen Surrogatmarker für die Infarktschwere, nämlich die Länge des Thrombus in der Arteria cerebri media, die anhand von dünn geschichteten cCT Bildern vermessen werden kann. Es zeigte sich jedoch auch hier bei den 36 eingeschlossenen Patienten keine signifikante Korrelation zur Thrombozytenaktivierung und Aggregatbildung. Dies könnte zum Teil an der kleinen Gruppe liegen, bei denen der Thrombus gemessen werden konnte. Die Korrelation der Thrombuslänge zu der Schwere des Schlaganfalls (Punkte auf NIHSS) war erwartungsgemäß positiv, da die Größe des betroffenen Areals beim Schlaganfall durch die Größe des Thrombus bedingt ist und die somit auch die Klinik und das Ausmaß der Krankheit beeinflusst [57].

4.4 Interpretation der Regressionsmodelle

Nachdem wir das Phänomen der Thrombozytenaktivierung und Aggregatbildung mit Leukozyten beim akuten Schlaganfall in unserer Studie bestätigen konnten, eine eindeutige Korrelation zu klinischen Parametern aber nicht gelang, blieb der entscheidende Punkt der pathogenetischen Relevanz der Aktivierung und Aggregatbildung zu klären. Verschiedene Hypothesen werden diskutiert:

1. **Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate entstehen auf dem Boden einer bereits vorliegenden Atherosklerose und sind daher nur ein Epiphänomen ohne eigene pathogenetische Relevanz.** Diese These wird unterstützt durch den Nachweis von vermehrter Thrombozytenaktivierung bei Patienten mit einer Atherosklerose der Karotiden mit oder ohne Diabetes mellitus Typ 2 [37,58].
2. **Aggregate und Aktivierung treten, zumindest teilweise unabhängig von einer Atherosklerose bzw. vaskulären Risikofaktoren auf und stellen eigenständige Risikofaktoren dar.**

So wurde in einer Studie, die neben einer gesunden Kontrollgruppe eine Kontrollgruppe, bestehend aus Patienten mit vaskulären Risikofaktoren, untersuchte, nachgewiesen, dass singuläre aber auch multiple Risikofaktoren nicht mit einer erhöhten Thrombozytenaktivierung einhergehen [32]. Aus diesen Ergebnissen könnte gefolgert werden, dass die Aktivierung unabhängig von den vaskulären Risikofaktoren auftritt, wobei weiterhin nicht geklärt ist, ob die Aktivierung ein eigener Risikofaktor mit pathogenetischer Relevanz ist. Als neuartig ist unsere statistische Analyse mit Hilfe eines Regressionsmodells anzusehen. Ziel war es herauszufinden, ob die Thrombozytenaktivierung sowie die damit verbundene Bildung von Aggregaten zwischen Thrombozyten und Leukozyten als ein Epiphänomen im Rahmen des Schlaganfalls anzusehen ist oder ob sie einen unabhängigen Risikofaktor bei der Entstehung des Schlaganfalls darstellen. Unsere Regressionsanalysen sprechen dafür, dass Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate einen unabhängigen Risikofaktor darstellen. Dies muss nicht bedeuten, dass sie vollständig von anderen Risikofaktoren abgegrenzt sind, sondern heißt nur, dass sie nicht vollständig durch diese erklärt werden. Im letzteren Falle wäre zu erwarten,

dass die Thrombozyten-Leukozyten-Aggregatbildung im Laufe der Rückwärtsselektion aus dem Regressionsmodell eliminiert wird.

Im Regressionsmodell zeigte sich wie erwartet ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem akuten Schlaganfalls und den bekannten vaskulären Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, art. Hypertonus, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Hyperlipidämie) [59,60], d.h. der Schlaganfall hatte als abhängige Variable die bekannten Risikofaktoren. Interessanterweise gab es auch einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten und dem Schlaganfall, jedoch unabhängig von den bereits bekannten Risikofaktoren. Somit stellten sich im Regressionsmodell die Aggregate als unabhängiger Risikofaktor für den Schlaganfall dar. Die Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate waren wiederum von Geschlecht, Alter, Thrombozytenaktivierung und der Ausprägung des ischämischen Hirninsultes abhängig.

Mit diesem Ergebnis können die Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate und die Thrombozytenaktivierung als mögliche eigenständige Risikofaktoren des ischämischen Hirninsultes interpretiert werden, die nicht mit den bereits bekannten Risikofaktoren wie Alter, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus oder Nikotinabusus, aber auch nicht durch die Inflammation erklärt werden können.

4.5 Limitationen

Mögliche Fehlerquellen in der Studie liegen zum einen in der unterschiedlichen Gruppengröße und der unterschiedlichen Verteilung von Risikofaktoren innerhalb der Gruppen wie zum Beispiel Alter, arterieller Hypertonus oder Antikoagulation. Weiterhin sollte eine längere Stauung des Armes beim Blutabnehmen vermieden werden, damit es nicht zu

einer Aktivierung der Thrombozyten durch die Blutentnahme kommt. Dies ließ sich auf Grund der unterschiedlichen Venenverhältnisse nicht immer vermeiden.

4.6 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Rolle von P-Selektin und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten beim akuten Schlaganfall. Die Bedeutung eines klinischen, laborchemisch fassbaren Biomarkers zur Diagnosestellung eines akuten Hirninsultes aus dem Blut, wäre enorm und könnte eine Hilfe bei Diagnosefindung und Therapieentscheidungen darstellen. Diese Biomarker könnten helfen den Schlaganfall zu klassifizieren, das Outcome der Erkrankung einzuschätzen und das Komplikationsrisiko (wie zum Beispiel ein Hirnödem oder Blutungen nach einer Lysetherapie) zu bewerten. Weiterhin würden Biomarker aus dem Serum auch eine Diagnosestellung des akuten Schlaganfalls bei Patienten erlauben, die keinen Zugang zu bildgebenden Verfahren haben. Des Weiteren könnte so eine Differenzierung zu anderen Krankheiten, wie Migräne oder Krämpfen, mit nur einer laborchemischen Untersuchung erleichtert werden. So könnten Fehldiagnosen minimiert werden, das Management in der Behandlung der Schlaganfallpatienten effizienter gestaltet werden und Therapien, wie eine Lysetherapie oder interventionelle Verfahren, könnten zeitnah eingesetzt werden [61].

Es wurden in der Vergangenheit viele verschiedene Proteine und Gene in Form von RNA als potentielle Biomarker für den Schlaganfall untersucht. Die Sensitivität und Spezifität von bisher diskutierten Biomarkern beim akuten Schlaganfall war jedoch so gering, dass daraus keine Relevanz für den klinischen Alltag entstand [62]. Die mögliche Relevanz des P-Selektins als ein klinischer Biomarker für den akuten Schlaganfall, die Venenthrombose oder

den Diabetes mellitus wurde schon mehrfach beschrieben und leider - bis jetzt - ohne eine klinische Konsequenz diskutiert [63].

