

**Untersuchung thrombozytärer, plasmatischer und
endothelialer Aktivierungsmarker bei Patienten mit
Typ-I Diabetes mellitus**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Lorenz Weisner

aus Recklinghausen

Giessen 2000

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Abteilung Hämatologie und internistische Onkologie
Leiter: Prof. Dr. Pralle
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachterin: Prof. Dr. Kemkes-Matthes
Gutachter: Prof. Dr. Preissner

Tag der Disputation: 27. August 2001

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	3
2.1. Patienten	3
2.2. Gruppeneinteilung	3
2.3. Versuchsaufbau	3
2.3.1. Blutentnahme	3
2.3.2. Probenaufbereitung	4
2.4. Meßparameter	4
2.4.1. Biometrische Daten	4
2.4.2. Laborchemische Parameter	4
2.4.3. Parameter der plasmatischen Gerinnung	5
2.4.3.1. Thromboplastinzeit nach Quick	5
2.4.3.2. Thrombinzeit	5
2.4.3.3. Partielle Thromboplastinzeit	6
2.4.3.4. Antithrombin	6
2.4.3.5. Fibrinogen	6
2.4.3.6. Gesamt-Protein S und Freies Protein S	7
2.4.3.7. Thrombomodulin	7
2.4.3.8. Prothrombinfragment F 1+2	7
2.5. Thrombozyten	8
2.5.1. Plättchenfaktor 4	8
2.5.2. Durchflußzytometrie	8
2.5.2.1. Herstellung der Meßprobe	8
2.5.2.2. Reagenzien der Fixierungs- Waschlösung	8
2.5.2.3. Monoklonale Antikörper	9
2.5.2.4. Meßprinzip	9
2.5.2.5. Durchführung der Messung	10
2.6. Statistik	10

3. ERGEBNISSE	11
3.1. Thrombozyten	11
3.1.1. <i>GMP-140</i>	11
3.1.2. <i>GP1b</i>	13
3.1.3. <i>Plättchenfaktor 4</i>	15
3.2. Thrombomodulin	17
3.3. Plasmatische Gerinnung	19
3.3.1. <i>Fibrinogen</i>	19
3.3.2. <i>Antithrombin</i>	21
3.3.3. <i>Prothrombinfragment F 1+2</i>	23
3.3.4. <i>Protein S</i>	25
3.3.4.1. <i>Gesamt-Protein S</i>	25
3.3.4.2. <i>Freies Protein S</i>	27
3.4. Blutzucker	29
3.5. HbA1c	31
4. DISKUSSION	33
4.1. Thrombozytenaktivierung und Diabetes mellitus: Bedeutung von GMP-140, GP1b und Plättchenfaktor 4	33
4.2. Thrombozytenaktivierung Bedeutung der Durchflußzytometrie	38
4.3. Endotheliale Faktoren und Diabetes mellitus: Bedeutung von Thrombomodulin	39
4.4. Plasmatische Faktoren und Diabetes mellitus: Bedeutung von Fibrinogen, Antithrombin, Protein S und Prothrombinfragment F 1+2	41
4.5. Schlußfolgerung	44
5. ZUSAMMENFASSUNG	46
6. LITERATURVERZEICHNIS	47

7. TABELLEN		61
7.1.	Alter	61
7.2.	Krankheitsdauer	61
7.3.	Daten der Thrombozytenaktivierung	62
7.4.	Thrombomodulin	62
7.5.	Parameter der plasmatischen Gerinnung	63
7.5.1.	<i>Gerinnungsuntersuchungen</i>	63
7.5.2.	<i>Fibrinogen</i>	63
7.5.3.	<i>Antithrombin</i>	64
7.5.4.	<i>Protein S</i>	64
7.5.5.	<i>Prothrombinfragment F 1+2</i>	65
7.6.	Laborchemische Parameter	65
7.6.1.	<i>Blutzucker</i>	65
7.6.2.	<i>HbA1c</i>	66
7.6.3.	<i>Thrombozyten</i>	66
8. ANHANG		67
8.1.	Abkürzungsverzeichnis	67
8.2.	Danksagung	69
8.3.	Lebenslauf	70

1. EINLEITUNG

Apud me in eis, quae dulcia sunt, non est malum.

(Meiner Meinung nach kann nichts Süßes von Übel sein.)

Avicenna (980 - 1037 n. Chr.) kam zu dieser irrigen Meinung, da zu seiner Zeit zwar der Diabetes, aber noch nicht seine möglichen Spätschäden bekannt waren.

Unter dem Begriff „Diabetes mellitus“ werden Stoffwechselveränderungen unterschiedlicher Ursache subsumiert. Sie sind durch eine dauerhafte Erhöhung des Blutzuckerspiegels bzw. durch das Unvermögen des Organismus charakterisiert, zugeführte Kohlenhydrate zeitgerecht zu verwerten. Ursache hierfür ist ein relativer oder absoluter Insulinmangel. Der primäre Diabetes läßt sich in zwei Formen unterteilen, wobei man unter dem Begriff des Typ I Diabetes mellitus die insulinabhängige Krankheitsform zusammenfaßt, während die nichtinsulinabhängige Form als Typ II Diabetes mellitus bezeichnet wird (20). Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, bei den Gefäßkomplikationen die unspezifischen Veränderungen an den großen Arterien auf dem Boden der Atherosklerose als Makroangiopathie den diabetesspezifischen Veränderungen der terminalen Strombahn (Arteriolen, Kapillaren, Venolen) im Sinne der Mikroangiopathie gegenüberzustellen. An den kleinen Gefäßen stellen die Veränderungen an Retina und Glomerulum die klinisch Wichtigsten dar (7).

Mitte des 19. Jahrhunderts stellte Virchow als erster Zusammenhänge zwischen der Blutgerinnung und der nach ihm benannten Trias Blutströmung, Gefäßinhalt und Gefäßwand dar (141). Mit der Entdeckung der Blutplättchen durch Bizzozero im Jahr 1881 (14) wurde ein weiterer Schritt in Richtung Aufklärung der Vorgänge bei der Blutgerinnung gemacht. Durch die Entdeckung verschiedener pro- und antikoagulatorischer Faktoren in diesem Jahrhundert wurden diese Erkenntnisse entscheidend vorangetrieben.

Als Ursache für die Entstehung von Gefäßalterationen beim Diabetes mellitus werden vielfältige Veränderungen der Blutgerinnung, Fibrinolyse, Endothel- und Thrombozytenfunktion diskutiert. Die Summe dieser Veränderungen kann dann zur Hyperkoagulabilität beitragen (50,60,82,137,144).

Thrombozyten sind unter physiologischen Bedingungen für die Steuerung der verschiedenen Komponenten des Gerinnungssystems zu einer bedarfsgerechten Hämostase mitverantwortlich. Der Nachweis gesteigerter Thrombozytenaktivierung bei Diabetikern

wurde durch einige Studien erbracht (57,110,132). Als Antwort auf endotheliale Läsionen kommt es durch die Aktivierung zur Freisetzung mitogener, oxidativer und vasokonstriktorischer Substanzen, die in der Lage sind, vorbestehende atherosklerotische Läsionen zu verstärken. (120,124,126). Desweiteren kommt es zu sterischen Veränderungen der Thrombozytenmembran, in deren Folge Adhäsion und Aggregation von Plättchen begünstigt werden; durch Freisetzung von Granulainhaltsstoffen kommt es zu Interaktionen mit der Gefäßwand (11,48,63,94).

Der bei Patienten mit Diabetes mellitus nachgewiesenen Endotheldysfunktion wird eine Schlüsselrolle bei gefäßassoziierten Komplikationen zugeschrieben (39,47,139). Beim gesunden Menschen setzt das Endothel Substanzen wie Prostaglandine, Peptide und die sogenannten endothelium-derived factors frei, moduliert dadurch den Tonus der glatten Muskulatur und schützt vor Thrombozytenaggregation und Thrombose im Gefäßlumen (36). Es gibt Hinweise, daß Thrombomodulin im Plasma als Nachweis für Endothelveränderungen dienen kann (16).

Veränderungen des Hämostasesystems sollen zumindest teilweise mitverantwortlich für die Entstehung von Makro- und Mikroangiopathie beim Diabetes-Patienten sein (3,64). Die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems findet ihren Ausdruck in einem erhöhten Plasmaanteil thrombotischer Präkursoren und einer erhöhten in vivo Thrombingenerierung, wohingegen Inhibitoren der Blutgerinnung reduziert sind (8,27,29,31,32). Fibrinogen wird im Zusammenhang mit Gefäßerkrankungen und Diabetes mellitus als erhöht beschrieben, darf aber wegen seiner Eigenschaft als akute-Phase-Protein nicht allein als Indikator für einen hyperkoagulatorischen Zustand angesehen werden (110). Die Konversion von Prothrombin zu Thrombin erfolgt unter Abspaltung des Prothrombinfragments F1+2, wobei eine Erhöhung dieses Spaltprodukts als Nachweis einer vermehrten Thrombingenerierung angesehen werden kann (30). Antithrombin und Protein S haben als Gerinnungsinhibitoren klar definierte Aufgaben: AT komplexiert mit aktivierten Gerinnungsfaktoren und verhindert durch Bildung eines Thrombin-Antithrombin-Komplexes eine überschießende Thrombinwirkung (91), während das Vitamin K-abhängige Protein S als Cofaktor für die antikoagulatorische Wirkung von aktiviertem Protein C mitverantwortlich ist (31).

Da bis heute die Betrachtung von Veränderungen der Blutgerinnung, Fibrinolyse, Endothel- und Thrombozytenfunktion beim Diabetes mellitus in Bezug auf die Krankheitsdauer lediglich ein Teilaspekt durchgeführter Studien ist, wurde die vorliegende Studie konzipiert, um den Einfluß der Diabetesdauer auf die genannten Faktoren zu untersuchen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. PATIENTEN

Nach einem Informationsgespräch über Hintergrund und Ziel der Studie sowie Erklärung ihres Einverständnisses wurde bei 31 Patienten mit insulinpflichtigem Diabetes mellitus (Typ I Diabetes mellitus oder IDDM) Blut abgenommen und untersucht. Der Zeitpunkt der Diagnosestellung wurde als Beginn der Krankheit definiert; vom Krankheitsbeginn an wurden die Patienten mit Insulin therapiert.

Die Patienten wurden aus der Diabetes-Ambulanz der 3. Medizinischen Klinik der J-L-U, Gießen rekrutiert.

2.2. GRUPPENEINTEILUNG

Die Patienten wurden entsprechend ihrer Krankheitsdauer in folgende Gruppen unterteilt:

Gruppe 1:

Patienten mit Typ I Diabetes mellitus-Krankheitsdauer < 10 Jahre (n = 11)

Gruppe 2:

Patienten mit Typ I Diabetes mellitus-Krankheitsdauer 10 - 20 Jahre (n = 9)

Gruppe 3:

Patienten mit Typ I Diabetes mellitus-Krankheitsdauer > 20 Jahre (n = 11)

2.3. VERSUCHSAUFBAU

2.3.1. BLUTENTNAHME

Die Patienten erschienen zur Untersuchung nüchtern und hatten je nach Insulintherapie lediglich ihre individuelle Dosis eines Basalinsulins gespritzt. Zur Blutentnahme wurde den Patienten am Oberarm eine Blutdruckmanschette angelegt und diese zum Aufsuchen einer geeigneten Vene auf 50 - 60 mmHg aufgepumpt; daraufhin wurde der Manschettendruck abgelassen und die Venenpunktion vorbereitet. Zur Punktion wurde ein Manschettendruck von 25-30 mmHg angelegt. Mit einem 19 G - Butterfly wurden 2 ml Blut vorgezogen und

verworfen, um anschließend Blut in 2 Diatube H Röhrchen (Diagnostica Stago, Asniere-sur-Seine, Frankreich) abtropfen zu lassen. Erst jetzt wurden 3 Gerinnungsröhrchen und 1 Serumröhrchen gefüllt.

2.3.2. PROBENAUFBEREITUNG

Der Inhalt eines Diatube H Röhrchens wurde bei 3000 U/min und + 4° Celsius 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand aus dem mittleren Drittel wurde in Eppendorf - Hütchen abpipettiert (2x250µl), auf Eis gelagert und dann bei -20° Celsius eingefroren. Der Inhalt des zweiten Diatube H Röhrchens wurde zur Messung der Thrombozytenaktivierung, wie unter 2.5.1. beschrieben, vorbereitet.

Die gewonnenen Proben eines Natriumcitratröhrchens wurden direkt auf die unten genannten Gerinnungsparameter untersucht.

Zwei weitere Natriumcitratröhrchen wurden bei Raumtemperatur und 1000 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, auf 10 Eppendorf - Hütchen verteilt und bei -20° Celsius eingefroren.

Das Serumröhrchen wurde ebenfalls bei Raumtemperatur und 1000 G für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, auf 4 Eppendorf - Hütchen verteilt und bei -20° Celsius eingefroren.

2.4. MESSPARAMETER

2.4.1. BIOMETRISCHE DATEN

Alter [Jahre]

2.4.2. LABORCHEMISCHE PARAMETER

Thrombozyten [Tsd./mcl]

Bestimmung: nach dem Widerstandsmeßprinzip mit hydrodynamischer Fokussierung.

Mit SE-9000 der Fa. Sysmex GmbH, Hamburg, BRD

Blutzucker [mg/dl]

Messung: mit Gluco-quant® Glucose/HK der Fa. Boehringer, Mannheim, BRD

Hb A 1c [% d. Ges.Hb]

Messung: mit BIO-RAD Hämoglobin A 1c-Mikro-Säulentest der Fa. BIO-RAD, Hercules, USA

2.4.3. PARAMETER DER PLASMATISCHEN GERINNUNG

2.4.3.1. THROMBOPLASTINZEIT NACH QUICK

Zur Bestimmung der Thromboplastinzeit wurde Thromborel S® der Firma Behring Diagnostics GmbH, Marburg, BRD verwendet. Das Reagenz enthält aus humanen Plazenten gewonnenes calciumhaltiges Thromboplastin, welches entsprechend der Werksangaben verwendet wurde.

Die Zeitmessung erfolgte mit Behring Coagulation System, Behringwerke AG, Marburg, BRD, wobei unter Verwendung von vier Kalibrierplasmen eine Bezugskurve erstellt, und die gefundenen Gerinnungszeiten den Werten in Prozent der Norm zugeordnet wurden.

Referenzbereich: 70 - 130 % d. N.

2.4.3.2. THROMBINZEIT

Die Thrombinzeitbestimmung wurde mit dem im Handel erhältlichen BC - Thrombin - Reagenz der Firma Behring Diagnostics GmbH, Marburg, BRD durchgeführt. Das Reagenz besteht aus lyophilisiertem Rinderthrombin und -albumin und wurde gemäß der Firmenangaben verwendet.

Mit einem Behring Coagulation System, Behringwerke AG, Marburg, BRD erfolgte die Zeitmessung.

Referenzbereich: < 21 Sekunden

2.4.3.3. PARTIELLE THROMBOPLASTINZEIT

Mit dem Reagenz Pathromtin® SL der Behringwerke AG, Marburg, BRD wurde die Partielle Thromboplastinzeit bestimmt. Das Reagenz enthält Siliziumpartikel, pflanzliche Phospholipide und Natriumchlorid bei einem pH-Wert von 7,6 und wurde entsprechend der Firmenvorgaben angewendet.

Für die Zeitmessung wurde das Behring Coagulation System, Behringwerke AG, Marburg, BRD verwendet.

Referenzbereich: 26 - 36 Sekunden

2.4.3.4. ANTITHROMBIN

Das Reagenz Berichrom® Antithrombin III (A) der Behringwerke AG, Marburg, BRD wurde zur Bestimmung von Antithrombin verwendet. Es enthält lyophilisiertes Rinderthrombin mit einem Zusatz von Heparin und Aprotinin und wurde gemäß der Firmenangaben verwendet.

Die Bestimmung wurde mit einem Behring Coagulation System der Behringwerke AG, Marburg, BRD durchgeführt, wobei durch Kalibrierung mit Standard - Human - Plasma eine Bezugskurve erstellt wurde.

Referenzbereich: 75 - 125 % d. N.

2.4.3.5. FIBRINOGEN

Die quantitative Bestimmung von Fibrinogen mit einer modifizierten Methode nach Clauss wurde mit dem Reagenz Multifibren® U der Behringwerke AG, Marburg, BRD durchgeführt, welches Thrombin und Albumin vom Rind enthält. Die Ergebnisse wurden mit dem Behring Coagulation System ermittelt und über eine Wertetabelle bzw. Bezugskurve ausgewertet.