In unserer Studie konnten wir zwar eine signifikante Abhängigkeit des Schlaganfalls von der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregation darstellen, jedoch lässt sich aufgrund der fehlenden Korrelation zu klinischen Parametern, sowohl bei der Thrombozytenaktivierung als auch bei den Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten, weder das P-Selektin sicher als ein Biomarker mit klinischer Relevanz ableiten, noch die Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate. Da P-Selektin eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese des Schlaganfalls zu spielen scheint, ob nun über die Atherosklerose oder als eigenständiger Risikofaktor, wäre eine therapeutische Intervention mit P-Selektin als Angriffspunkt denkbar. So gab es schon mehrere Studien zu einem neuen P-Selektin Inhibitor, PSI-697. In Tierversuchen konnte der Inhibitor zwar eine Thrombose nicht verhindern, hatte aber eine größere entzündungshemmende Wirkung an den Gefäßwänden. Weiterhin gelang mit der Zeit eine Wiederöffnung des Venenlumens um bis zu 80%, ohne eine messbare Antikoagulation. Im Vergleich dazu führte Heparin zu einer langsameren Wiedereröffnung des Lumens [64]. Ex vivo konnte das PSI-697 eine Thrombusbildung beim Menschen reduzieren [65]. Eine neuere Untersuchung in Bezug auf das PSI-697 und Verhinderung der Neubildung von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten bei gesunden Rauchern war ohne das erhoffte Ergebnis [66].

Es wird deutlich, dass das Thema der Thrombozytenaktivierung und Aggregatbildung mit Leukozyten wichtig aber auch sehr komplex ist und bis heute Gegenstand kontroverser Diskussion ist. In Zukunft sind weitere Studien erforderlich, dabei wären genetische Untersuchungen in Hinblick auf Polymorphismen in den an der Aggregation beteiligten Genen hilfreich, um zu klären, ob eine genetische Prädisposition zur vermehrten Bildung von

Aggregaten und der Aktivierung von Thrombozyten besteht und damit diese Prädisposition als eigenständiger Risikofaktor bei der Entwicklung des Schlaganfalls anzusehen ist.

5. Zusammenfassung

Der ischämische Hirninfarkt ist eine sehr häufige neurologische Erkrankung, die häufig mit einer Langzeitinvalidität verbunden ist. Es kommt zu einer plötzlichen Unterbrechung der Blutzufuhr in einem Hirnareal und folglich zu einer Beeinträchtigung der Hirnfunktion. Die Thrombozytenaktivität und ihre Bindung zu den Leukozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose und des ischämischen Hirninfarktes. Aktivierte Thrombozyten sezernieren Chemokine und locken Leukozyten an der Gefäßwand an. Es kommt zu einer Inflammation, weiterhin bilden die aktivierten Thrombozyten Aggregate mit den Leukozyten. Ein wichtiges Membranprotein bei der Konjugation beider Zellreihen ist das P-Selektin, das auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten zu finden ist. Mehrere Studien fanden eine erhöhte Expression von P-Selektin und eine verstärkte Neigung zur Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten in Blut von Patienten mit ischämischem Hirninfarkt. Das Ziel unserer Studie war eine Korrelation von P-Selektin und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate zu klinischen Parametern zu finden. Dazu untersuchten wir das Blut von 79 Patienten mit einem akuten ischämischen Hirninfarkt innerhalb von 24 Stunden nach Symptombeginn und bei 154 Kontrollpersonen ohne – anamnestisch bekannte – vaskuläre Vorerkrankungen mittels Durchflusszytometrie. Die Ergebnisse wurden mit den TOAST-Kriterien zur Ätiologiefindung, den NIHSS-Punkten und der Thrombuslänge, die mittels CT ermittelt worden ist, in Korrelation gesetzt. Weitere statistische Analysen wurden durch Regressionsmodelle durchgeführt. Die Thrombozytenaktivität und die Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate waren bei Patienten mit ischämischem Hirninfarkt signifikant höher im Vergleich zu den Kontrollpersonen. Bei der Infarktätiologie und der Thrombuslänge zeigte sich keine Korrelation, jedoch eine leichte Korrelation bei den Punkten der NIH-Stroke Scale. Im Regressionsmodell zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit des Schlaganfalls von den

Risikofaktoren des Schlaganfalls aber auch von den Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten. Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate korrelierten signifikant mit dem Geschlecht, Alter, Ausmaß der Erkrankung und der Thrombozytenaktivierung. Die Thrombozytenaktivierung korrelierte mit der Schwere des Insultes, jedoch kann man keine sichere klinische Relevanz des P-Selektins oder der Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate als Biomarker ableiten. Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate und die Thrombozytenaktivierung können jedoch vermutlich als eigenständige Risikofaktoren des ischämischen Hirninsultes interpretiert werden. Um sicher Aussagen bezüglich des Biomarkers beim ischämischen Insult treffen zu können, werden in Zukunft weitere Untersuchungen notwendig sein.

Literaturverzeichnis

1. Nolte CH, Villringer A; Kompetenznetz Schlaganfall. [*The German competence network stroke: researching -- promoting -- networking*]. Med Klinik (Munich). 2006 Mar. 15; 101(3): p: 250-4
2. Forsting, Michael / Diener, Hans-Christoph / Hacke, Werner: *Schlaganfall*, Stuttgart: Thieme 2004, S. 1
3. Lee AC, Tang SW, Yu GK, Cheung RT. *Incidence and predictors of depression after stroke (DAS)*. Int J Psychiatry Clin Pract. 2007;11(3):200-6. doi: 10.1080/13651500601091212.
4. Sitzer, Matthias / Steinmetz, Helmut: *Lehrbuch Neurologie*, München: Urban und Fischer Verlag / Elsevier GmbH 2011, S. 147-48
5. Zhang Y, Chapman AM, Plested M, Jackson D, Purroy F. *The Incidence, Prevalence, and Mortality of Stroke in France, Germany, Italy, Spain, the UK, and the US: A Literature Review*. Stroke Res Treat. 2012; 2012: 436125, published online 2012 March 1. doi: 10.1155/2012/436125
6. Hacke, Werner: *Neurologie*, Heidelberg: Springer, 13., überarb. Aufl. 2010, S. 175, S. 186
7. Chung JW, Park SH, Kim N, Kim WJ, Park JH, et al. *Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) Classification and Vascular Territory of Ischemic Stroke Lesions Diagnosed by Diffusion-Weighted Imaging*. J Am Heart Assoc. 2014 Aug 11;3(4).
8. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. *Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*. Stroke. 1993 Jan;24(1):35-41
9. Goldstein LB, Samsa GP. *Reliability of the National Institutes of Health Stroke Scale. Extension to non-neurologists in the context of a clinical trial*. Stroke. 1997 Feb;28(2):307-10.

10. Lyden P, Lu M, Jackson C, Marler J, Kothari R, Brott T, Zivin J. *Underlying structure of the National Institutes of Health Stroke Scale: results of a factor analysis. NINDS tPA Stroke Trial Investigators.* Stroke. 1999 Nov;30(11):2347-54.
11. George JN. *Platelets.* Lancet. 2000 Apr 29;355(9214):1531-9.
12. Frojmovic MM, Milton JG. *Human platelet size, shape, and related functions in health and disease.* Physiol Rev. 1982 Jan;62(1):185-261.
13. McGivern TJ, Molloy K, Bahar M, McElvaney NG, Moran N, Kerrigan SW. *A platelet dense-granule secretion defect may lead to a muted inflammatory cell mobilization response in cystic fibrosis patients.* J Thromb Haemost. 2013 Oct;11(10):1939-42. doi: 10.1111/jth.12377.
14. Barthels, Monika: *Gerinnungskompndium: Schnellorientierung, Befundinterpretation, klinische Konsequenzen [Gebundene Ausgabe],* Thieme Verlag, 2. Auflage 2012, S.34
15. Jurk K, Kehrel BE. *Platelets: physiology and biochemistry.* Semin Thromb Hemost. 2005;31(4):381-92.
16. Nurden, AT., *Platelets and tissue remodeling: extending the role of the blood clotting system.* Endocrinology. 2007 Jul. 148(7): p. 3053-5
17. del Zoppo GJ. *The role of platelets in ischemic stroke.* Neurology. 1998 Sep;51(3 Suppl 3):S9-14.
18. Ruggeri ZM, *Platelet Adhesion under Flow.* Microcirculation. 2009 January; 16(1): 58–83.
19. de Gaetano G, Cerletti C. *Platelet adhesion and aggregation and fibrin formation in flowing blood: a historical contribution by Giulio Bizzozero.* Platelets. 2002 Mar;13(2):85-9.
20. Field E. J. and MacLeod I., *Platelet Adherence to Polymorphs.* Br Med J. 1963 August 10; 2(5353): 388, 389.
21. Kjeldsberg CR, Swanson J. *Platelet satellitism.* Blood. 1974 Jun;43(6):831-6.

22. Bazzoni G, Dejana E, Del Maschio A. *Platelet-neutrophil interactions. Possible relevance in the pathogenesis of thrombosis and inflammation.* Haematologica. 1991 Nov-Dec;76(6):491-9.
23. Freedman JE, Loscalzo J. *Platelet-monocyte aggregates: bridging thrombosis and inflammation.* Circulation. 2002 May 7;105(18):2130-2.
24. Rosin C, Brunner M, Lehr S, Quehenberger P, Panzer S. *The formation of platelet-leukocyte aggregates varies during the menstrual cycle.* Platelets. 2006 Feb; 17(1):61-6.
25. Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, Prescott SM, Zimmerman GA. *Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes.* J Clin Invest. 1996 Mar 15;97(6):1525-34.
26. McGregor L, Martin J, McGregor JL. *Platelet-leukocyte aggregates and derived microparticles in inflammation, vascular remodelling and thrombosis.* Front Biosci. 2006 Jan 1;11:830-7.
27. Brown KK, Henson PM, Maclouf J, Moyle M, Ely JA, Worthen GS. *Neutrophil-platelet adhesion: relative roles of platelet P-selectin and neutrophil beta2 (DC18) integrins.* Am J Respir Cell Mol Biol. 1998 Jan;18(1):100-10.
28. Ahn KC, Jun AJ, Pawar P, Jadhav S, Napier S, McCarty OJ, Konstantopoulos K. *Preferential binding of platelets to monocytes over neutrophils under flow.* Biochem Biophys Res Commun. 2005 Apr 1;329(1):345-55.
29. Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. *Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation.* Blood Rev. 2007 Mar;21(2):99-111. Epub 2006 Sep 20.
30. Stephen F. Rodrigues and D. Neil Granger. *Role of blood cells in ischaemia-reperfusion induced endothelial barrier failure.* Cardiovasc Res. 2010 July 15; 87(2): 291–299. Published online 2010 March 17. doi: 10.1093/cvr/cvq090, PMID: PMC2895540. Editor's Choice
31. Grau AJ, Ruf A, Vogt A, Lichy C, Bugge F, Patscheke H, et al. *Increased fraction of circulating activated platelets in acute and previous cerebrovascular ischemia.* Thrombosis and haemostasis. 1998;80:298-301.

32. Marquardt L, Ruf A, Mansmann U, Winter R, Schuler M, Bugge F, et al. *Course of platelet activation markers after ischemic stroke*. Stroke; a journal of cerebral circulation. 2002;33:2570-4.
33. Garlichs CD, Kozina S, Fateh-Moghadam S, Handschu R, Tomandl B, Stumpf C, et al. *Upregulation of CD40-CD40 ligand (CD154) in patients with acute cerebral ischemia*. Stroke; a journal of cerebral circulation. 2003;34:1412-8.
34. McCabe DJ, Harrison P, Mackie IJ, Sidhu PS, Purdy G, Lawrie AS, et al. *Platelet degranulation and monocyte-platelet complex formation are increased in the acute and convalescent phases after ischaemic stroke or transient ischaemic attack*. British journal of haematology. 2004;125:777-87.
35. Htun P, Fateh-Moghadam S, Tomandl B, Handschu R, Klinger K, Stellos K, et al. *Course of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in cerebrovascular ischemia*. Stroke; a journal of cerebral circulation. 2006;37:2283-7.
36. Davi G, Romano M, Mezzetti A, Procopio A, Iacobelli S, Antidormi T, et al. *Increased levels of soluble P-selectin in hypercholesterolemic patients*. Circulation. 1998;97:953-7.
37. Koyama H, Maeno T, Fukumoto S, Shoji T, Yamane T, Yokoyama H, et al. *Platelet P-selectin expression is associated with atherosclerotic wall thickness in carotid artery in humans*. Circulation. 2003;108:524-9.
38. Shoji T, Koyama H, Fukumoto S, Maeno T, Yokoyama H, Shinohara K, et al. *Platelet activation is associated with hypoadiponectinemia and carotid atherosclerosis*. Atherosclerosis. 2006;188:190-5
39. Riedel CH, Jensen U, Rohr A, Tietke M, Alfke K, Ulmer S, et al. *Assessment of thrombus in acute middle cerebral artery occlusion using thin-slice nonenhanced Computed Tomography reconstructions*. Stroke; a journal of cerebral circulation. 2010;41(8):1659-64. Epub 2010/07/03.
40. Ringelstein, E.Bernd/ Nabavi, Darius G.: *Der ischämische Schlaganfall: eine praxisorientierte Darstellung von Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie*, Stuttgart: Kohlhammer 2007, S.26