Referenzbereich: 1,8 - 3,5 g/l

2.4.3.6. GESAMT-PROTEIN S UND FREIES PROTEIN S

Beide Protein S - Werte wurden mittels Elektroimmundiffusion nach Laurell mit dem EID Protein S-Test und dem Thrombo-Calibrator-Plasma der Firma Boehringer Mannheim, Diagnostica Stago, Mannheim, BRD quantitativ bestimmt. Als Agarosegelplatten wurden zwei mit Kaninchen - Antiprotein S vorbeschichtete Platten verwendet. Die Auswertung erfolgte über eine Bezugskurve aus Verdünnungen eines Normalplasmapools.

Referenzbereich: Gesamt - Protein S: 70 - 140 % d. N
 Freies Protein S: 30 - 45 % PS ges.

2.4.3.7. THROMBOMODULIN

Die Bestimmung von Thrombomodulin erfolgte mit Hilfe eines Enzym – Immunassays, dem Test Asserachrom Thrombomodulin® von Diagnostica Stago, Asniere-sur-Seine, Frankreich, der zwei spezifische monoklonale Mausantikörper enthält. Nach der Zugabe von Sulphursäure wurde die Extinktion bei 492 nm photometrisch gemessen. Die Auswertung wurde doppellogarithmisch unter Berücksichtigung der Thrombomodulin - Kalibrator - Konzentrationen durchgeführt.

2.4.3.8. PROTHROMBINFRAGMENT F 1+2

Prothrombinfragment F 1+2 wurde mit Enzygnost® F 1+2 micro der Behringwerke AG, Marburg, BRD durch einen Enzym-Immunassay nach der Sandwich-Methode quantitativ bestimmt. Die Mikrotitrationsplatten sind mit Kaninchen - Antikörpern gegen Human - F 1+2 beschichtet. Nach der Testdurchführung entsprechend der Firmenangaben wurde die Extinktion bei 492 nm gemessen und nach Berechnung der Extinktionsmittelwerte der Standards die Bezugskurve auf doppelt logarithmischem Netzpapier erstellt.

Referenzbereich: 0,4 - 1,1 nmol/l

2.5. THROMBOZYTEN

2.5.1. PLÄTTCHENFAKTOR 4

Plättchenfaktor 4 wurde mit Asserachrom® PF 4 der Firma Diagnostica Stago, Boehringer Mannheim, Mannheim, BRD — einem Enzym - Immunoassay nach der Sandwich - Methode — quantitativ bestimmt. Nach der Testdurchführung entsprechend der Firmenangaben wurde die Extinktion bei 492 nm gemessen und auf doppelt logarithmischem Papier gegen PF 4 in IU/ml aufgetragen.

Referenzbereich: 0 - 5 IU/ml

2.5.2. DURCHFLUSSZYTOMETRIE

2.5.2.1. HERSTELLUNG DER MEßPROBE

Unmittelbar nach der Blutgewinnung wurde Vollblut im Verhältnis 1:20 mit 1% Para-Formaldehyd in PBS/EDTA-Puffer fixiert und der Inhalt auf zwei Aliquots aufgeteilt. Nach 20-minütiger Fixation bei Raumtemperatur wurden die Proben drei Mal mit PBS/EDTA-Puffer gewaschen. Die gewaschenen Proben wurden mit 20 µl Fluoreszin-Isothiozyanat (FITC)-Antikörper gegen GP1b (CD 42b) und 20 µl Phycoerythrin (PE)-Antikörper gegen GMP-140 (CD 62) gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben ein Mal gewaschen, zur Messung mit 500 µl PBS/EDTA-Puffer vorbereitet und mit einem FACScan® (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) innerhalb von 24 Stunden analysiert. Die tägliche Kalibrierung des Gerätes wurde mit Mikrosphären von bekannter Größe und Fluoreszenz (CaliBrite Beads, Becton Dickinson Immunocytometry Systems) durchgeführt.

2.5.2.2. REAGENZIEN DER FIXIERUNGS- UND WASCHLÖSUNG

PBS-Puffer (phosphate-buffered-saline), pH 7,4:

140 mmol NaCl
9,2 mmol Na₂HPO₄ x 7 H₂O

1,3 mmol NaH₂PO₄ x H₂O

5 mmol EDTA x 2 H₂O

1% Para-Formaldehyd in PBS-Puffer/EDTA

2.5.2.3. MONOKLONALE ANTIKÖRPER

Monoklonale, Fluorochrom-konjugierte Antikörper gegen CD62p (GMP-140, PADGEM, P-Selektin), Phycoerythrin (PE)-markiert, Klon AC1.2, Isotyp IgG1 (Maus), Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, California, USA.

Monoklonale, Fluorochrom-konjugierte Antikörper gegen CD42b (GP1b α), Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)-markiert, Klon SZ2, Isotyp IgG1 (Maus), Immunotech, Marseille, Frankreich.

Monoklonale, Fluorochrom-konjugierte Iso-Antikörper, PE-markiert, Klon X40, Isotyp IgG1 (Maus), Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, California, USA.

2.5.2.4. MESSPRINZIP

Die Durchfluß- oder Flow Zytometrie kann verschiedene Zelltypen anhand von Lichtstreuungscharakteristika voneinander unterscheiden. Hierzu werden die Zellen in einer Suspension mit fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern markiert. Im Zytometer passieren die in Lösung gehaltenen Zellen eine Perfusionskammer, um mit maximal 1000 Zellen pro Sekunde einen fokussierten Laserstrahl zu durchlaufen. Bei entsprechender Wellenlänge ermittelt ein Detektor die nach Aktivierung emittierte Fluoreszenz und die lichtstreuenden (light scatter) Eigenschaften der Zellen.

Die flowzytometrische Analyse von Vollblut bestimmt den Aktivierungszustand von Thrombozyten, der durch die Bindung von aktivierungsabhängigen monoklonalen Antikörpern beurteilt wird. Sie ist eine physiologische Untersuchung der Thrombozytenfunktion, bei der ein Agonist eine spezifisch-funktionelle Antwort der Thrombozyten hervorruft, welche beispielsweise in einer Änderung der oberflächenassoziierten physiologischen Rezeptoren resultiert und durch eine Veränderung des gebundenen monoklonalen Antikörpers gemessen wird (84).

2.5.2.5. DURCHFÜHRUNG DER MESSUNG

Die vorbereiteten Proben wurden mit einem FACScan Flow Zytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, BRD) analysiert. Das Gerät war mit einem 5 W Argon-Ionen-Laser ausgestattet und arbeitete mit 200 mW bei einer Wellenlänge von 480 nm. Die FITC-Fluoreszenz wurde mit einem 530/30 Breitbandfilter bestimmt. Das Gerät wurde so konfiguriert, daß es nur Partikel, die mit Anti-GP1b (FITC-Fluoreszenz) gefärbt waren, erkannte und alle anderen Partikel von der Analyse ausschloß. Desweiteren wurden Thrombozyten durch FS/SSC (forward angle light scatter/side angle light scatter) oder durch FS/FITC-Fluoreszenz detektiert. 5000 Partikel wurden mit einem bivariaten Histogramm analysiert, welche die FITC-Fluoreszenz gegen die PE-Fluoreszenz logarithmisch zeigte. Die mittlere Oberflächenfluoreszenz von Anti-GMP-140 bezieht sich auf die mittlere Fluoreszenz von CD 62p-markierten Thrombozyten, die durch eine Isotyp-Kontrolle normiert wurden. Von gesunden Probanden wurde Blut gesammelt und eine PE-Fluoreszenz-Schwelle definiert, über der weniger als 5% der Probenpartikel lagen, was der 95. Perzentile der PE-Fluoreszenz der Normalkontrolle entspricht. Der Prozentsatz von aktivierten Thrombozyten bezieht sich auf das Partikelverhältnis der PE-Fluoreszenz über dieser Schwelle. Die Daten wurden mit der Software FACScan Menu 2.3.2 ausgewertet.

2.6. STATISTIK

Die Auswertung der Daten erfolgte im Institut für Medizinische Informatik (Leiter Prof.Dr. Dudeck) der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Beratung von Herrn Pabst und Herrn PD Dr. Bödecker.

Für alle Parameter wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Zur statistischen Auswertung der Gruppenunterschiede wurde der Kruskal-Wallis 1-Way Anova Test durchgeführt. Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern wurden anhand des Spearman Korrelationskoeffizienten ausgewertet. Der Vergleich der bestimmten Parameter mit Standardlaborwerten erfolgte durch Anwendung des Student T-Tests. Die Nullhypothese gilt dabei als abgelehnt, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) bezüglich des Fehlers erster Art kleiner als 0,05 ist. Somit sind Werte von $p < 0,05$ als signifikant zu erachten.

3. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der untersuchten Parameter sind nochmal tabellarisch in Kapitel 7 aufgeführt.

3.1. THROMBOZYTEN

3.1.1. GMP-140

Die GMP-140-Expression war in Gruppe 1 am höchsten, wobei es zwischen den drei Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede gab (vgl. Abb.1).

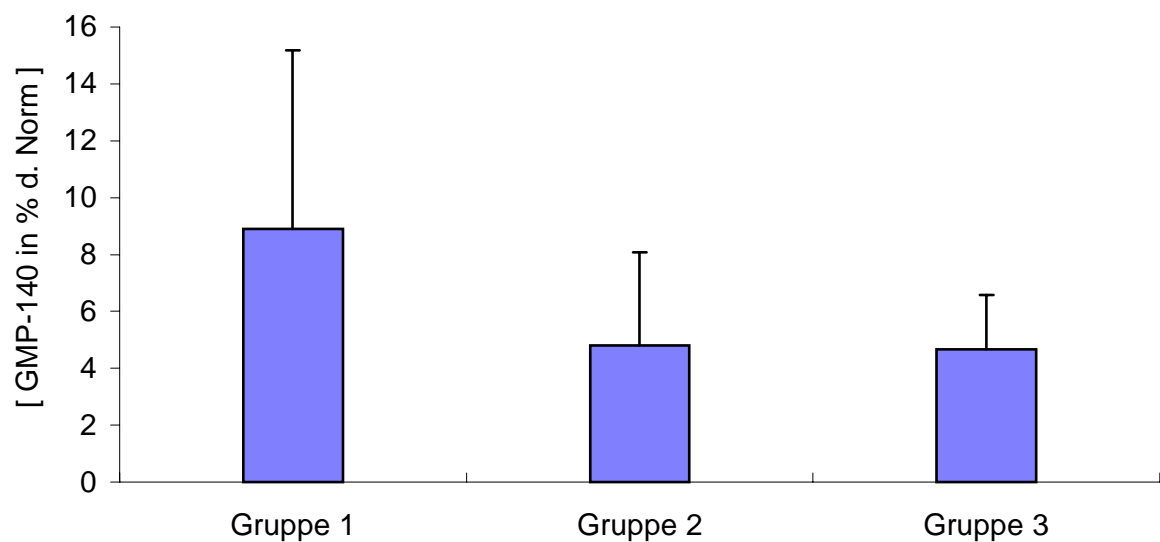


Abb.1: GMP-140-Expression bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus

Mittelwert + Standardabweichung

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10-20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

Normalbereich: $5,0 \pm 1,1\%$ d. Norm

Auch die Betrachtung der GMP-140-Expression in Bezug auf die Krankheitsdauer in Jahren zeigte keine statistische Signifikanz (vgl. Abb.2).

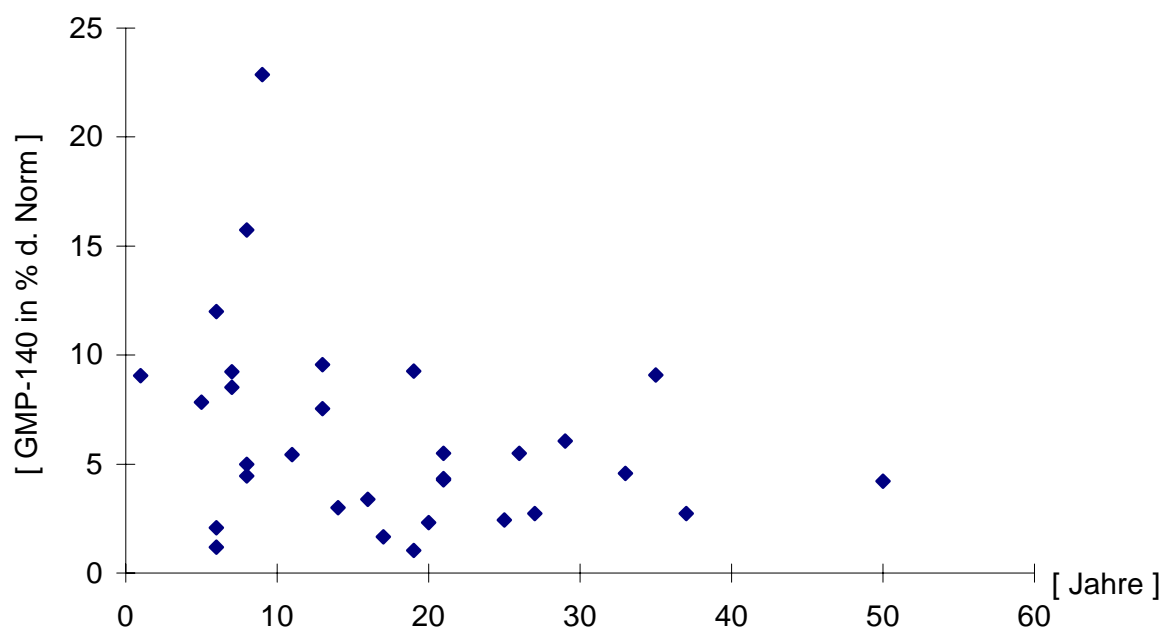


Abb.2: GMP-140-Expression bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus in Abhängigkeit zur Krankheitsdauer in Jahren (n = 31)

Normalbereich: $5,0 \pm 1,1$ % d. Norm

3.1.2. GP1b

Bezüglich der GP1b-Expression zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (vgl. Abb.3).

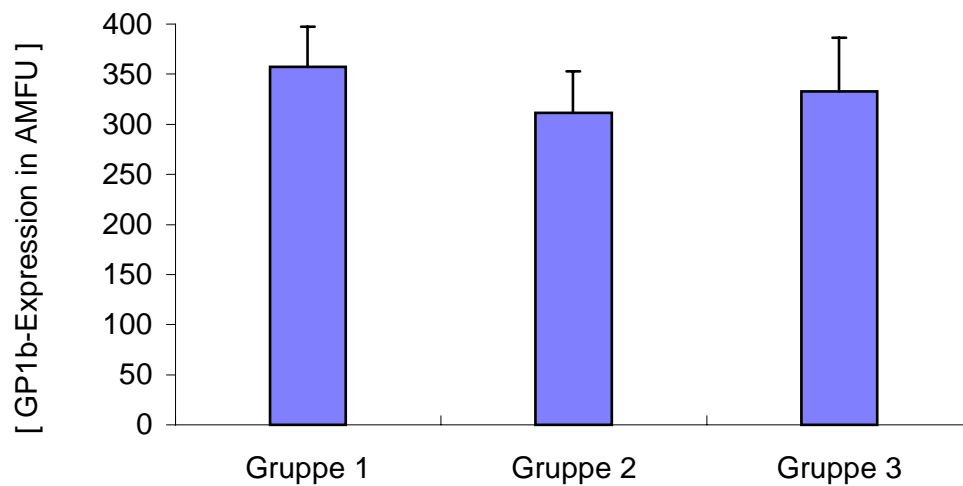


Abb.3: GP1b-Expression bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10-20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

Die Beziehung zur Krankheitsdauer in Jahren erbrachte keine statistisch signifikanten Ergebnisse (vgl. Abb.4).