41. Lyden P, Brott T, Tilley B, Welch KM, Mascha EJ, Levine S, et al. *Improved reliability of the NIH Stroke Scale using video training. NINDS TPA Stroke Study Group. Stroke. 1994; 25: 2220-2226* doi: 10.1161/01.STR.25.11.2220
42. Brott T, Adams HP Jr, Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, et al. *Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. Stroke. 1989 Jul;20(7):864-70.*
43. Caliebe, Imke / Hedderich, Jürgen / Krawczak, Michael: *Vorlesungsskript Methodik des wissenschaftlichen Arbeitens*, Kiel, 3. überarb. Aufl. 2009, S. 334
44. Rasch, Björn / Friese, Malte / Hofmann, Wilhelm Johann / Naumann, Ewald: *Einführung in die Statistik für Psychologen und Sozialwissenschaftler: Einführung in die Statistik*, Berlin, Heidelberg : Springer, 2. Aufl. 2006, S. 144
45. Toutenburg, Helge / Knöfel, Philipp : *Six Sigma Methoden und Statistik für die Praxis*, Berlin, Heidelberg: Springer, 2. Aufl. 2009, S. 176
46. Raab, Gerhard / Unger, Alexander / Unger, Fritz : *Methoden der Marketing-Forschung, Grundlagen und Praxisbeispiele*, Wiesbaden: Gabler, 2.Aufl. 2009, S. 210-211
47. Schendera, Christian F. G.: *Datenmanagement und Datenanalyse mit dem SAS-System*, München: Oldenbourg Wissenschaftsverlag, 2004, S.497
48. Järemo P, Eriksson M, Lindahl TL, Nilsson S, Milovanovic M. *Platelets and acute cerebral infarction. Platelets. 2013;24(5):407-11. doi:10.3109/09537104.2012.712168. Epub 2012 Aug 14.*
49. Garlich CD, Kozina S, Fateh-Moghadam S, Handschu R, Tomandl B, et al. *Upregulation of CD40-CD40 ligand (CD154) in patients with acute cerebral ischemia. Stroke. 2003 Jun;34(6):1412-8. Epub 2003 May 22.*
50. Lukasik M, Dworacki G, Kufel-Grabowska J, Watala C, Kozubski W. *Upregulation of CD40 ligand and enhanced monocyte-platelet aggregate formation are associated with worse clinical outcome after ischaemic stroke. Thromb Haemost. 2012 Feb;107(2):346-55. doi: 10.1160/TH11-05-0345. Epub 2012 Jan 11.*

51. Turgut B, Turgut N, Celik Y, Tekgündüz E, Pamuk GE, Demir MJ. *Differences in platelet-leukocyte aggregates among subtypes of acute cerebral ischemia*. *Neurol Sci*. 2011 Jun 15;305(1-2):126-30. doi: 10.1016/j.jns.2011.02.026. Epub 2011 Mar 25.
52. Oberheiden T, Nguyen XD, Fatar M, Elmas E, Blahak C, et al. *Platelet and monocyte activation in acute ischemic stroke--is there a correlation with stroke etiology?* *Clin Appl Thromb Hemost*. 2012 Jan-Feb;18(1):87-91. doi: 10.1177/1076029611412359. Epub 2011 Jul 6.
53. Oberheiden T, Blahak C, Nguyen XD, Fatar M, Elmas E, et al. *Activation of platelets and cellular coagulation in cerebral small-vessel disease*. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2010 Dec;21(8):729-35. doi: 10.1097/MBC.0b013e328340147c.
54. Marquardt L, Anders C, Buggle F, Palm F, Hellstern P, Grau AJ. *Leukocyte-platelet aggregates in acute and subacute ischemic stroke*. *Cerebrovasc Dis*. 2009;28(3):276-82. doi: 10.1159/000228710. Epub 2009 Jul 16.
55. Cha JK, Jeong MH, Kim EK, Lim YJ, Ha BR, Kim SH, Kim JWJ. *Surface expression of P-selectin on platelets is related with clinical worsening in acute ischemic stroke*. *Korean Med Sci*. 2002 Dec;17(6):811-6.
56. Tsai NW, Chang WN, Shaw CF, Jan CR, Huang CR, et al. *The value of leukocyte adhesion molecules in patients after ischemic stroke*. *J Neurol*. 2009 Aug;256(8):1296-302. doi: 10.1007/s00415-009-5117-3. Epub 2009 Apr 8.
57. Staubach S, Hein-Rothweiler R, Hochadel M, Segerer M, Zahn R, et al. *Predictors of minor versus major stroke during carotid artery stenting: results from the carotid artery stenting (CAS) registry of the Arbeitsgemeinschaft Leitende Kardiologische Krankenhausärzte (ALKK)*. *Clin Res Cardiol*. 2014 Jan 11. [Epub ahead of print]
58. Shoji T, Koyama H, Fukumoto S, Maeno T, Yokoyama H, et al. *Platelet-monocyte aggregates are independently associated with occurrence of carotid plaques in type 2 diabetic patients*. *J Atheroscler Thromb*. 2005;12(6):344-52.

59. Lucke-Wold BP, Turner RC, Lucke-Wold AN, Rosen CL, Huber JD. *Age and the metabolic syndrome as risk factors for ischemic stroke: improving preclinical models of ischemic stroke*. Yale J Biol Med. 2012 Dec;85(4):523-39. Epub 2012 Dec 13.
60. Hoerger TJ, Ahmann AJ. *The impact of diabetes and associated cardiometabolic risk factors on members: strategies for optimizing outcomes*. J Manag Care Pharm. 2008 Feb;14(1 Suppl C):S2-14; quiz 15-6.
61. Bettermann K. *Biomarkers for stroke: in search of fingerprints*. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2011 May-Jun;20(3):173-6. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2011.02.003. Epub 2011 Mar 16.
62. Glen C, Jickling J, Frank R, Sharp D. *Blood Biomarkers of Ischemic Stroke*. Neurotherapeutics. 2011 July; 8(3): 349–360. Published online 2011 June 14. doi: 10.1007/s13311-011-0050-4
63. Kappelmayer J, Nagy B Jr, Miszti-Blasius K, Hevessy Z, Setiadi H. *The emerging value of P-selectin as a disease marker*. Clin Chem Lab Med. 2004 May;42(5):475-86.
64. Myers DD Jr, Wroblewski SK, Longo C, Bedard PW, Kaila N, et al. *Resolution of venous thrombosis using a novel oral small-molecule inhibitor of P-selectin (PSI-697) without anticoagulation*. Thromb Haemost. 2007 Mar;97(3):400-7.
65. Chelliah R, Lucking AJ, Tattersall L, Daga S, Beresford-Cleary NJ, et al. *P-selectin antagonism reduces thrombus formation in humans*. J Thromb Haemost. 2009 Nov;7(11):1915-9. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03587.x. Epub 2009 Aug 19.
66. Japp AG, Chelliah R, Tattersall L, Lang NN, Meng X, et al. *Effect of PSI-697, a novel P-selectin inhibitor, on platelet-monocyte aggregate formation in humans*. J Am Heart Assoc. 2013 Jan 28;2(1):e006007. doi: 10.1161/JAHA.112.006007.

Abstract

Präsentation bei der 29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurointensiv- und Notfallmedizin in Berlin (18.01.2012 - 21.01.2012)

Klinische Relevanz von Biomarkern der Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung beim akuten Schlaganfall

B. Schmalbach, O. Stepanow, A. Jochens, C. Riedel, S. Thier, G. Deuschl, G. Kuhlenbäumer (Kiel)

Fragestellung: Thrombozytenaktivierung spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung arterieller Thromben sowie der Entwicklung von Atherosklerose und damit in der Pathophysiologie des Schlaganfalls. P-Selektin ist ein auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten exprimierter Thrombozytenaktivierungsmarker. Eine Erhöhung von P-Selektin und eine verstärkte Neigung zur Bildung von Thrombozyten-Leukozyten Aggregaten wurden im Blut von Patienten mit akutem Schlaganfall nachgewiesen. Eine Korrelation zu klinischen Parametern gelang allerdings bisher nicht. Ziel unserer Studie war die Korrelation von P-Selektin und Thrombozyten-Leukozyten Aggregation mit klinischen Parametern des ischämischen Hirninfarkts.

Methoden: Wir untersuchten P-Selektin und Thrombozyten-Leukozyten Aggregation bei 88 Schlaganfallpatienten innerhalb von 24 Stunden nach Symptombeginn und bei 154 Kontrollpersonen ohne bekannte vaskuläre Erkrankung. Die ermittelten Werte wurden mit klinischen Parametern, wie dem Punktwert auf der NIH-Stroke Skala, der Infarktätologie, der Thrombuslänge und zahlreichen weiteren Werten korreliert. Die Thrombuslänge wurde mit Hilfe von 2,5 mm dünnen Schichten eines nicht Kontrastmittel verstärkten CTs quantifiziert.

Ergebnisse: Die Thrombozytenaktivierung und die Zahl der Thrombozyten-Leukozyten Aggregate waren bei Schlaganfallpatienten statistisch signifikant höher im Vergleich zu

gesunden Kontrollen. Bei den Schlaganfallpatienten zeigte sich keine Korrelation mit der Infarktetiologie oder der Thrombuslänge jedoch eine schwache Korrelation mit dem Punktwert auf der NIH-Stroke Skala bei Aufnahme.

Schlussfolgerung: Es zeigte sich zwar eine statistische Signifikanz bezüglich einer Korrelation zwischen Thrombozytenaktivierung und Schwere des Schlaganfalls, eine sichere klinische Relevanz dieser Biomarker lässt sich hierdurch jedoch nicht ableiten, so dass weitere Untersuchungen notwendig sein werden.

Determinants of Platelet-Leukocyte Aggregation and Platelet Activation in Stroke

Barbara Schmalbach^a Olga Stepanow^a Arne Jochens^b Christian Riedel^c
Günther Deuschl^a Gregor Kuhlenbäumer^a

^aDepartment of Neurology, ^bInstitute of Medical Informatics and Statistics, and ^cDepartment of Neuroradiology, Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany

Key Words

Platelet · Ischemic stroke · Platelet activation · Platelet leukocyte interactions · Platelet gene polymorphisms · Blood biomarkers

Abstract

Background: Platelet-leukocyte aggregation (PLA) and platelet activation are found to be on the higher side in ischemic stroke patients. The correlation of PLA with clinical features has not been intensively investigated and the influence of genetic factors on PLA is still unexplored. The interaction of platelets with leukocytes is mainly determined by the proteins encoded by six genes: P-Selectin (*SELP* encodes CD62P) on the thrombocyte binding to P-Selectin-Glycoprotein-Ligand-1 (*PSGL1*) on the leukocyte, intracellular-adhesion-molecule 2 (*ICAM2*) interacting with Integrin alpha M (*ITGAM*) and Glycoprotein 1b-alpha (*GP1BA*) binding to Integrin alpha L (*ITGAL*). **Methods:** Seventy-nine patients with acute ischemic stroke and 151 controls without vascular disease from a single German center were enrolled. A neurologist and a neuroradiologist ascertained clinical and radiological features. PLA and platelet activation were analyzed using flow cytometry with various antibodies. Coding as well as tagging SNPs in six genes determining PLA were genotyped. Three groups of parameters were correlated with

each other: (i) clinical and radiological parameters, (ii) laboratory parameters, (iii) genetic parameters. For the comparisons, robust nonparametric statistical tests were applicable. **Results:** PLA and platelet activation were higher in ischemic stroke patients compared to controls. Both, anticoagulant and antiplatelet treatment in the patient group affected platelet activation but not PLA. PLA correlated weakly with measures of stroke severity but not with thrombus length or stroke etiology. The association of SNP rs2228315 in the P-Selectin Glycoprotein Ligand-1-gene (*PSGL1*) with ischemic stroke and platelet activation was significant before correction for multiple testing while a trend was observed for the association with PLA. Regression analysis revealed that (i) platelet activation was an independent determinant of stroke, (ii) that PLA correlated with stroke, sex, age and platelet activation and (iii) that platelet activation correlated only with stroke. None of the SNPs survived in the regression analysis for stroke, PLA or platelet activation as dependent variables. **Conclusions:** The most important result of our study is that PLA and platelet activation are independent of other vascular risk factors correlated with stroke in our sample. In addition, we identified the missense SNP rs2228315 in the *PSGL1*-gene as a candidate polymorphism for ischemic stroke-related PLA. Association between this SNP and stroke as well as coronary artery disease has also been shown by two other studies.

© 2015 S. Karger AG, Basel

KARGER 125

© 2015 S. Karger AG, Basel
1015-9770/15/0394-0176\$39.50/0

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/ced

Gregor Kuhlenbäumer
Department of Neurology
Christian-Albrechts-University
Arnold-Heller-Strasse 3, Haus 41, DE-24105 Kiel (Germany)
E-Mail g.kuhlenbaeumer@neurologie.uni-kiel.de

Downloaded by:
Universitaet Kiel
194.84.191.180 - 2/26/2015 8:24:22 AM

Introduction

Several studies have shown that PLA and platelet activation are increased in ischemic stroke [1–5]. The fact that both parameters increase in patients with hypercholesterolemia and atherosclerosis, that is, the fact that patients are at a risk for an ischemic event, suggests that platelet activation and aggregation are involved in the pathogenesis of stroke [6–8]. Activated platelets recruit monocytes to the vessel wall and facilitate penetration into the subendothelial space, where monocytes differentiate into macrophages and contribute to the development of atherosclerosis [9]. P-Selectin (*SELP*) is stored in platelets and translocates to the cell surface upon platelet activation. P-Selectin binds to P-Selectin-Glycoprotein-Ligand-1 (*PSGL1*), which is expressed on most leukocytes and mediates platelet-leukocyte interaction [10, 11]. Interaction between platelets and leukocytes is furthermore determined by intercellular adhesion molecule 2 (*ICAM2*) and Glykoprotein 1b-alpha (*GP1BA*) on platelets interacting with Integrin alpha M (*ITGAM*) and Integrin alpha L (*ITGAL*) on leukocytes [12].