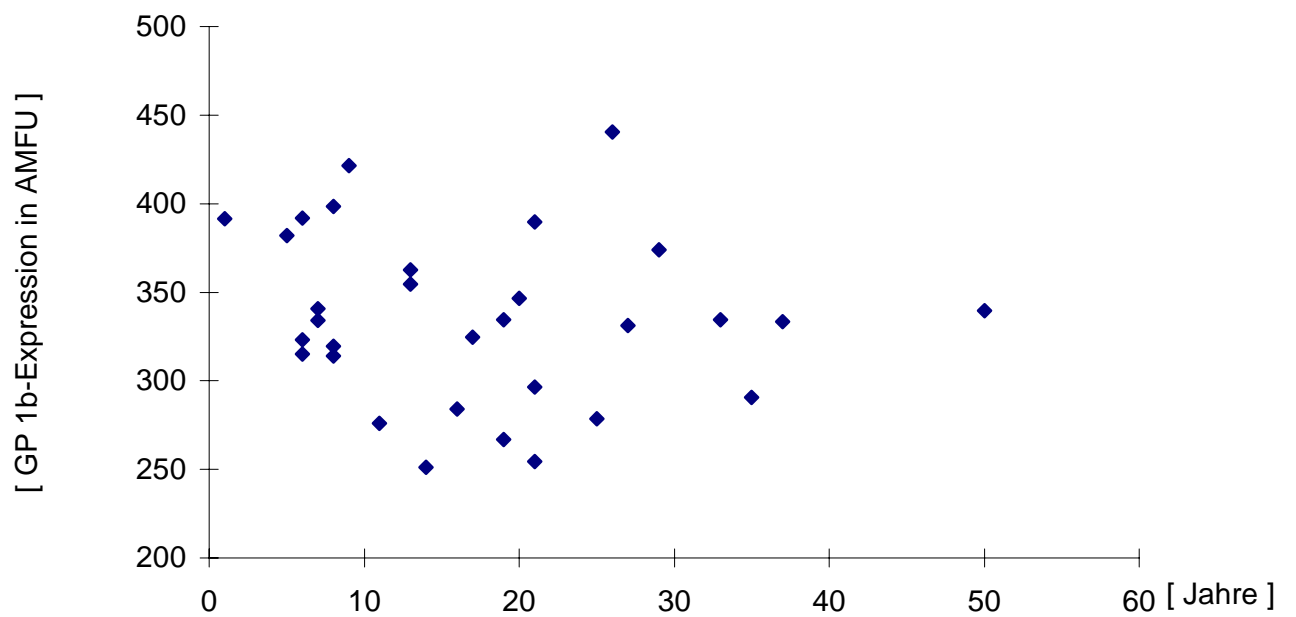


Abb.4: GP1b-Expression bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus in Abhängigkeit zur Krankheitsdauer in Jahren (n = 31)

3.1.3. PLÄTTCHENFAKTOR 4

Die Ergebnisse für PF 4 zeigten keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede (vgl. Abb.5).

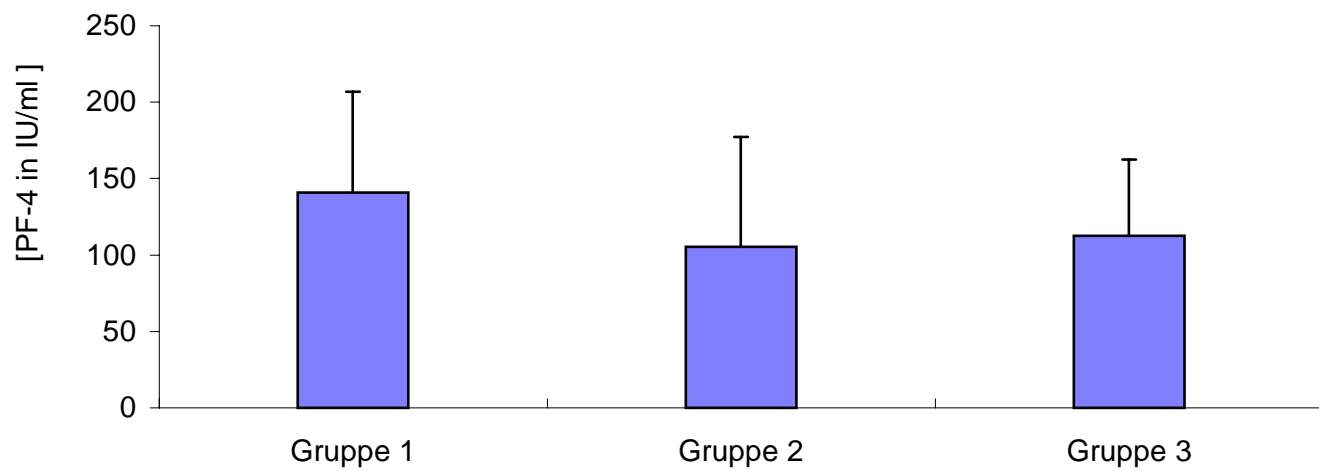


Abb.5: PF-4-Werte bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus

Mittelwert + Standardabweichung

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10-20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

Normalbereich: 0-5 IU/ml

Die Plättchenfaktor-4-Werte zeigen im Bezug zur Krankheitsdauer in Jahren keine statistische Signifikanz (vgl. Abb.6).

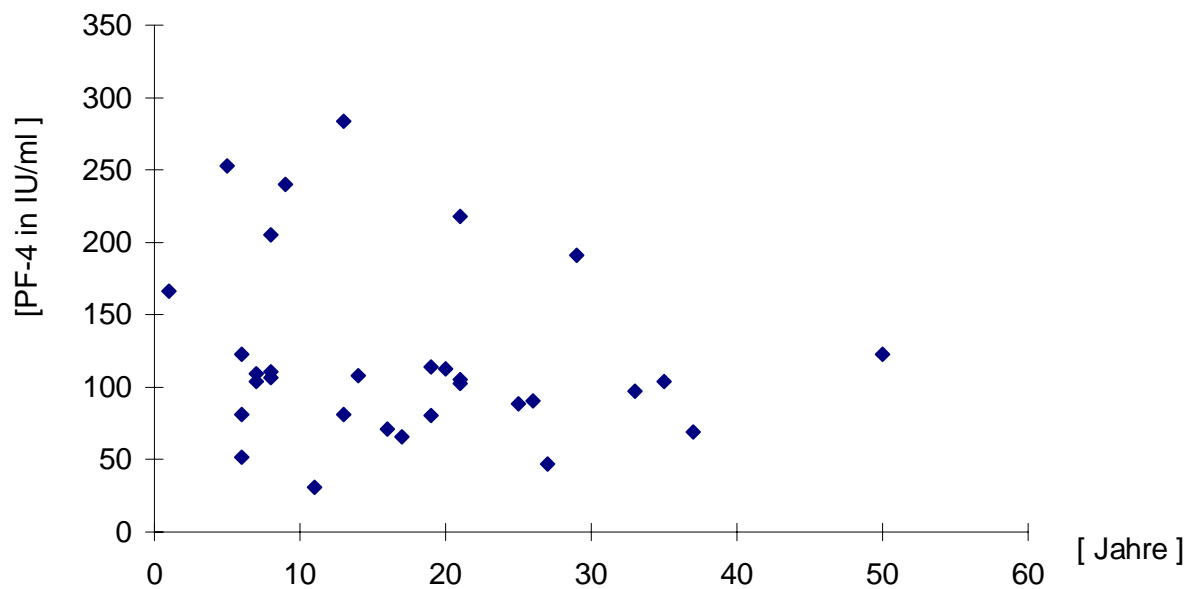


Abb.6: PF-4-Werte bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus in Abhängigkeit zur Krankheitsdauer in Jahren (n = 31)

Normalbereich: 0-5 IU/ml

3.2. THROMBOMODULIN

Die Bestimmung von Thrombomodulin zeigte relativ niedrige Werte im Frühstadium der Erkrankung, wobei es zwischen den untersuchten Gruppen keine signifikanten Unterschiede gab (vgl. Abb.7).

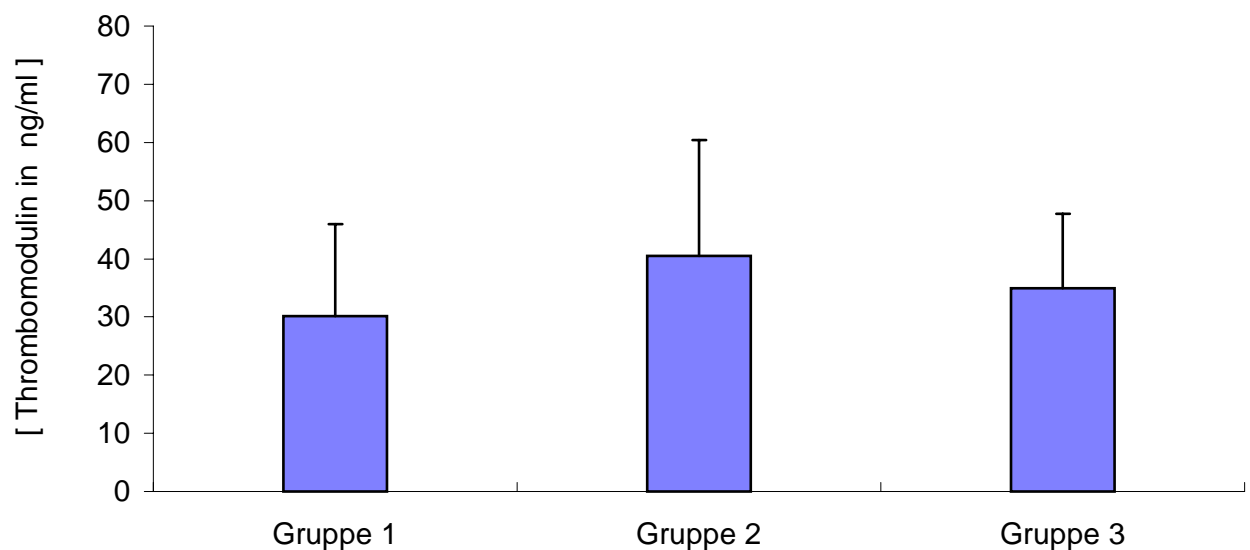


Abb.7: Thrombomodulin bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus

Mittelwert + Standardabweichung

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10-20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

In Abhängigkeit von der Krankheitsdauer in Jahren ergab sich keine statistische Signifikanz (vgl. Abb.8).

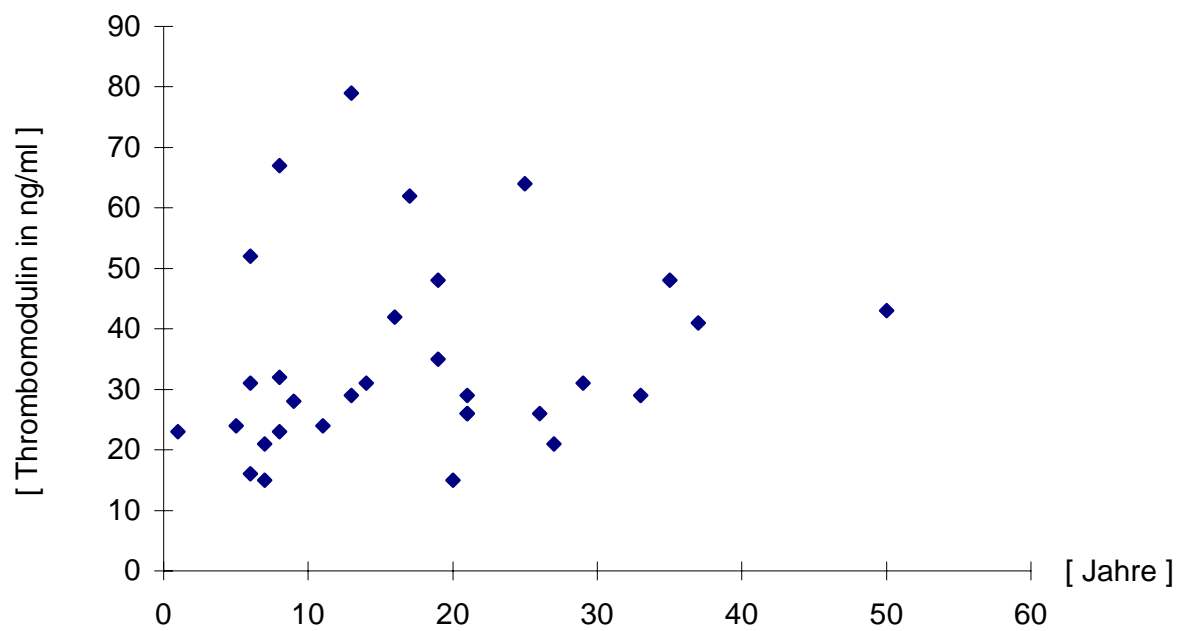


Abb.8: Thrombomodulin bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus in Abhängigkeit zur Krankheitsdauer in Jahren (n = 31)

3.3. PLASMATISCHE GERINNUNG

3.3.1. FIBRINOGEN

Die Fibrinogenwerte zeigten in den drei untersuchten Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede (vgl. Abb.9).

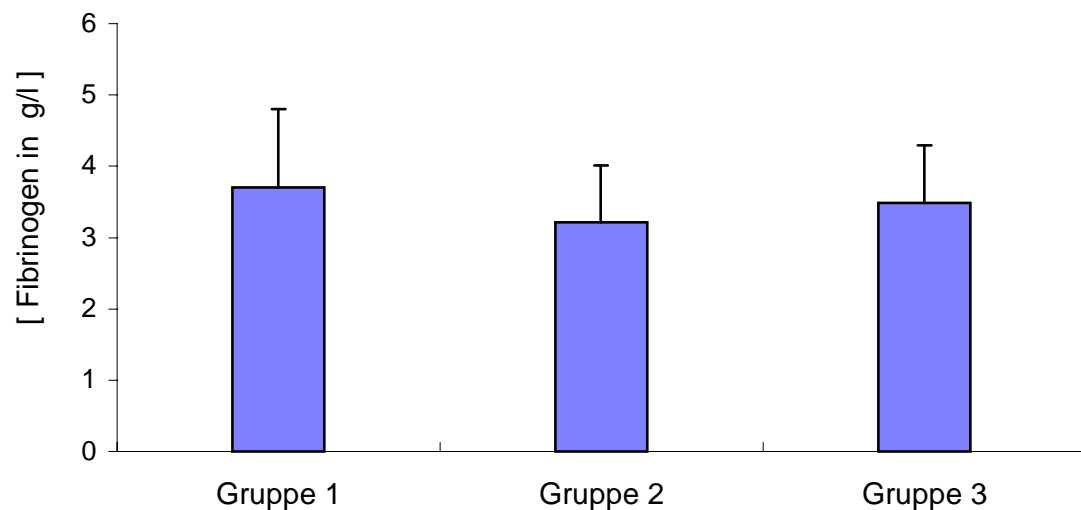


Abb.9: Fibrinogenspiegel bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus

Mittelwert + Standardabweichung

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10-20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

Normalbereich: 1,8-3,5 g/l

Die Fibrinogenspiegel zeigten auch in Abhängigkeit zur Krankheitsdauer in Jahren keine statistisch signifikanten Unterschiede (vgl. Abb. 10).

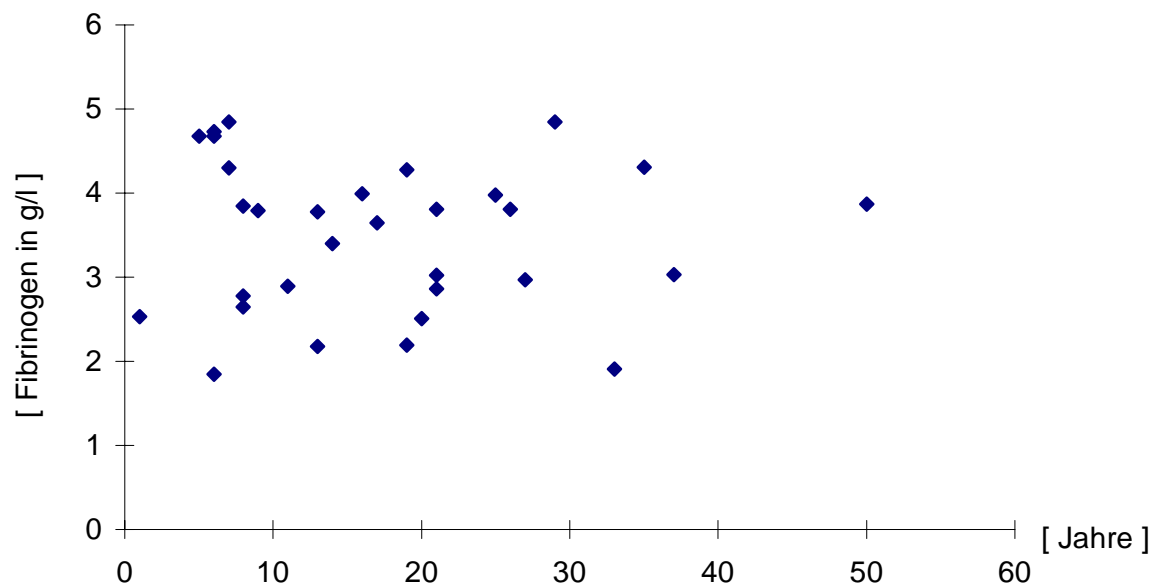


Abb.10: Fibrinogenspiegel bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus in Abhängigkeit zur Krankheitsdauer in Jahren (n = 31)
Normalbereich: 1,8-3,5 g/l

3.3.2. ANTITHROMBIN

Für die ermittelten Antithrombin-Werte ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (vgl. Abb. 11).