In this study, we corroborate that ischemic stroke is associated with platelet activation and increased PLA, examine their relation with clinical and radiological findings and analyze the association with SNPs in the six genes that are the main determinants of platelet-leukocyte interaction.

Materials and Methods

Patients and Controls

Seventy-nine patients with an acute ischemic stroke (onset of symptoms <24 h before blood drawing) and 151 controls consisting of spouses and unrelated locals without a history of stroke or cardiovascular disease were enrolled in the study. Clinical, radiological and laboratory investigations as well as the definition of vascular risk factors, anticoagulant and antiplatelet therapy and the exclusion criteria, can be found in the online-only supplementary data (for all online suppl. material, see www.karger.com/doi/10.1159/000375396). Stroke etiology was classified according to the Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) criteria and stroke severity assessed at admission using the NIH Stroke Scale (NIHSS). All laboratory tests as well as a detailed assessment of vascular risk factors were performed in patients and control individuals.

Flow Cytometry

PLA and platelet activation were measured by flow cytometry using established procedures on an EPICS XL (Beckman Coulter) flow cytometer; the investigators were blinded to subject status (stroke or healthy control). Detailed procedures including blood sampling and all antibodies used are found in the online-only data

supplement. Platelet activation was measured using the CD62P expression on the surface of platelets. In addition to PLA, the aggregation of platelets with monocytes, lymphocytes and granulocytes was measured.

Genetic Analysis

26 SNPs in the genes *SELP*, *PSGL1*, *ITGAM*, *ITGAL*, *GP1BA* and *ICAM2* were analyzed in DNA extracted from peripheral blood leukocytes using Sequenom[®] mass spectrometry or TaqMan[®] technology. SNP selection was governed by the following criteria: (1) coding missense SNPs; (2) tagging SNPs; (3) in case of poor LD across genes SNPs were spaced evenly; (4) only SNPs with a minor allele frequency (MAF) of ≥ 0.1 or greater were selected. A complete SNP list and association data can be found in the online-only data supplement. All SNPs could be genotyped in >95% of DNA-samples and the genotyping rate was >95% in all samples.

Statistical Analysis

Comparisons between groups with regard to continuous variables were assessed using robust nonparametric tests, which do not assume normal distributions of the continuous variables (Mann-Whitney U test for two groups, Kruskal Wallis test for >2 groups). The relationship between two continuous variables was assessed by the Spearman-Rho test. Genetic analysis: Hardy-Weinberg equilibrium (exclusion if $p < 0.001$) and association between SNPs and stroke were assessed using PLINK. Association was calculated in the allelic, genotypic, dominant and recessive model (Fisher's exact test) and using the Armitage trend statistic. If genotype/allele counts in one cell were <5 association was not calculated. A p value <0.05 was considered significant. Bonferroni correction was used to account for multiple testing. However, since it is controversial whether exploratory studies should apply correction for multiple testing, thereby inflating the type II error and rejecting true associations, we decided to differentiate between significance before and after multiple testing corrections. Logistic regression and linear regression analyses were performed as stepwise backward procedures with $p_{\text{inclusion}} < 0.05$ and $p_{\text{exclusion}} > 0.1$ using SPSS.

Standard Protocol Approvals, Registrations, and Patient Consents

The local ethics committee on human experimentation approved the study. Written informed consent was obtained from all individuals or their guardians.

Results

Patients were significantly older than controls and had more vascular risk factors (table 1). PLA ($p < 0.001$, Mann-Whitney U test; fig. 1a) and platelet activation (CD62P, $p < 0.001$, Mann-Whitney U test; fig. 1b) were significantly higher in the patients than in the control group. Anti-thrombotic treatment in the patient group did not affect PLA ($p = 0.44$, Kruskal-Wallis; fig. 1c) but did affect platelet activation ($p = 0.042$, Kruskal-Wallis; fig. 1d). PLA ($p = 0.011$, Spearman-Rho, $r_s = 0.266$) but not platelet activation ($p = 0.344$, Spearman-Rho) correlated rather weakly

Table 1. Basic characteristics of the study populations

	Controls (n = 151)	Patients (n = 79)	p value
Age (\pm SD)	60 \pm 14	72 \pm 14	<0.01
Female (%)	87 (58)	38 (48)	0.17
Hypertension (%)	64 (42)	63 (80)	<0.01
Diabetes (%)	7 (5)	19 (24)	<0.01
Nicotine (%)	35 (23)	23 (29)	0.01
Hyperlipidemia (%)	44 (29)	35 (44)	0.01
Antiplatelet therapy (%)	11 (7)	34 (43)	<0.01
Anticoagulation (%)	1 (1)	18 (23)	<0.01
Inflammation (%)	11 (7)	29 (37)	<0.01
NIHSS (mean, range)	0	7 (0–24)	<0.01
TOAST 1 (%)	0	12 (15)	
TOAST 2 (%)	0	28 (35)	
TOAST 3 (%)	0	7 (9)	
TOAST 4 (%)	0	6 (9)	
TOAST 5 (%)	0	26 (33)	

with NIHSS at admission. Neither PLA ($p = 0.632$, Kruskal-Wallis) nor platelet activation ($p = 0.693$, Kruskal-Wallis) were significantly different between TOAST categories. Thrombus length in the MCA could be analyzed in 36 patients [13]. However, neither PLA ($p = 0.671$, Spearman-Rho) nor platelet activation ($p = 0.880$, Spearman-Rho) correlated with thrombus length. As expected, thrombus length was significantly correlated with NIHSS at admission ($p < 0.001$, Spearman-Rho). Measures of aggregation between leukocyte subgroups and platelets confirmed the findings for PLA in general but did not reveal anything new (data not shown).

All SNPs genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium. Only SNP rs2228315 in the *PSGL1*-gene showed a significant association with stroke before multiple testing corrections (in all genetic models, p values between 0.0025 (Armitage trend) and 0.0063 (allelic model)). SNP rs2228315 did not survive Bonferroni correction for multiple testing ($p = 0.065$ for rs2228315 (Armitage trend)). SNP rs2228315 also showed a trend for association with PLA ($p = 0.056$, Mann-Whitney U test; fig. 1e) and a significant association with platelet activation before multiple testing correction ($p = 0.025$, Mann-Whitney U test; fig. 1f). Exact genotype distribution and association results between all SNPs investigated in this study and stroke can be found in the online-only data supplement.

Finally, we used regression models to analyze those parameters that significantly contributed to the following three phenotypes: stroke, PLA and platelet activation. Since platelet activation is a biological prerequisite and

cause of PLA, we excluded CD62P from the logistic regression for stroke but included it in the linear regression for PLA. Logistic regression with stroke as the dependent variable and the covariates sex, age, all vascular risk factors (hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, smoking), inflammation, SNP rs2228315 and PLA led to a model in which sex ($p = 0.038$), age ($p = 0.001$), hypertension ($p = 0.009$), diabetes ($p = 0.028$), inflammation ($p < 0.001$), nicotine ($p = 0.017$) and PLA ($p < 0.001$) were correlated with stroke with Nagelkerkes $R^2 = 0.53$. Linear regression with PLA as the dependent variable, the same non-genetic covariates and in addition platelet activation (CD62P) and antithrombotic medication revealed that sex ($p = 0.039$), age ($p = 0.029$), occurrence of stroke ($p = 0.001$) and platelet activation ($p < 0.001$) were determinants of PLA with a corrected $R^2 = 0.36$. Finally, linear regression with platelet activation (CD62P) as dependent variable, SNP rs2228315 and the same factors as used in the regression analysis for PLA left only the occurrence of stroke ($p < 0.001$) as a significant determinant (corrected $R^2 = 0.13$).

Discussion

Findings and conclusions of this study may be subdivided into three parts. First of all, we confirmed that patients with acute ischemic stroke show a significantly elevated percentage of PLA and activated platelets despite antithrombotic treatment. Antithrombotic treatment showed a significant effect on platelet activation but not on PLA in the patient group. Both, platelet activation and PLA did neither correlate well with measures of stroke severity such as NIHSS at admission, nor with surrogate parameters such as MCA thrombus length measured by CT. Infarct size has not been determined in our study because it had already been shown by others that it does not correlate with platelet activation and PLA [1]. We also did not observe any differences in PLA or platelet activation in etiological subgroups (TOAST) of stroke.

Second, the analysis of 26 SNPs in 6 genes determining PLA revealed weak association signals for SNP rs2228315 with ischemic stroke and platelet activation before correction for multiple testing and also revealed a trend for association with PLA. SNP rs2228315 encodes an amino acid change (Methionine 62 Isoleucine) in the *PSGL1* gene and might therefore well be functionally relevant. The association did not survive correction for multiple testing. Nevertheless, the association of rs2228315 with coronary artery disease and stroke has been shown by two studies

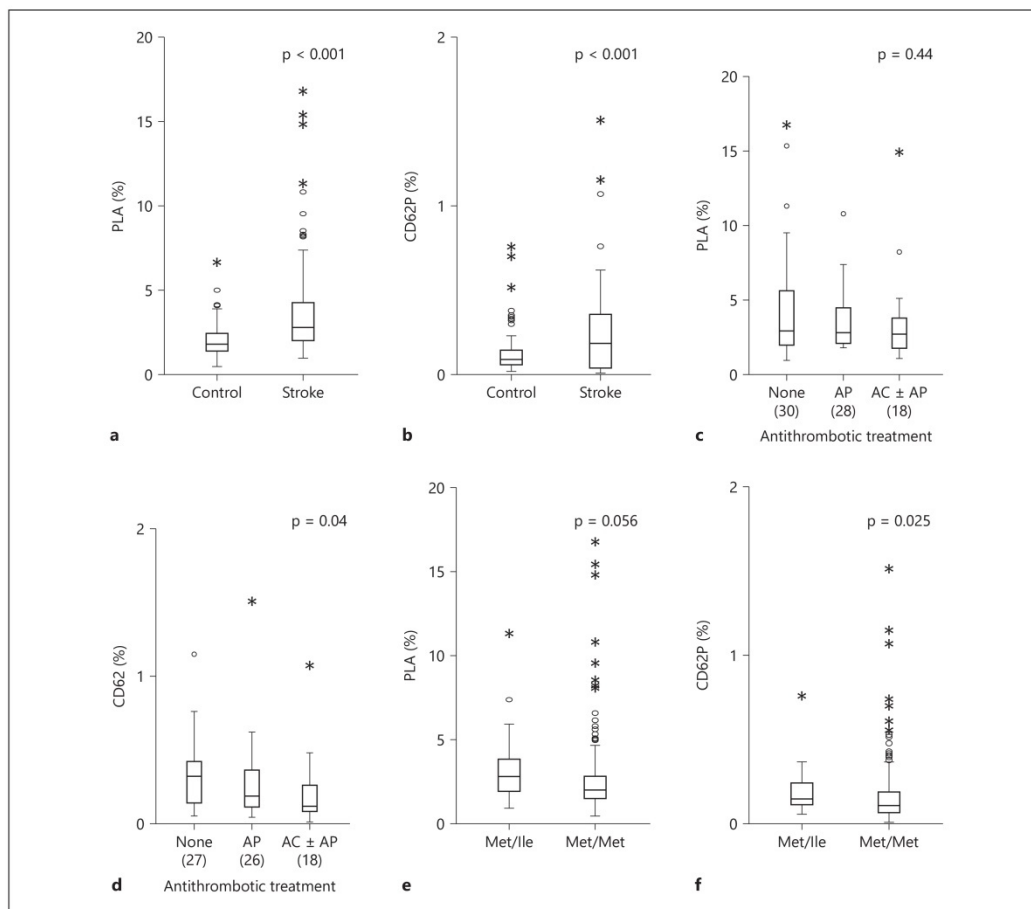


Fig. 1. Graphic summary of the results. **a** Boxplot of PLA in % in controls and stroke patients. **b** Boxplot of activated platelets (CD62P) in % in controls and stroke patients. **c** Boxplot of the effect of antithrombotic treatment on PLA in %. **d** Boxplot of the effect of antithrombotic treatment on platelet activation (CD62P) in %. None = No antithrombotic therapy; AP = antiplatelet drugs;

AC ± AP = anticoagulants with or without additional antiplatelet drugs. **e** Boxplot of PLA in % vs. genotype of rs2228315. **f** Boxplot of platelet activation (CD62P) in % vs. genotype of rs2228315. Only heterozygous (Met/Ile) and homozygous common allele (Met/Met) genotypes are shown because homozygous rare allele genotypes were not present in the sample.

[14, 15]. Third, regression analysis did not show that stroke was correlated with known vascular risk factors but also revealed PLA as independently correlated with stroke. PLA in turn was determined by sex, age, platelet activation and importantly by the occurrence of stroke, while platelet activation correlated significantly only with the occurrence of stroke. These findings argue that PLA

and platelet activation are independent determinants for stroke. They are not explained by conventional vascular risk factors and importantly also not by inflammation. In summary, we confirm the association of PLA and platelet activation with ischemic stroke and show that both parameters are not merely surrogate markers for known vascular risk factors or inflammation. Our findings, that is,

the association with coronary artery disease and stroke in other studies, and the fact that it encodes an amino acid change suggest that rs2228315 is a candidate SNP for stroke and platelet-related phenotypes.