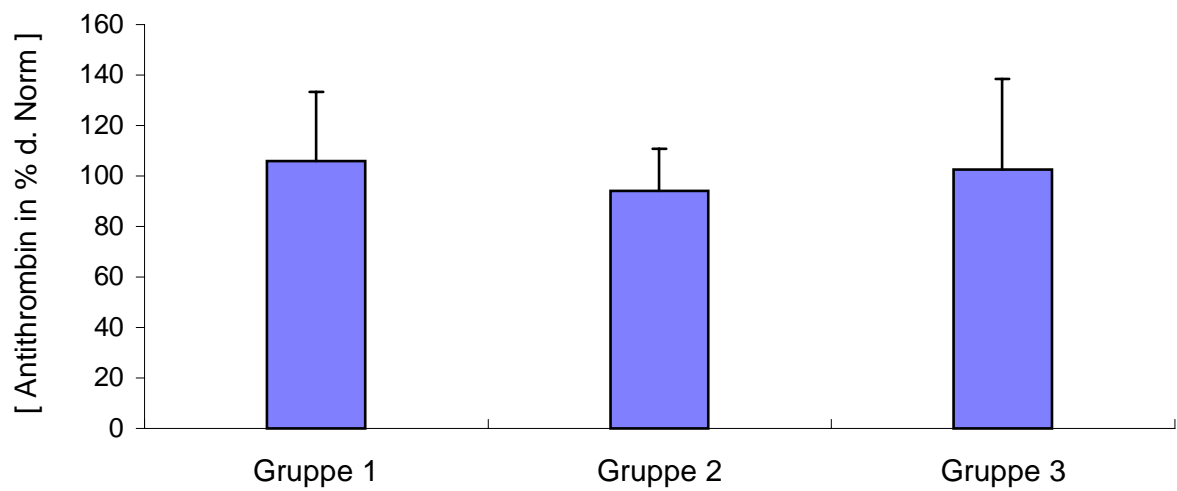


Abb.11: Antithrombin-Spiegel bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus

Mittelwert + Standardabweichung

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10-20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

Normalbereich: 75-125% d. Norm

Die Antithrombin-Spiegel zeigten auch in der Abhängigkeit zur Diabetesdauer in Jahren keine statistisch signifikanten Unterschiede (vgl. Abb. 12).

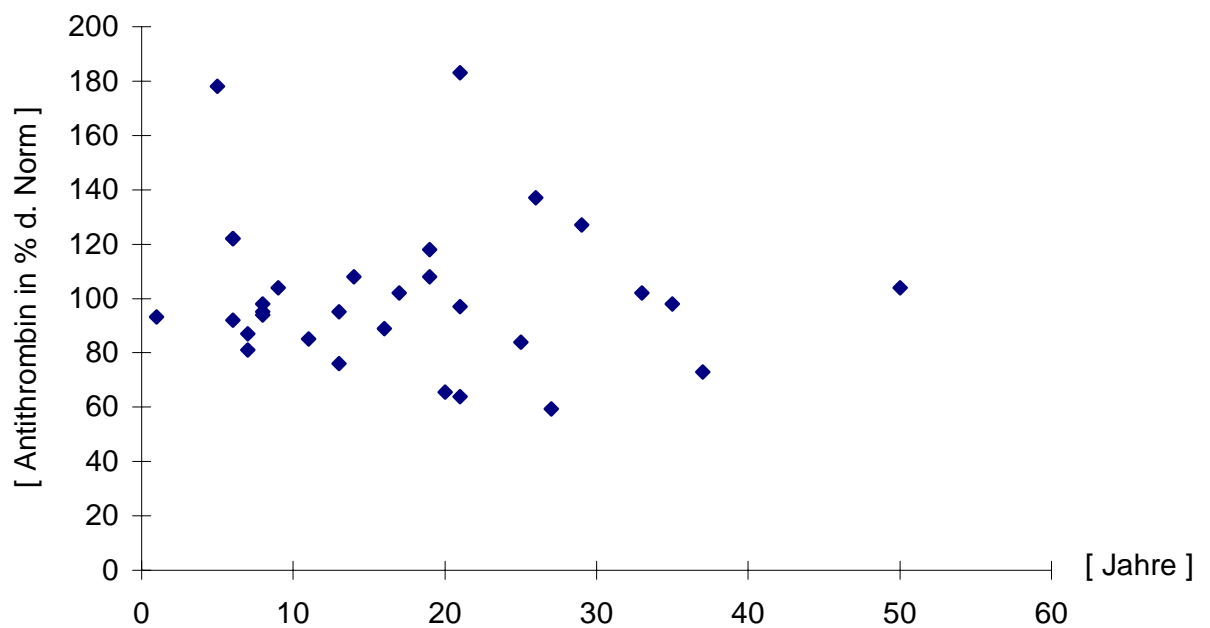


Abb.12: Antithrombin-Spiegel bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus in Abhängigkeit zur Krankheitsdauer in Jahren (n = 31)

Normalbereich: 75-125% d. Norm

3.3.3. PROTHROMBINFRAGMENT F 1+2

Die Prothrombinfragment F 1+2-Werte waren in Gruppe 1 am höchsten; statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen konnten aber nicht beobachtet werden (vgl. Abb.13).

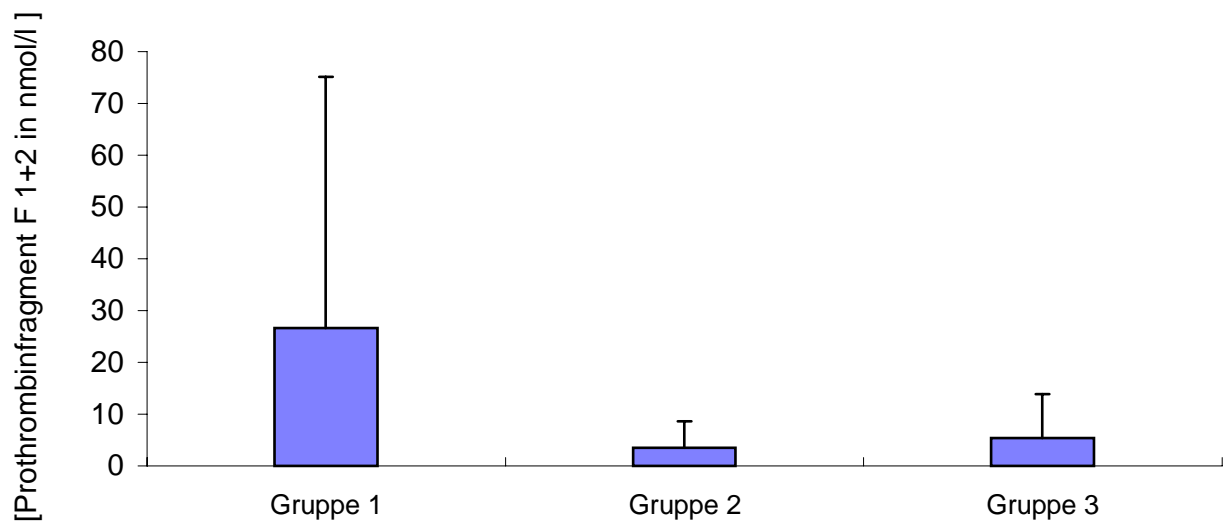


Abb.13: Prothrombinfragment F 1+2 bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus

Mittelwert + Standardabweichung

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10-20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

Normalbereich: 0,4-1,1nmol/l

In Abhängigkeit von der Krankheitsdauer in Jahren wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet (vgl. Abb.14).

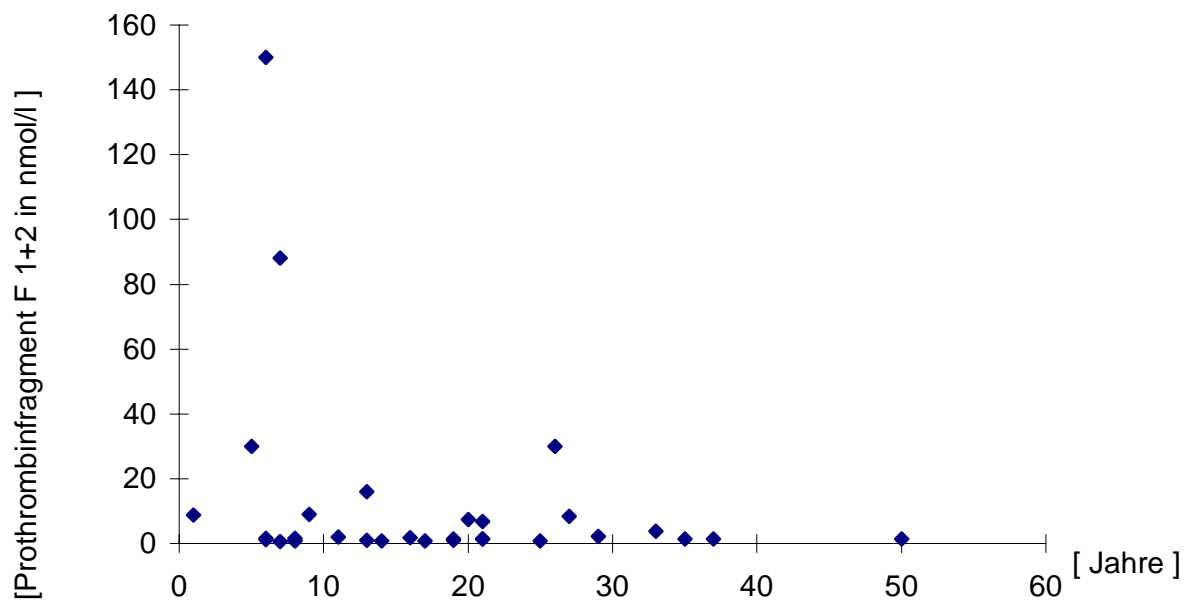


Abb.14: Prothrombinfragment F 1+2 bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus in Abhängigkeit zur Krankheitsdauer in Jahren (n = 31)

Normalbereich: 0,4-1,1 nmol/l

3.3.4. PROTEIN S

3.3.4.1. GESAMT-PROTEIN S

Die Konzentrationen von Gesamt-Protein S unterscheiden sich in den drei Gruppen nicht signifikant (vgl. Abb.15).

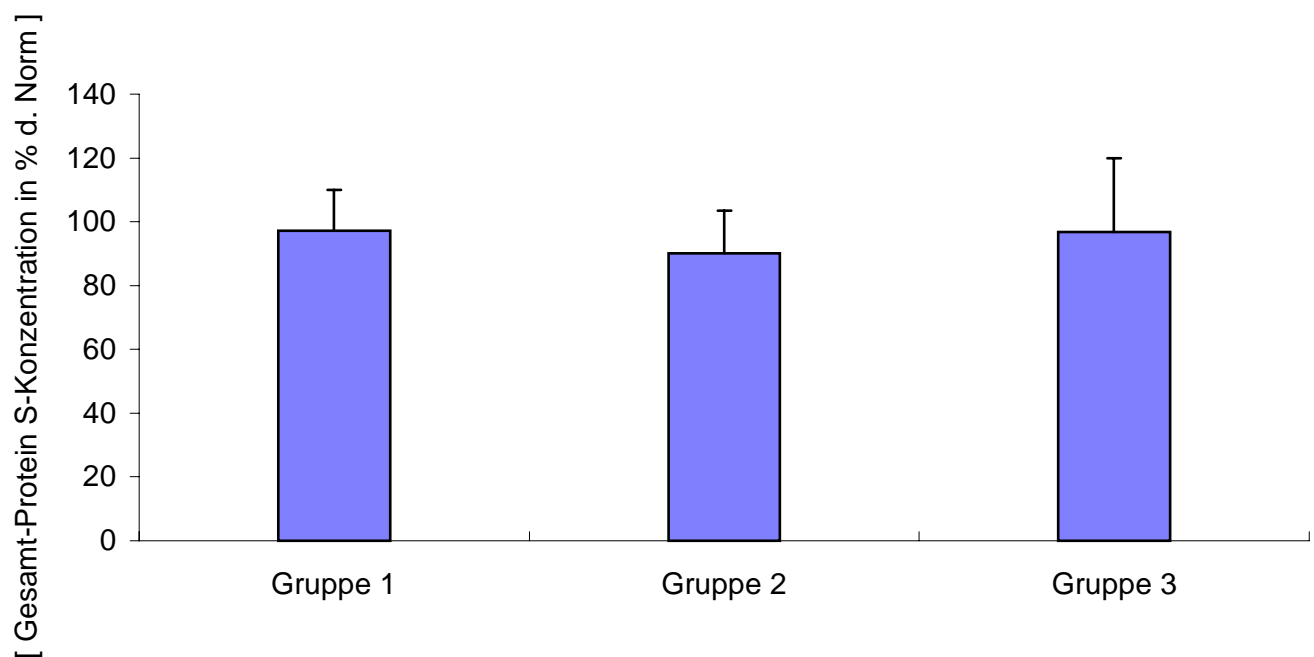


Abb.15: Gesamt-Protein S-Konzentration bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus

Mittelwert + Standardabweichung

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10-20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

Normalbereich: 70 - 140% d.Norm

Auch bei der Betrachtung der Gesamt-Protein S-Konzentrationen in Abhängigkeit zur Krankheitsdauer konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet werden (vgl. Abb.16).

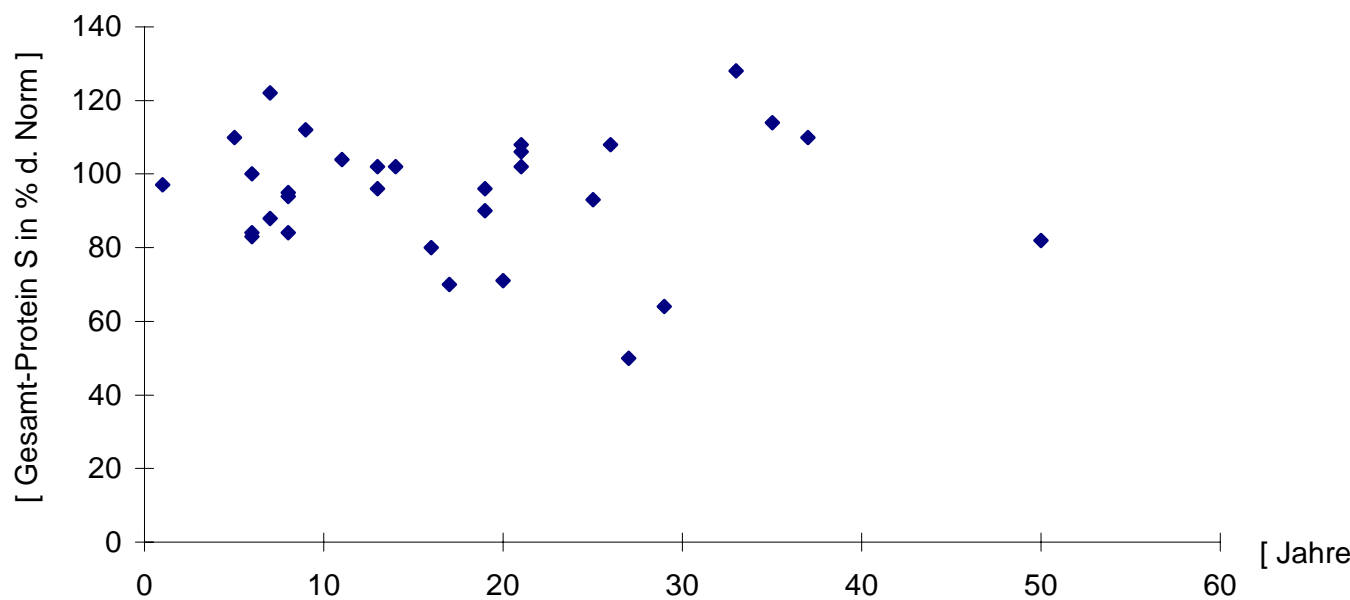


Abb.16: Gesamt-Protein S-Konzentration bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus in Abhängigkeit zur Krankheitsdauer in Jahren (n = 31)

Normalbereich: 70 - 140% d. Norm

3.3.4.2. FREIES PROTEIN S

Die Konzentrationen von freiem Protein S zeigten in den drei untersuchten Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede (vgl. Abb.17).