Acknowledgments

We thank all participants for the cooperation extended to us to complete this study.

Disclosure Statement

The authors declare that they do not have competing interests, no financial interests in the study results and no disclosures.

References

- 1 Htun P, Fateh-Moghadam S, Tomandl B, Handschu R, Klinger K, Stellos K, Garlich C, Daniel W, Gawaz M: Course of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in cerebrovascular ischemia. *Stroke* 2006;37:2283–2287.
- 2 Grau AJ, Ruf A, Vogt A, Lichy C, Bugge F, Patscheke H, Hacke W: Increased fraction of circulating activated platelets in acute and previous cerebrovascular ischemia. *Thromb Haemost* 1998;80:298–301.
- 3 Marquardt L, Ruf A, Mansmann U, Winter R, Schuler M, Bugge F, Mayer H, Grau AJ: Course of platelet activation markers after ischemic stroke. *Stroke* 2002;33:2570–2574.
- 4 McCabe DJ, Harrison P, Mackie IJ, Sidhu PS, Purdy G, Lawrie AS, Watt H, Brown MM, Machin SJ: Platelet degranulation and monocyte-platelet complex formation are increased in the acute and convalescent phases after ischaemic stroke or transient ischaemic attack. *Br J Haematol* 2004;125:777–787.
- 5 Garlich CD, Kozina S, Fateh-Moghadam S, Handschu R, Tomandl B, Stumpf C, Eskafi S, Raaz D, Schmeisser A, Yilmaz A, Ludwig J, Neundorfer B, Daniel WG: Upregulation of CD40-CD40 ligand (CD154) in patients with acute cerebral ischemia. *Stroke* 2003;34:1412–1418.
- 6 Shoji T, Koyama H, Fukumoto S, Maeno T, Yokoyama H, Shinohara K, Emoto M, Shoji T, Yamane T, Hino M, Shioi A, Nishizawa Y: Platelet activation is associated with hypoadiponectinemia and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2006;188:190–195.
- 7 Koyama H, Maeno T, Fukumoto S, Shoji T, Yamane T, Yokoyama H, Emoto M, Shoji T, Tahara H, Inaba M, Hino M, Shioi A, Miki T, Nishizawa Y: Platelet P-selectin expression is associated with atherosclerotic wall thickness in carotid artery in humans. *Circulation* 2003;108:524–529.
- 8 Davi G, Romano M, Mezzetti A, Procopio A, Iacobelli S, Antidormi T, Bucciarelli T, Alessandrini P, Cuccurullo F, Bittolo Bon G: Increased levels of soluble P-selectin in hypercholesterolemic patients. *Circulation* 1998;97:953–957.
- 9 Glass CK, Witztum JL: Atherosclerosis. The road ahead. *Cell* 2001;104:503–516.
- 10 Huo Y, Xia L: P-selectin glycoprotein ligand-1 plays a crucial role in the selective recruitment of leukocytes into the atherosclerotic arterial wall. *Trends Cardiovasc Med* 2009;19:140–145.
- 11 Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R: A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost* 2001;86:214–221.
- 12 Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K: Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev* 2007;21:99–111.
- 13 Riedel CH, Jensen U, Rohr A, Tietke M, Alfke K, Ulmer S, Jansen O: Assessment of thrombus in acute middle cerebral artery occlusion using thin-slice nonenhanced computed tomography reconstructions. *Stroke* 2010;41:1659–1664.
- 14 Volcik K, Ballantyne CM, Pownall HJ, Sharrett AR, Boerwinkle E: Interaction effects of high-density lipoprotein metabolism gene variation and alcohol consumption on coronary heart disease risk: the atherosclerosis risk in communities study. *J Stud Alcohol Drugs* 2007;68:485–492.
- 15 Bugert P, Vosberg M, Entelmann M, Jahn J, Katus HA, Kluter H: Polymorphisms in the P-selectin (CD62P) and P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) genes and coronary heart disease. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:997–1004.

Sources of Funding

This study was sponsored by a grant from the ‘Intramurale Forschungsförderung’ of the University of Kiel to G.K. G.K. and G.D. are members of the ‘Cluster of Excellence’ ‘Inflammation at Interfaces’.

Contributorship Statement

Barbara Schmalbach: design of the study, analysis and interpretation of the data, drafting of manuscript; Olga Stepanow: design of the study, analysis of the data; Arne Jochens: analysis and interpretation of the data, revising of the manuscript; Christian Riedel: analysis of the data, revising of the manuscript; Günther Deuschl: conceptualization of the study, revising of the manuscript; Gregor Kuhlenbäumer: design and conceptualization of the study, analysis and interpretation of the data, drafting of manuscript.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Gregor Kuhlenbäumer für die Unterstützung und Ermöglichung dieser Arbeit bedanken.

Außerdem geht ein besonderer Dank an Dr. med. Barbara Schmalbach für ihre Geduld, Zeit und großartige Hilfe bei der Erstellung der Dissertation. Weiterhin möchte ich Herrn Dipl.-Math. Arne Jochens für die Auswertung der statistischen Analysen und die prompte Beantwortung meiner Rückfragen danken.

Ein großes Dankeschön geht schließlich an meine Eltern, die mir das Studium erst ermöglicht haben, sowie meinen Freund Matthias Gegenwart für die Unterstützung und den moralischen Beistand.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Olga
Nachname: Stepanow
Geburtsdatum und-ort: 24.03.1987 in Wiktorowka/ Kasachstan
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

1993 – 1996 Grundschohle in Kasachstan
1996 – 2000 Grundschohle und Orientierungsstufe in Bremen
2000 – 2007 Gymnasium Obervieland, Bremen
Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

2007 – 2013 Studium der Humanmedizin an der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,
Abschluss: Staatsexamen

Famulaturen

August 2010 Herzchirurgie am Universitätsklinikum Kiel
September 2010 Anästhesie, operative Intensivmedizin und spezielle
Schmerztherapie, Klinikum Bremen Mitte
März 2011 Kardiologisch-Angiologische Praxis am Klinikum Links
der Weser, Bremen

August 2011

Neurochirurgie am Universitätsklinikum Kiel

September 2011

Gynäkologie am St. Joseph-Stift, Bremen

Promotionsstudium

2010-2015

„Klinische Relevanz von Biomarkern der Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung beim akuten ischämischen Schlaganfall“ unter der Betreuung von Prof. Dr. Dr. Gregor Kuhlenbäumer, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Ärztliche Tätigkeiten

Seit Februar 2014

Ärztin in Weiterbildung für Gynäkologie und Geburtshilfe im Krankenhaus St. Joseph-Stift, Bremen