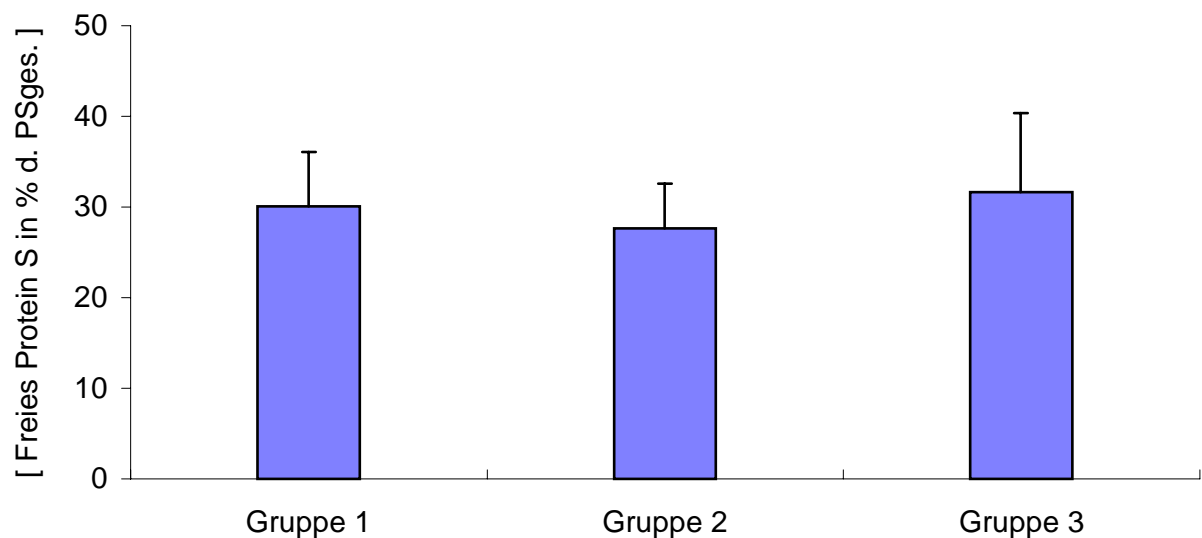


Abb.17: Freie Protein S-Konzentration bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus

Mittelwert + Standardabweichung

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10-20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

Normalbereich: 30-45% d.PSges.

Eine Abhängigkeit der freien Protein S-Konzentration zur Krankheitsdauer in Jahren konnte nicht nachgewiesen werden (vgl. Abb.18).

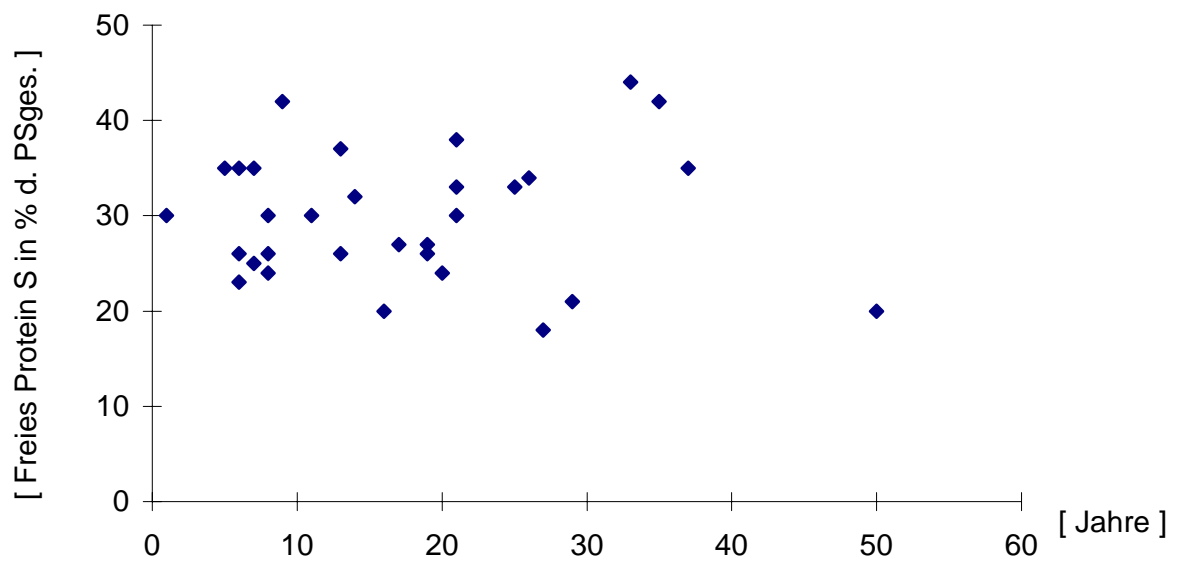


Abb.18: Freie Protein S-Konzentration bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus in Abhängigkeit zur Krankheitsdauer in Jahren (n = 31)

Normalbereich: 30 - 45% d.PSges.

3.4. BLUTZUCKER

Die Nüchtern-Blutzuckerspiegel unterschieden sich in den drei untersuchten Gruppen nicht signifikant (vgl. Abb.19).

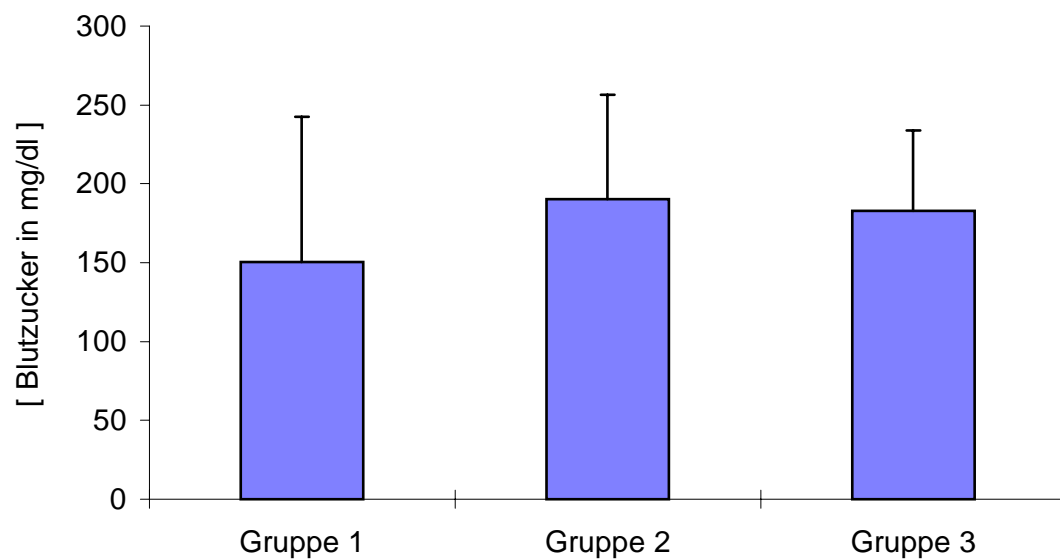


Abb.19: Nüchtern-Blutzuckerspiegel bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus

Mittelwert + Standardabweichung

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10-20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

Normalbereich: 60-100 mg/dl

Die Nüchtern-Blutzuckerspiegel waren in Abhängigkeit zur Krankheitsdauer nicht statistisch signifikant verändert (vgl. Abb.20).

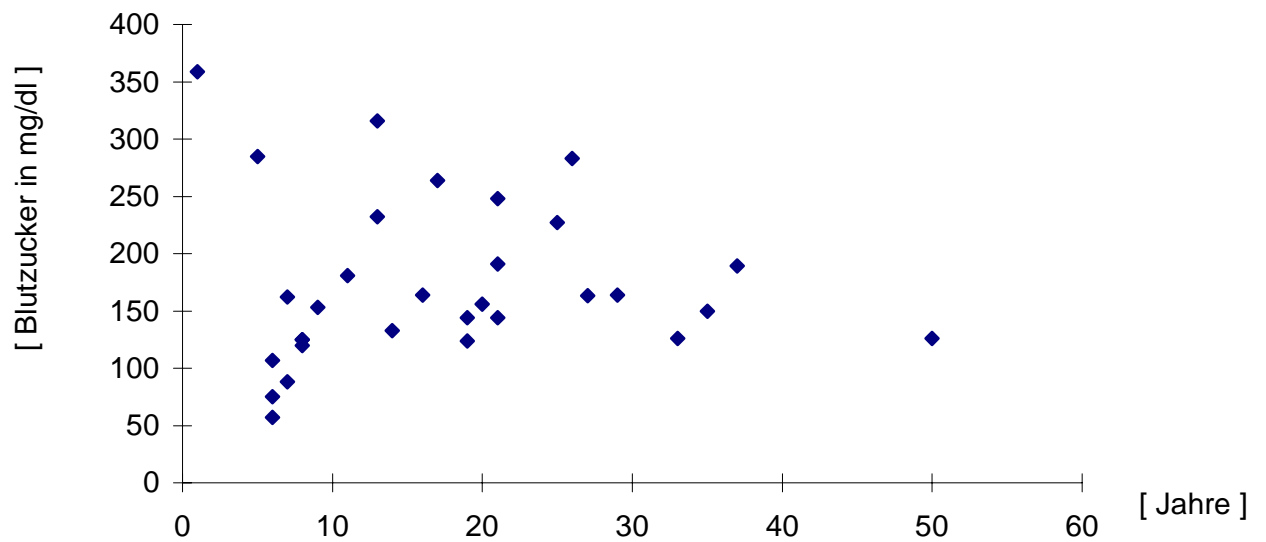


Abb.20:Nüchtern-Blutzuckerspiegel bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus in Abhängigkeit zur Krankheitsdauer in Jahren (n = 31)

Normalbereich: 60-100 mg/dl

3.5. HbA1c

Bezüglich der HbA1c-Werte zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (vgl. Abb.21).

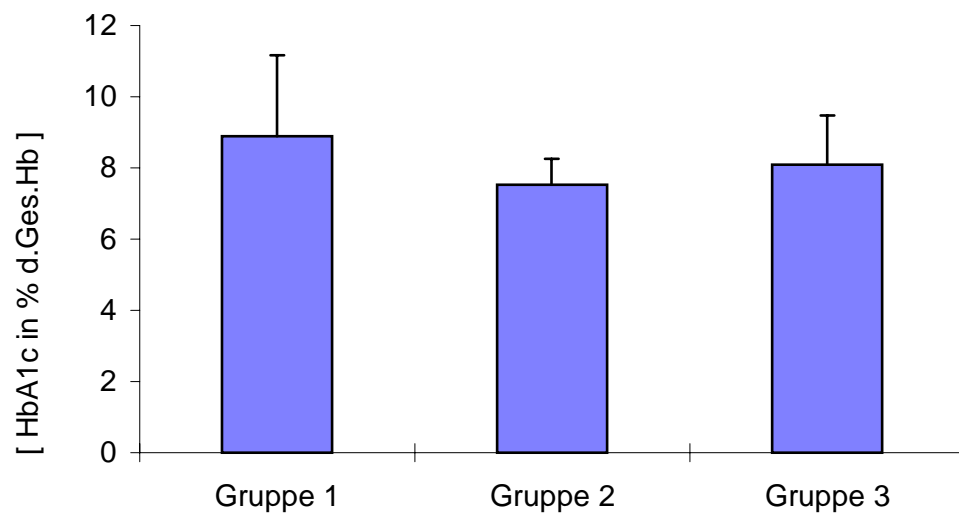


Abb.21: HbA1c-Werte bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus

Mittelwert + Standardabweichung

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10-20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

Normalbereich: 4,2-5,9% d.Ges.Hb

In Abhängigkeit zur Krankheitsdauer waren keine statistisch signifikanten Unterschiede der HbA1c-Spiegel zu beobachten (vgl. Abb.22).

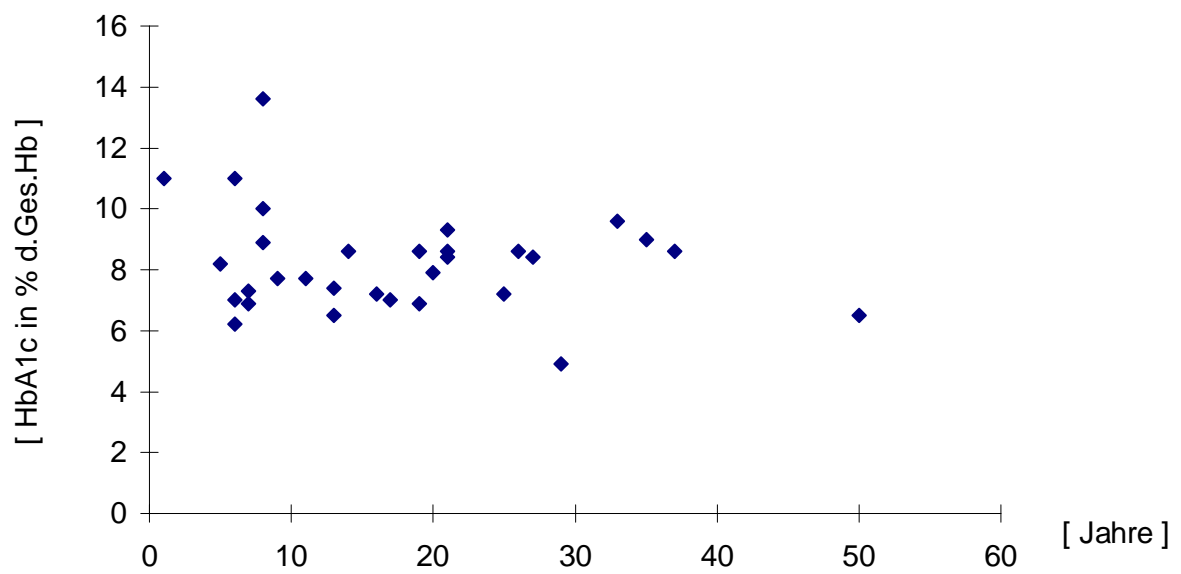


Abb.22: HbA1c-Werte bei Patienten mit Typ I-Diabetes mellitus in Abhängigkeit zur Krankheitsdauer in Jahren (n = 31)

Normalbereich: 4,2-5,9% d.Ges.Hb

4. DISKUSSION

Gefäßschäden und die damit verbundenen Komplikationen sind nach wie vor die Haupttodesursache bei Patienten mit Diabetes mellitus und verursachen auch den Hauptteil der direkt und indirekt mit dem Diabetes assoziierten sozialmedizinischen Kosten (21,78). Im Rahmen der Mikroangiopathie führen die Gefäßalterationen zu Schädigungen von Retina und Glomerulum (7). Hierbei schreibt man dem Endothel der Gefäße eine Schlüsselrolle zu; die Aufgabe des Endothels besteht unter physiologischen Bedingungen in seiner Schutzfunktion für die Gefäße. Es soll unter den jeweils individuellen Perfusionsbedingungen einen adäquaten Stoff- und Gasaustausch des Gewebes sicherstellen, was durch die biochemische Zusammensetzung in Form von Vasomotions- und Permeabilitätsregulation möglich wird (122). Desweiteren optimiert das Endothel in Assoziation mit den Thrombozyten seine Anti- bzw. Prothrombogenität (93,116).

Es existieren verschiedene Ursachen, die zu Veränderungen dieser physiologischen Vorgänge führen können. Thrombozytenaktivierung (35,87,110,134) und Störungen der plasmatischen und endothelialen Faktoren der Gerinnung (4,26,27,29,30,59,77) werden in der Literatur als Gründe angeführt.

4.1. THROMBOZYTENAKTIVIERUNG UND DIABETES MELLITUS: BEDEUTUNG VON GMP-140, GP1B UND PLÄTTCHENFAKTOR 4

Der Diabetes mellitus hat zahlreiche Auswirkungen auf die Thrombozytenfunktion. Da die Thrombozyten ihre Konstitution nicht aktiv regulieren können, sind sie vom äußeren Milieu abhängig, welches bei Diabetikern durch Hyperglykämie, Hyper- und Hypoinsulinämie sowie erhöhten Sympathikotonus mit hypoglykämiebedingten adrenergen Krisen geprägt ist.

Die Bildung intravasaler Thromben auf einem kontinuierlichen, nicht denudierten Endothel von diabetischen Ratten belegt, daß es beim Diabetes mellitus zur Verminderung antithrombogener Eigenschaften des Endothels kommt, bevor morphologische Läsionen erkennbar sind (75,95). Die verminderte Synthese von PGI₂ und NO (EDRF) dürfte ein entscheidender Faktor für das erhöhte thromboembolische Risiko bei Diabetikern sein, da die verminderte Freisetzung beider Stoffe die Thrombozytenadhäsion und -aggregation begünstigt (73).

Unter physiologischen Bedingungen steuern die Thrombozyten im Rahmen der Primärhämostase die verschiedenen Komponenten der Gerinnung (58,126,130). Während

Veränderungen von plasmatischen Faktoren der Gerinnung vor allem für die venöse Strombahn klinisch von Bedeutung sind, beeinflussen die thrombozytenassoziierten Phänomene vor allem den arteriellen Gefäßschenkel (9,22,35,54,108).

Es wurde wiederholt nachgewiesen, daß Thrombozyten bei Diabetes mellitus funktionell aktiver und konstitutiv verändert sind (37,38,110). Dies hat zur Folge, daß eine verstärkte Reiz - Signal - Kopplung, eine vermehrte Thromboxanbildung, eine Prostazyklinresistenz, eine erhöhte Glykoproteinrezeptorexpression, ein vermehrter Speicherproteingehalt und ein erhöhtes Thrombozytenvolumen zu beobachten sind.

Die Thrombozytenaktivierung kann als Ausdruck des Verhältnisses zwischen Stimulations- und Inhibitionsagonisten und ihrer Signalsysteme gewertet werden. Wann immer Thrombozyten mit subendothelialen Strukturen in Berührung kommen, werden sie aktiviert (117). Auf diesen Aktivatorstimulus reagieren die DNA- und zellkernlosen Thrombozyten, welche zytoplasmatische Abschnürungen von vor allem in Knochenmark, Lunge, Leber, Milz und Niere produzierten Megakaryozyten sind, weitgehend gleich (43,131). Es kommt innerhalb von Sekunden zum sogenannten shape change, d.h. es kommt zur Ausbildung von Pseudopodien und zum Übergang von der diskoiden in die sphärische Form. Anschließend erfolgt die primäre, noch reversible Aggregation, gefolgt von der sekundären, irreversiblen Aggregation mit der Freisetzung von Granulainhalt (release reaction) (12). Hierbei fusioniert die Granulamembran mit den Membranen des oberflächenverbundenen Kanalsystems der Thrombozyten (128) und die Granulainhaltsstoffe werden freigesetzt. Es existieren verschiedene Granula: aus den α - Granula werden 1. Gerinnungsfaktoren wie Fibrinogen, Faktor V und VIII, 2. thrombozytenspezifische Proteine wie Plättchenfaktor 4 und β -Thromboglobulin, 3. Wachstumsfaktoren wie PDGF (platelet-derived growth factor), EGF (epidermal growth factor), ECGF (endothelial cell growth factor) und Glykoproteine wie die Gerinnungsfaktoren und Albumin selbst, sowie Thrombospondin und Fibronectin freigesetzt (70,112). Einerseits können solche Stoffe, z.B. Thrombospondin an spezifisch exprimierte Oberflächenrezeptoren der Thrombozyten zurückbinden und so zu einer weiteren Quervernetzung des entstehenden weißen Thrombus führen (56,138,149), andererseits können z.B. Plättchenfaktor 4 und PDGF lokal mit der Gefäßwand interagieren und beispielsweise über ihre mitogene Aktivität lokale Gefäßwandveränderungen verstärken (63,94). El Khawand et al. (1993) sowie Tschöpe et al. (1990) haben in ihren Studien schon auf den möglichen Zusammenhang zwischen Diabetes und erhöhten Plättchenfaktor 4- Werten hingewiesen (50,133). Die δ - Granula setzen Thrombozytenagonisten wie ADP und Serotonin frei, die über Phospholipase A2 und Arachidonsäure in die Agonisten Prostaglandin G2/H2

und Thromboxan A2 konvertiert werden, wodurch es zur weiteren Aktivierung im Sinne einer positiven Feedback - Reaktion kommt (12,69).

Für die klinische Bedeutung eines gesteigerten Thrombozytenfunktionspotentials ist die intravasale Thrombozytenaktivierung ausschlaggebend. Die Ergebnisse zahlreicher Studien lassen den Schluß zu, daß es beim Diabetes mellitus tatsächlich zu einer gesteigerten intravasalen Thrombozytenaktivierung kommt (23,57,113,134,142). Der Beweis hierfür konnte erst mit der Einführung der durchflußzytometrischen Thrombozytenaktivierungsmarkeranalyse erbracht werden (1,2,125,132,136). Dabei werden Antikörper gegen aktivierungsabhängige Oberflächenantigene der Thrombozyten eingesetzt, so beispielsweise fluoreszierende monoklonale Antikörper gegen GMP-140 und GP1b (5,105,143).

In der vorliegenden Studie wurden zur Erfassung der Thrombozytenaktivierung die Proteine GMP-140 und GP1b sowie Plättchenfaktor 4 bei 31 Patienten mit Typ I Diabetes bestimmt. Die Patienten wurden abhängig von der Krankheitsdauer in drei Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 mit einer Krankheitsdauer bis zu 10 Jahren, Gruppe 2 zwischen 10 und 20 Jahren und Gruppe 3 mit einer Diabetesdauer von mehr als 20 Jahren.

Besonders GMP-140 (auch P-Selektin genannt) spielt wegen seiner Zugehörigkeit zur Familie der Selektine (72,79,99) eine besondere pathophysiologische Rolle, da das P-Selektin die Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothelzellen auf der einen Seite, und Monozyten und Neutrophilen auf der anderen Seite zu beeinflussen scheint (65,80,89,90,100) und die Funktion dieser Zelltypen bzgl. Hämostase und Entzündungsreaktion fördern könnte (146). GMP-140 ist ein integrales Membran-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 140000 Dalton, welches auf Thrombozyten, Megakaryozyten und Endothelien (12) gefunden wurde und auch synonym als Platelet Activation-dependent granule external membrane-Protein (PADGEM-Protein) bezeichnet wird (79). Es ist an ruhenden Thrombozyten kaum nachweisbar, da es sich in der Membran der α -Granula im Innern der Plättchen und auf den Weibel-Palade-Bodies der Endothelzellen befindet (65,100). Nach Stimulation der Thrombozyten und Freisetzung des α -Granulainhalts werden die GMP-140-Rezeptoren an der Zelloberfläche exprimiert (65,89) und können dann mit Hilfe monoklonaler Antikörper nachgewiesen werden.

Die Bestimmung von GMP-140 in der vorliegenden Arbeit ergab, daß die Aktivierung der Thrombozyten gegenüber Normalpersonen in allen drei untersuchten Patientengruppen deutlich erhöht ist. Dies steht im Einklang mit den zuvor geschilderten Ergebnissen anderer Studien (23,57,113,134,142). Die Patienten der mit einer Krankheitsdauer bis zu 10 Jahren zeigten zwar keine statistisch signifikant erhöhten Werte im Vergleich mit den beiden anderen

Gruppen, dennoch ist eine Tendenz zu vermehrter Thrombozytenaktivierung in den frühen Jahren des Typ I Diabetes erkennbar. Die beiden Gruppen mit einer Diabetesdauer von 10-20 Jahren bzw. mit mehr als 20 Jahren unterscheiden sich auf erkennbar niedrigerem Niveau kaum, was diese Aussage unterstreicht.

Das Glykoprotein GP1b ist der wichtigste und zahlenmäßig bedeutsamste Adhäsionsrezeptor für Thrombin und den von Willebrand-Faktor (vWF) auf Thrombozyten (11). Gesunde Menschen haben 25000 GP1b- Moleküle auf der Oberfläche jedes Thrombozyten, welche bei Aktivierung internalisiert werden können (103,147). Der GP1b-Komplex besteht hauptsächlich aus den Glykoproteinen 1b und IX, wobei das GP1b aus den Untereinheiten α und β zusammengesetzt ist und ein Molekulargewicht von 170000 Dalton hat. Der vWF ist ein wichtiger Ligand von GP1b mit einem Molekulargewicht von 220000 Dalton und wird überwiegend im Endothel synthetisiert (11). Bei hohen Scherraten adhären Thrombozyten innerhalb von Mikrosekunden an subendotheliale Strukturen und breiten sich rasch über dem Defekt aus (Thrombozyten-Spreading) (127). Hierbei spielt die von der Interaktion zwischen GP1b und vWF vermittelte Bindung der Thrombozyten an das Subendothel eine Hauptrolle (101). Bei Patienten mit Bernard-Soulier Syndrom führt ein defekter GP1b-IX Komplex z.B. zu verlängerter Blutungszeit (13). Die Erhöhung von GP1b auf Thrombozyten von Diabetikern könnte die molekulare Basis für die verstärkte Thrombozytenfunktion bei diesen Patienten darstellen (135,137), da es als spezifischer Rezeptor der zytoadhäsiven Proteine beim Adhäsions- und Aggregationsprozeß eine wichtige Rolle spielt (9,67).

Die GP1b-Expression der untersuchten Patienten war im Vergleich mit Normalpersonen erhöht, was mit den Ergebnissen der oben genannten Veröffentlichungen übereinstimmt. In Abhängigkeit von der Krankheitsdauer waren aber keine statistisch signifikanten Unterschiede zu detektieren.

Der Nachweis von Glykoproteinen wie GMP-140 und GP1b auf der Oberflächenmembran von Thrombozyten ist ein Indikator für das frühe Stadium der Aktivierung und spiegelt den funktionellen Status der Thrombozyten *in vivo* wider (53,80,125). Die Immunfluoreszenzmarkierung solcher Epitope mit monoklonalen Antikörpern ist bei fixierten und damit maximal stabilisierten Thrombozyten möglich, welche dadurch die *in vivo*-Situation repräsentieren (44,102). Der Nachweis von Thrombozytenaktivierung bei Patienten mit Diabetes mellitus ist schon durch einige Studien erbracht worden (1,2,23,57,113,125,132,134,136,142), dennoch liegen nur vereinzelt Informationen über den Zusammenhang mit der Krankheitsdauer vor. Deshalb war es ein Ziel dieser Studie, eine mögliche Korrelation zu überprüfen. Hierfür kann neben GMP-140 und GP1b auch der Nachweis von Plättchenfaktor 4 zur Analyse herangezogen werden, da er während des

Aktivierungsvorganges aus den Granula freigesetzt wird (70). Tschöpe et al. fanden höhere Aktivierungswerte (GMP-140) bei Patienten mit bestehenden Gefäßschäden als bei Patienten ohne vaskuläre Komplikationen und schlossen auf eine mögliche Thrombozytenaktivierung durch die Gefäßläsionen; die erhöhten Werte bei komplikationslosem Krankheitsverlauf wurden als Indikator für einen primären Beitrag der Thrombozyten zu diabetischen Gefäßschäden gedeutet (132). Die Ergebnisse von GP1b werden in der Literatur kontrovers diskutiert: es wird über erhöhte Werte bei Diabetikern (135,137) berichtet, andererseits sind einige Autoren auch der Meinung, daß es nach der Thrombozytenaktivierung zum Rückgang der GP1b-Expression kommt (71,107). Dabei soll es zu einer Translokation von GP1b-IX Komplexen zu den Membranen des oberflächenverbundenen Kanalsystems kommen (104). El-Khawand et al. beschreiben in ihrer Arbeit signifikant erhöhte Aktivierungsparameter (PF 4 und β -TG) bei Patienten im frühen Krankheitsstadium ohne Gefäßkomplikationen (50); dagegen fanden Fritschi et al. erhöhte Plättchenfaktor 4-Werte lediglich bei Patienten mit einer Makroangiopathie (57). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen tendentiell, daß die Thrombozytenaktivierung bei Patienten mit einer geringen Krankheitsdauer deutlicher ausgeprägt ist als bei Patienten mit längerer Diabetesdauer. Auf der einen Seite könnte man als Grund hierfür anführen, daß die Thrombozytenaktivierung der erfaßbaren Gefäßschädigung vorausgeht und daher Thrombozyten möglicherweise einen Anteil an der Entstehung von Folgeschäden haben. Auf der anderen Seite kann man sich aber auch die Frage stellen, warum die Thrombozytenaktivierung im Verlauf der Krankheit wieder abnimmt: entweder ist die oben genannte These richtig, oder die Thrombozyten adhäreren in diesem Stadium so früh an die atherosklerotischen Plaques, daß sie im zirkulierenden Blut nicht mehr nachzuweisen sind. Im Gegensatz zu einzelnen Studien (50,98,110) konnten wir keine Abhängigkeit der Thrombozytenaktivierung von der metabolischen Situation der Patienten, die über das HbA1c kontrolliert wurde, nachweisen; dies stimmt wiederum mit den Erkenntnissen anderer Arbeiten überein (19,44,102). Es wird darüber spekuliert, daß die Unabhängigkeit vom Glukosemetabolismus auf die erst mit Zeitverzögerung eintretende megakaryozytäre Thrombopoese zurückzuführen sei, und daß eine Umkehrung des Thrombozytenstatus eine Langzeitnormalisierung des Metabolismus voraussetzt (132).

Die mögliche Bedeutung von Thrombozyten beim Diabetes mellitus unter Betrachtung des pathophysiologischen Aspektes ist folgendermaßen zu verstehen: 1: durch Mikroembolisierung der kapillären Strombahn kann es zur Entwicklung mikroangiopathischer Organläsionen kommen, 2. kann die Thrombozytenaktivierung bei vorgeschädigten Gefäßen die Atherogenese beschleunigen und 3. sind Thrombozyten bei vorbestehenden Gefäßläsionen häufig Auslöser von akuten thrombotischen Ereignissen (135).

4.2. THROMBOZYTENAKTIVIERUNG:

BEDEUTUNG DER DURCHFLUßZYTOMETRIE

Mit der ersten Beschreibung der Thrombozyten durch Bizzozero im Jahr 1881 (14) begann die Aufklärung von Struktur und Funktion der Blutplättchen (11,12). Seitdem wurden zahlreiche Verfahren entwickelt, die unter Berücksichtigung der Fähigkeit der Thrombozyten zu adhären, zu aggregieren und aktiviert zu werden ihre Funktion testen (18,83,111). Insbesondere die Thrombozytenaktivierung ist in den letzten Jahren in den Vordergrund des klinischen Interesses gerückt, da nachzuweisen war, daß Zusammenhänge u.a. zwischen koronarer Herzkrankheit, kardiopulmonalem Bypass, myeloproliferativen Erkrankungen und Thrombozytenaktivierung bestehen (10,24,54,66,74). Bis zur Einführung der Durchfluß- oder Flow Zytometrie existierten lediglich die Blutungszeit und die Thrombozytenaggregation als standardisierte klinische Tests zur Erfassung der Thrombozytenfunktion; diese beiden limitieren sich ebenso wie die indirekten Methoden des PF 4- und β -TG-Nachweises, da es methodische Probleme gibt (84,115,150). Im Rahmen der Thrombozytenaktivierung kommt es zu Veränderungen an der Zelloberfläche: nach dem Aktivatorstimulus fusioniert die Granulamembran mit der Oberflächenmembran oder mit dem oberflächenverbundenen offenen Kanalsystem der Thrombozyten und es kommt zur Freisetzung der Granulainhaltsstoffe wie Plättchenfaktor 4 bzw. zur Exprimierung von Membranproteinen wie GMP-140, welches dann durch aktivierungsabhängige monoklonale Antikörper im Rahmen der durchflußzytometrischen Analyse direkt nachgewiesen werden kann und im Gegensatz zu anderen indirekten Nachweisverfahren (z.B. Aggregometrie) einen großen Vorteil bietet (105,125).

In der vorliegenden Studie wurde die Thrombozytenaktivierung neben der Bestimmung von PF 4 mit Hilfe der Flow Zytometrie analysiert. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, daß in Suspension gehaltene Zellen mit fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern markiert werden und die emittierte Fluoreszenz sowie die lichtstreuenden Eigenschaften der Zellen detektiert und analysiert werden. Die gewonnenen Vollblutproben wurden verdünnt, fixiert, gewaschen, mit monoklonalen Antikörpern markiert und dann mit einem FACScan Flow Zytometer analysiert.

Die Blutentnahme und Probenaufbereitung wurde so durchgeführt, daß der damit verbundenen Problematik Rechnung getragen wurde. Die Verdünnung mit PBS-Pufferlösung beugt der Entwicklung von Thrombozytenaggregaten vor. Die Entstehung von Aggregaten muß für die Flow Zytometeranalyse minimiert werden, da diese jedes Oberflächenantigen der Thrombozyten individuell analysiert und bei aggregierten Thrombozyten die Anzahl der

Antigene vermindert sein kann (106). Eine Fixierung der Proben ist bei klinischen Studien fast unumgänglich, da fixierte Proben noch innerhalb von 24 Stunden analysiert werden können ohne einen signifikanten Unterschied in ihrer Fluoreszenzintensität gegenüber sofort analysierten Proben aufzuweisen (85). Die Verwendung monoklonaler Antikörper geht auf die Erkenntnis zurück, daß verschiedene Thrombozytenepitope auch verschiedene Aspekte der Thrombozytenaktivierung widerspiegeln; um ein spezifisches Epitop exakt zu erfassen und eine unspezifische Bindung zu vermeiden, wurden monoklonale Antikörper verwendet (105). Die angewendete zwei Farben/zwei Antikörper-Methode basiert auf der Eigenschaft von Thrombozyten, in Vollblut durch ihre Lichtstreuung erkannt werden zu können. Fallen einige nicht an die spezifischen monoklonalen Antikörper gebundene Partikel in das untersuchte Fenster, würde daraus eine Verfälschung der Ergebnisse resultieren. Aus diesem Grund ist es wichtig, daß ein Antikörper die Partikel als Thrombozyten identifiziert und der zweite die Expression des Zielglykoproteins quantifiziert (1,2,125). Um diesen notwendigen Voraussetzungen Rechnung zu tragen, kamen mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) versehene monoklonale Antikörper für die Thrombozytenidentifizierung, und mit Phycoerythrin (PE) versehene monoklonale Antikörper für die Quantifizierung des Zielglykoproteins zur Anwendung.

4.3. ENDOTHELIALE FAKTOREN UND DIABETES MELLITUS:

BEDEUTUNG VON THROMBOMODULIN

Patienten mit Diabetes mellitus sind dazu prädisponiert Gefäßleiden zu entwickeln, welche u.a. mit einer Endotheldysfunktion einhergehen (39,47,139). Ein Nachweis der Dysfunktion mit einem endothelspezifischen Parameter wurde mit der Entdeckung des Thrombomodulins durch Esmon et al. möglich (52).

Thrombomodulin ist ein endothelständiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 75000 Dalton, welches als hochaffiner Rezeptor für Thrombin fungiert (17). Im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 an seinen Rezeptor gebunden, erfährt das Thrombin eine starke Veränderung seiner Substratspezifität. In Abwesenheit von Thrombomodulin unterstützt Thrombin die Blutgerinnung durch die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin über die Aktivierung der Faktoren V, VIII, XI und XIII. Wenn Thrombomodulin und Thrombin als Komplex vorliegen, wird Protein C aktiviert. Aktiviertes Protein C inhibiert die Faktoren Va und VIIIa und führt daher zu einer Koagulationshemmung, die dadurch verstärkt wird, daß Thrombomodulin die Hemmung von Thrombin durch Antithrombin fördert (118).

Thrombomodulin ist somit in der Lage ein prokoagulatorisches in ein antikoagulatorisches Enzym zu konvertieren (49,51). Wenn Endothelzellkulturen mit H₂O₂ inkubiert werden, kommt es zum Endothelzelluntergang und zur vermehrten Freisetzung von Thrombomodulin in den Kulturüberstand (76). Thrombomodulin besitzt im Gegensatz zu anderen Gefäßmarkern eine hohe Endothelspezifität, was durch immunhistologische Studien unterstrichen wird, die zeigen, daß Thrombomodulin fast ausschließlich vom Endothel exprimiert wird (123).

In der vorliegenden Studie zeigten die Patienten mit einer Diabetesdauer zwischen 10 und 20 Jahren die höchsten Thrombomodulinwerte, Patienten mit einer Krankheitsdauer bis zu 10 Jahren die niedrigsten Werte, wobei bei allen untersuchten Patienten die Werte deutlich über den Normalwerten lagen. Eine statistische Signifikanz der Thrombomodulinwerte in Bezug auf die Diabetesdauer war jedoch nicht festzustellen; es deutet sich lediglich die Tendenz an, daß im frühen Stadium der Erkrankung der Endothelmarker Thrombomodulin am geringsten ausgeprägt zu sein scheint. Die Ergebnisse dieser Studie stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Sernau et al. (123), die ebenfalls bei Patienten mit der geringsten Krankheitsdauer die niedrigsten Werte fanden. Diese Arbeitsgruppe postulierte nach der Untersuchung von diabetischen und nichtdiabetischen Patienten mit/ohne pAVK und mit/ohne Albuminurie, daß das endothelspezifische Thrombomodulin als Marker für mikrovaskuläre, aber nicht für makrovaskuläre Endothelzellschädigungen zu verwenden sei. Das wurde begründet mit der Tatsache, daß 95% des Gefäßgebietes im Bereich der Mikrozirkulation liegen, und bei einer pAVK im Vergleich zur Mikrozirkulation ein nur sehr kleines Gefäßgebiet befallen ist. Diese Betrachtungsweise unterstützt die Ergebnisse unserer Studie, die einen tendentiellen Anstieg von Thrombomodulin erst mit einer längeren Erkrankungsdauer zeigte. Auch Leurs et al. fanden statistisch signifikante Thrombomodulinerhöhungen erst bei Patienten, die bereits eine Kombination von Retinopathie und Albuminurie aufwiesen (92). Eine Korrelation zwischen Diabetesdauer und Thrombomodulinspiegel wurde auch von Iwashima et al. bei Typ II Diabetikern im frühen Stadium einer Nephropathie beschrieben (77). Yaqoob et al. wiesen in ihrer Studie einen Zusammenhang von erhöhten Thrombomodulinwerten und bestehendem Tubulusschaden bei Typ I Diabetikern nach; im Gegensatz dazu war bei Normwerten für Thrombomodulin kein Tubulusschaden feststellbar (151), was ein weiterer Hinweis dafür ist, daß erhöhte Thrombomodulinwerte erst bei Folgeschäden bzw. längerer Diabetesdauer auftreten. Hergesell et al. fanden heraus, daß der Thrombomodulinspiegel auch abhängig von der renalen Clearance ist (68); die Patienten dieser Studie zeigten jedoch Normwerte für Kreatinin, sodaß erhöhte Thrombomodulinwerte aufgrund einer verminderten renalen

Clearance ausgeschlossen werden können. Desweiteren konnte kein Zusammenhang zwischen dem Thrombomodulinspiegel und der metabolischen Situation anhand des HbA1c festgestellt werden, was mit den in der Literatur geschilderten Ergebnissen übereinstimmt (77,123,151).

4.4. PLASMATISCHE GERINNUNG UND DIABETES MELLITUS:

BEDEUTUNG VON FIBRINOGEN, ANTITHROMBIN, PROTEIN S UND PROTHROMBINFRAGMENT F1+2

Es wurde in Erwägung gezogen, daß die Pathogenese der Gefäßläsionen bei Patienten mit Diabetes mellitus zumindest teilweise mit Veränderungen des hämostatischen Systems im Zusammenhang steht (3,64,81). Als Grund wird hierfür in der Literatur der hyperkoagulatorische Zustand bei diesen Patienten angeführt (7,33,110,135), der durch den Nachweis von Gerinnungspräkursoren, erhöhter Thrombingenerierung und Verminderung von Gerinnungsinhibitoren gekennzeichnet ist (8,27,29,32).

Diese Hypothesen gaben den Anlass, das plasmatische Gerinnungssystem bei Patienten mit Diabetes mellitus zu untersuchen. Hierzu wurden Fibrinogen, Prothrombinfragment F1+2, Antithrombin und Protein S bestimmt.

Fibrinogen stellt die Vorstufe des Endproduktes der Gerinnungskaskade, des Fibrins, dar und gehört zur Gruppe der Akute-Phase-Proteine (Fey und Fuller 1987). Als solches kann es als Marker für Entzündungsprozesse angesehen werden (140), die an der Entstehung von atherosklerotischen Gefäßveränderungen, u.a. bei Diabetikern, beteiligt sind (7,129). Während Entzündungsreaktionen steigt der Fibrinogenspiegel (55), wobei Leukozyten die hepatische Fibrinogensynthese über Expression von Interleukin-6 stimulieren können (109). Die Rolle der Entzündungsreaktion bei der Entstehung der Atherosklerose ist dadurch gekennzeichnet, daß Interleukin-1 und Tumor-Nekrose-Faktor in der Lage sind, antithrombogene Eigenschaften des Endothels wie Regulation der Gefäßwandpermeabilität und Vasomotion in prothrombogene Eigenschaften umzukehren (109).

In vielen Veröffentlichungen wird im Zusammenhang mit Diabetes mellitus von erhöhten Fibrinogenspiegeln berichtet, unabhängig davon, ob die Patienten an Typ I- oder Typ II Diabetes erkrankt sind (32,59,97). Es existieren aber auch Studien, die den Zusammenhang zwischen erhöhten Fibrinogenspiegeln und Diabetes mellitus nicht bestätigen können (50,148). Diese Unterschiede könnten darin begründet sein, daß es verschiedene Faktoren gibt, die den Fibrinogenspiegel beeinflussen. Hierzu zählen neben Alkoholkonsum, Nikotinabusus, Alter, Adipositas und Infektionsreaktionen auch genetische Faktoren und

speziell bei Diabetikern eine insuffiziente Blutzuckerkontrolle und gesteigerte Fibrinogensynthese (34,61,86,140).

In unserer Studie konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Diabetesdauer und Fibrinogenkonzentration festgestellt werden; dies ist mit Ergebnissen aus der Literatur vergleichbar, die diesen Zusammenhang ebenfalls nicht feststellten (50,59,110). Die Fibrinogenwerte sind auch gegenüber den Standardlaborreferenzbereichen lediglich bei Patienten mit einer Diabetesdauer von bis zu 10 Jahren erhöht, die Ergebnisse der beiden anderen untersuchten Patientengruppen liegen innerhalb des Normbereiches. Auch der von einigen Autoren vermutete Zusammenhang mit einer insuffizienten Blutzuckerkontrolle konnte insofern nicht bestätigt werden, da keine Abhängigkeit zwischen Fibrinogenkonzentration und HbA1c- bzw. Blutzuckerwerten nachzuweisen war.

Seitdem bekannt ist, daß bei der Konversion des Gerinnungspräkursors Prothrombin zu Thrombin das Spaltprodukt Prothrombinfragment F 1+2 entsteht, wird angenommen, daß dieses ein sensitiver Marker für die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems ist (8,114). Prothrombinfragment F 1+2 wird somit als Marker für die Thrombingenerierung angesehen (4). Die in der Literatur angeführten Ergebnisse berichten einheitlich von erhöhten Prothrombinfragment F 1+2-Werten bei Typ I Diabetikern (30,32,62,152), was durch die Ergebnisse unserer Untersuchung unterstrichen wird. Alle untersuchten Patienten lagen mit ihren Werten über den angegebenen Standardlaborreferenzbereichen, wobei Patienten mit einer Diabetesdauer bis zu 10 Jahren die höchsten Werte aufwiesen; dennoch lag kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Diabetesdauer und Prothrombinfragment F 1+2 vor. Eine Korrelation zwischen Prothrombinfragment F 1+2 und der metabolischen Situation wurde entsprechend den Ergebnissen anderer Publikationen nicht gefunden (30). Es existieren Veröffentlichungen, die von einer Korrelation zwischen Fibrinogenspiegel und Prothrombinfragment F 1+2-Werten berichten (32,62); Prothrombinfragment F 1+2 moduliert die Fibrinogensynthese, sodaß erhöhte Prothrombinfragment F 1+2-Werte mit einer Überproduktion von Fibrinogen in der Leber einhergehen könnten (32). Dieser Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Die Antithrombine wurden 1975 von Seegers in vier Gruppen unterteilt, wobei das Antithrombin III über 70% der Aktivität der Antithrombine übernimmt; die physiologische Funktion von Antithrombin besteht in der Hemmung aktivierter Gerinnungsfaktoren (119). Veränderungen von Antithrombin bei Diabetikern mit Gefäßleiden wurden beschrieben (6), ebenso wurde bei normalen Plasmakonzentrationen über eine reduzierte biologische Aktivität von Antithrombin bei Typ 1 Diabetikern berichtet (28). Bei der Bestimmung von Antithrombin zeigt die Literatur keine signifikanten Unterschiede der Plasmakonzentrationen

bei Typ I Diabetikern gegenüber Normalpersonen (25,96,110), es ist auch keine Abhängigkeit von der Krankheitsdauer beschrieben (96). Diese Erkenntnisse stimmen mit den Ergebnissen unserer Arbeit überein, bei denen es weder statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei untersuchten Patientengruppen gab, noch eine Abhängigkeit zwischen Diabetesdauer und metabolischer Situation nachzuweisen war. Desweiteren lagen die Antithrombin-Werte für alle drei Patientengruppen innerhalb des Standardlaborreferenzbereiches.

Protein S ist ein Vitamin K-abhängiges Glykoprotein, welches als Co-Faktor für die antikoagulatorische Wirkung von aktiviertem Protein C und der Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa dient (45,46,145). Im Plasma zirkuliert das von DiScipio et al. 1977 in Seattle entdeckte Protein in freier Form und als Komplex mit C4-binding Protein; nur das freie Protein S agiert als Co-Faktor für aktiviertes Protein C (119), während es in gebundener Form seine Fähigkeit als Protein C-Co-Faktor verliert (40). Daher ist nur die freie Protein S-Konzentration für die Regulation des Protein C-abhängigen Gerinnungsweges relevant (31). Es wurde auch berichtet, daß Protein S an Rezeptoren glatter Muskelzellen bindet und somit auch an der Regulation der Zellproliferation beteiligt sein könnte (88).

Die physiologische Aufgabe des Protein S ist anhand kongenitaler Mangelzustände mit daraus resultierender familiärer Thrombophilie beschrieben worden (41); desweiteren wurden Studien veröffentlicht, die von einem erworbenen Protein S-Mangel bei Patienten in solchen Situationen berichten, die mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von thromboembolischen Ereignissen einhergehen, wie z.B. Schwangerschaft, Lupus erythematodes oder Einnahme oraler Kontrazeptiva (15,42).

Ceriello und Mitarbeiter fanden bei Typ I Diabetikern keine Unterschiede der Protein S-Gesamtkonzentration gegenüber nichtdiabetischen Patienten, während die Konzentration von freiem Protein S signifikant erniedrigt war. Da die Konzentration von C4-binding Protein gleichzeitig erhöht war, wurde daraus der Schluß gezogen, daß Typ 1 Diabetiker zur Gruppe der Patienten mit einem erworbenen Protein S-Mangel zu zählen sind, und daß die daraus resultierende erniedrigte Protein S-Aktivität auch mitverantwortlich für den hyperkoagulatorischen Zustand dieser Patienten sein könnte (31). Auch in unserer Studie waren die Werte von freiem Protein S gegenüber den Standardlabornormalwerten in allen drei untersuchten Patientengruppen signifikant erniedrigt, während sich die drei Patientengruppen in der Protein S-Gesamtkonzentration bezogen auf die Standardlabornormalwerte und untereinander nicht unterschieden. Ein Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von freiem bzw. Gesamt-Protein S zur Diabetesdauer konnte nicht nachgewiesen werden, was in der Literatur bestätigt wird (50). Der Vergleich von Protein S mit der metabolischen Situation der Patienten wird in der Literatur kontrovers diskutiert; während Schernthaner und

Mitarbeiter einen statistisch signifikanten Bezug von HbA1c zu freiem sowie Gesamt-Protein S feststellten (121), konnten El Khawand et al. bei signifikant erhöhter Protein S-Gesamtkonzentration von Diabetikern gegenüber Normalpersonen diese Korrelation zum HbA1c nicht herstellen (50). Diese Untersuchung läßt eine Tendenz in der Abhängigkeit von freier bzw. Gesamt-Protein S-Konzentration zum HbA1c erkennen, obwohl keine statistische Signifikanz erzielt wurde.

4.5. SCHLUBFOLGERUNG

Die diabetischen Gefäßschäden teilt man in diabetesspezifische Mikro- und unspezifische Makroangiopathien ein. Als Ursache dieser Gefäßveränderungen wird ein präthrombotischer bzw. hyperkoagulatorischer Zustand der betroffenen Patienten angenommen, der Folge zahlreicher Veränderungen von plasmatischer Gerinnung, Fibrinolyse, Endothel- und Thrombozytenfunktion ist. Eine statistisch signifikante Abhängigkeit zwischen thrombozytären, plasmatischen sowie endothelialen Aktivierungsmarkern und der Krankheitsdauer bei Patienten mit Typ I Diabetes mellitus konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden, obwohl einige Tendenzen diesbezüglich erkennbar waren. Die Thrombozyten zeigen in allen drei untersuchten Patientengruppen eine signifikante Erhöhung ihrer Aktivierungsparameter gegenüber Normalpersonen, wobei die Patienten mit geringerer Krankheitsdauer (Gruppe 1) tendenziell die höchsten Werte zeigten; dies könnte einerseits dafür sprechen, daß eine erhöhte Reaktivität der Thrombozyten den manifesten Gefäßalterationen vorausgeht, andererseits muß aber auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß aktivierte Thrombozyten von Patienten mit längerer Krankheitsdauer (Gruppe 2 und 3) schnell an atherosklerotische Läsionen gebunden werden und so im zirkulierenden Blut nicht mehr nachzuweisen sind. Thrombomodulin als Marker für Endotheldysfunktionen zeigte bei Patienten mit geringer Krankheitsdauer (Gruppe 1) die niedrigsten Werte, während bei Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als 10 Jahren (Gruppe 2 und 3) höhere Werte gemessen wurden, was tendenziell den Anstieg dieses Parameters mit der Krankheitsdauer belegt, und somit als Nachweis für die Genese von Gefäßschäden dienen kann. Auch bei den plasmatischen Gerinnungsfaktoren bzw. Inhibitoren zeigten keine Veränderungen in Beziehung zur Diabetesdauer. Die Konzentrationen von freiem Protein S waren bei allen drei untersuchten Patientengruppen signifikant gegenüber Normalwerten erniedrigt, da aber kein Bezug zur Krankheitsdauer festgestellt wurde, kann dieser Parameter lediglich als Hinweis auf eine Minderung des antikoagulatorischen

Potentials der Patienten gedeutet werden. Beziehungen zwischen den gemessenen Parametern und HbA1c- bzw. Blutzuckerwerten der Patienten konnten nur für die freie und Gesamt-Protein S-Konzentration tendentiell beobachtet werden, sodaß eine Korrelation zur metabolischen Situation dieser Patienten nicht nachgewiesen werden konnte. Die Anzahl aktivierter Thrombozyten ist im Frühstadium der Erkrankung höher als im weiteren Verlauf und kann als erster Hinweis für die Entwicklung von Gefäßschäden gesehen werden, während eine Endotheldysfunktion verstärkt bei längerer Diabetesdauer vorliegt und somit der Manifestation der Gefäßschäden unmittelbar vorausgeht. Darüber hinaus zeigt die niedrige Konzentration von freiem Protein S eine Abschwächung des Inhibitorpotentials an. Die routinemäßige Verwendung der untersuchten Parameter als Indikatoren für die Entwicklung, Manifestation und Progredienz von Gefäßalterationen scheint nach den Ergebnissen dieser Studie nicht indiziert. Die Interpretation unserer Ergebnisse in Bezug auf Konsequenzen in Prävention bzw. Behandlung der Gefäßschäden bei Diabetes mellitus bedarf weiterer Klärung.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Veränderungen von plasmatischer Gerinnung, Fibrinolysesystem, Endothel- und Thrombozytenfunktion werden mit als Ursache für die Entstehung diabetischer Gefäßalterationen angesehen. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluß der Krankheitsdauer auf das Gerinnungssystem bei 31 Patienten mit Typ I Diabetes mellitus untersucht. Das Patientenkollektiv wurde entsprechend der Krankheitsdauer drei Gruppen zugeteilt. In Gruppe 1 (n = 11) wurden Patienten mit einer Krankheitsdauer von weniger als 10 Jahren, in Gruppe 2 (n = 9) Patienten mit einer Krankheitsdauer zwischen 10 und 20 Jahren und in Gruppe 3 (n = 11) Patienten mit einer Krankheitsdauer von mehr als 20 Jahren untersucht. Die Thrombozytenaktivierung wurde mittels Durchflußzytometrie und der Bestimmung von Plättchenfaktor 4 (PF 4) untersucht. Für die Durchflußzytometrie wurden die monoklonalen, fluoreszierenden Antikörper CD 62 und CD 42b, 1%ige Paraformaldehydlösung und ein Phosphatpuffer verwendet. Sowohl die Expression des Granulamembranproteins 140 (GMP-140) als auch die des Glykoproteins 1b (GP1b) wurden innerhalb von 24 Stunden nach Blutentnahme gemessen. Parameter der Blutgerinnung und der Endothelfunktion wurden durch Standardlaborverfahren unter Anwendung von enzymimmunologischen Tests bestimmt.

Eine Beziehung zur Diabetesdauer konnte tendentiell für die Thrombozytenaktivierung und Thrombomodulin als Marker für Endotheldysfunktionen nachgewiesen werden, wobei Patienten der Gruppe 1 (Diabetesdauer < 10 Jahre) die stärkste Thrombozytenaktivierung im Vergleich der drei untersuchten Patientengruppen, und Patienten der Gruppen 2 und 3 (Diabetesdauer zwischen 10 und 20 Jahren bzw. > 20 Jahre) stärker erhöhte Thrombomodulinwerte als die Patienten der Gruppe 1 zeigten. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß die verstärkte Thrombozytenaktivierung im Frühstadium der Erkrankung als erster Hinweis für die Entstehung von Gefäßalterationen dienen kann, und eine verstärkte Endotheldysfunktion erst im weiteren Verlauf der Erkrankung auftritt und somit den manifesten Gefäßschäden unmittelbar vorausgeht. Korrelationen der bestimmten Parameter zu HbA1c- und Blutzuckerwerten konnte lediglich für die freie und Gesamt-Protein S-Konzentration tendentiell nachgewiesen werden, sodaß eine Abhängigkeit von der metabolischen Situation der Patienten nicht gezeigt werden konnte. Für alle Parameter der Blutgerinnung, der Fibrinolyse, der Endothel- und Thrombozytenfunktion konnte kein statistisch signifikanter Bezug zur Diabetesdauer hergestellt werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ABRAMS CHS, ELLISON N, BUDZINSKY AZ, SHATTIL SJ: Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood* 75:128-138, 1990.
2. ABRAMS CHS, SHATTIL SJ: Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Haemost* 65:467-473, 1991.
3. ALMER LO, PANDOLFI M, NILSSON IM: Diabetic retinopathy and the fibrinolytic system. *Diabetes* 24:529-534, 1985.
4. ARONSON DL, STEVAN L, BALL AP, FRANZA BR JR, FINLAYSON JS: Generation of the combined prothrombin activation peptide (F1,2) during the clotting of blood and plasma. *J Clin Invest* 60:1410-1418, 1977.
5. AULT KA, MITCHELL J: Analysis of platelets by flow cytometry. *Methods Cell Biol* 42:275-294, 1994.
6. BANERJEE RN, SAHNI AL, KUMAR V, ARYA M: Antithrombin III deficiency in maturity onset diabetes mellitus and atherosclerosis. *Thromb Diath Haemorrh* 31:339-345, 1974.
7. BANGA JD, SIXMA JJ: Diabetes mellitus, vascular disease and thrombosis. *Clin Haematol* 15:465-485, 1986.
8. BAUER KA, ROSEMBERG RD: The pathophysiology of the prethrombotic state in humans: Insights gained from studies using markers of hemostatic system activation. *Blood* 70:343-350, 1987.
9. BAUMGARTNER HR, SAKARIASSEN KS: Factors controlling thrombus formation on arterial lesions. *Ann N Y Acad Sci*:162-177, 1987.
10. BECKER RC, TRACY RP, BOVILL EG, MANN KG, AULT K: The clinical use of flow cytometry for assessing platelet activation in acute coronary syndromes. *Coron Artery Dis* 5:339-345, 1994.
11. BEER JH: Plättchenrezeptoren: Nomenklatur - Struktur - Funktion 1. Teil. *Schweiz Med Wochenschr* 122:1249-1263, 1992.
12. BEER JH: Plättchenrezeptoren: Nomenklatur - Struktur - Funktion 2. Teil. *Schweiz Med Wochenschr* 122:1287-1304, 1992.

13. BERNDT MC, FOURNIER DJ, CASTALDI PA: Bernard-Soulier syndrome. *Baillieres Clin Haematol* 2:585-604, 1989.
14. BIZZOZERO J: Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Arch Pathol Anat*, Bd. XC., Hft. 2:261-332, 1881.
15. BOERGER LM, MORRIS PC, THURNAN GR, ESMON CT: Oral contraceptives and gender affect protein S status. *Blood* 69:692-694, 1987.
16. BOFFA MC, KAROCHKINE M, BERARD M: Plasma Thrombomodulin as a marker of endothelial damage. *Nouv Rev Fr Hematol* 33:529-530, 1991.
17. BÖHRER H, BÖTTIGER BW, HAUBMANN R, NAWROTH PP, MOTSCH J, MARTIN E: Thrombomodulin als Endothelzellmarker bei herzchirurgischen Patienten. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 30:417-419, 1995.
18. BORN G, CROSS M: Aggregation of blood platelets. *J Physiol* 168:167-185, 1991.
19. BORSEY DQ, DAWES J, FRASER DM, PROWSE CV, ELTON RA, CLARKE BF: Plasma beta -thromboglobulin in diabetes mellitus. *Diabetologia* 18:353-357, 1980.
20. BOTTERMANN P: Diabetes mellitus. In: Classen M, Diehl V, Kochsiek K (eds): *Innere Medizin*, Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 2. Auflage, S. 779, 1993.
21. BRANSOME ED: Financing the care of diabetes mellitus in the U.S.. *Diabetes Care* 15:1-5, 1992.
22. BREDDIN HK, KRYZWANEK HJ, ALTHOFF P, KIRCHMAIER CM, ROSAK C, SCHEPPING M, WIECHERT W, ZIEMEN M, SCHÖFFLING K, ÜBERLA K: Spontaneous platelet activation and coagulation parameters as risk factors for arterial occlusions in diabetes. Results of the PARD-study. *Int Angiol* 5:181-195, 1986.
23. BURROWS AW, CHAVIN SI, HOCKADAY TDR: Plasma-thromboglobulin concentrations in diabetes mellitus. *Lancet* 2/4:235-237, 1978.
24. CAHILL MR, MACEY MG, NEWLAND AC: Correlation of GP 53 and P-selectin expression in myeloproliferative disorders and normal controls. *Blood Coagul Fibrinolysis* 7:169-171, 1996.

-
25. CARMASSI F, MORALE M, PUC CETTI R, DE NEGRI F, MONZANI F, NAVALESI R, MARIANI G: Coagulation and fibrinolytic system impairment in insulin dependent diabetes mellitus. *Thromb Res* 67:643-654, 1992.
 26. CERIELLO A, QUATRARO A, MARCHI E, BARBANTI M, DELLO RUSSO P, LEFEBVRE P: The role of hyperglycemia-induced alterations of antithrombin III and factor X activation in the thrombin hyperactivity of diabetes mellitus. *Diabet Med* 7:343-348, 1990.
 27. CERIELLO A, GIUGLIANO D, QUATRARO A, STANTE A, DELLO RUSSO P, D'ONOFRIO F: Induced hyperglycemia alters antithrombin III activity but not its plasma concentration in healthy normal subjects. *Diabetes* 36:320-323, 1987.
 28. CERIELLO A, DELLO RUSSO P, ZUCCOTTI C, FLORIO A, NAZZARO S, PIETRANTUONO C, ROSATO GB: Decreased antithrombin III activity in diabetes may be due to non-enzymatic glycosylation. *Thromb Haemost* 50:633-634, 1983.
 29. CERIELLO A, MARCHI E, BARBANTI M, MILANI MR, GIUGLIANO D, QUATRARO A, LEFEBVRE P: Non-enzymatic glycation reduces heparin cofactor II antithrombin activity. *Diabetologia* 33:205-207, 1990.
 30. CERIELLO A, GIACOMELLO R, COLATUTTO A, TABOGA C, GONANO F: Increased prothrombin fragment 1 + 2 in type 1 diabetic patients. *Haemostasis* 22:50-51, 1992.
 31. CERIELLO A, GIUGLIANO Q, MARCHI E, BARBANTI M, LEFEBVRE P: Possible role for increased C4b-binding protein level in acquired protein S deficiency in type 1 diabetes. *Diabetes* 39:447-449, 1990.
 32. CERIELLO A, TABOGA C, GIACOMELLO R, FALLETI E, DE STASIO G, MOTZ E, LIZZIO S, GONANO F, BARTOLI E: Fibrinogen plasma levels as a marker of thrombin activation in diabetes. *Diabetes* 43:430-432, 1994.
 33. CERIELLO A: Coagulation activation in diabetes mellitus: The role of hyperglycaemia and therapeutic prospects. *Diabetologia* 36:1119-1125, 1993.
 34. CERIELLO A: Fibrinogen and diabetes mellitus: is it time for intervention trials?. *Diabetologia* 40:731-734, 1997.

35. CHO NH, BECKER D, DORMAN JS, WOLFSON S, KULLER LH, DRASH AL, FOLLANSBEE WF, KELSEY SF, ORCHAD TJ: Spontaneous whole blood platelet aggregation in insulin-dependent diabetes mellitus: An evaluation in an epidemiologic study. *Thromb Haemost* 61:127-130, 1989.
36. TEFAMARIAM B, JAKUBOWSKI JA, COHEN RA: Contraction of diabetic rabbit aorta caused by endothelium-derived PGH₂-TxA₂. *Am J Physiol* Nov:257, 1989.
37. COLWELL JA, LOPES-VIRELLA MF, HALUSHKA PV: Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Diabetes Care* 4:121-133, 1981.
38. COLWELL JA, LOPES-VIRELLA MF: A review of the development of large-vessel disease in diabetes mellitus. *Am J Med* 85:113-118, 1988.
39. COLWELL JA, WINOCOUR ED, LOPEZ-VIRELLA E: New concepts about the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Scand J Haematol* 27:65-91, 1990.
40. COMP PC, DORAY D, PATTON D, ESMON CT: An abnormal plasma distribution of protein S occurs in functional protein S deficiency. *Blood* 67:504-508, 1986.
41. COMP PC, NIXON RR, COOPER MR, ESMON TC: Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 74:2082-2088, 1984.
42. COMP PC, VIGANO S, D'ANGELO A, THURNAN GR, KAUFMAN C, ESMON CT: Acquired protein S deficiency occurs in pregnancy, nephrotic syndrome and acute systemic lupus erythematosus. *Blood* 66:1279A, 1985.
43. CORASH L, CHEN HY, LEVIN J, BAKER G, LU H, MOK Y: Regulation of thrombopoiesis: effects of the degree of thrombocytopenia on megakaryocyte ploidy and platelet volume. *Blood* 70:177-185, 1987.
44. CORASH L: Measurement of platelet activation by fluorescence-activated flow-cytometry. *Blood Cells* 16:97-108, 1990.
45. DAHLBÄCK B: Purification of human C4b-binding protein and formation of its complex with vitamin K dependent protein S. *J Biochem* 209:847-856, 1983.
46. DE FOUWNS NS, HAVERKATE F, BERTINA RM, KOOPMA T, VAN WIJNGAARDEN A, VON HINSBERGH VW: The cofactor role of protein S in the acceleration of whole blood clot lysis. *Blood* 67:1192-1196, 1986.

47. DECKERT T, FELDT-RASMUSSEN B, BORCH-JOHNSEN K, JENSEN T, KOFOED-ENEVOLDSEN A: Albuminuria reflects widespread vascular damage: The steno hypothesis. *Diabetologia* 32:219-226, 1989.
48. DI MINNO G, THIAGARAJAN P, PERUSSIA B, MARTINEZ J, SHAPIRO S, TRINCHIERI G, MURPHY S: Exposure of platelet fibrinogen-binding sites by collagen, arachidonic acid, and ADP: Inhibition by a monoclonal antibody to the glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 61:140-148, 1983.
49. DITTMAN WA, MAJERUS PW: Structure and function of thrombomodulin: A natural anticoagulant. *Blood* 75:329-336, 1990.
50. EL KHAWAND, JAMART, DONCKIER, LAVENNE, MORIAU, BUYSSCHAERT: Hemostasis variables in type 1 diabetic patients without demonstrable vascular complications. *Diabetes Care* 16:1137-1145, 1993.
51. ESMON CT: The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 264:4743-4746, 1989.
52. ESMON NL, OWEN WG, ESMON CT: Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalysed activation of protein C. *J Biol Chem* 257:859-864, 1982.
53. FILES JC, MALPASS TW, YEE EK, RITCHIE JL, HARKER LA: Studies of human platelet α -granule release in vivo. *Blood* 58:607-618, 1981.
54. FITZGERALD DJ, ROY L, CATELLA F, FITZGERALD GA: Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med* 315:983-989, 1986.
55. FOLSOM AR, WU KK, DAVIS CE, CONLAN MG, SORLIE PD, SZKLO M: Population correlates of plasma fibrinogen and factor VII, putative cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* 91:191-205, 1991.
56. FRAZIER WA: Thrombospondin: a modular adhesive glycoprotein of platelets and nucleated cells. *J Cell Biol* 105:625-632, 1987.
57. FRITSCHI J, CHRISTE M, LÄMMLER B, MARBET GA, BERGER W, DUCKERT F: Platelet aggregation, β -thromboglobulin and platelet factor 4 in diabetes mellitus and in patients with vasculopathy. *Thromb Haemost* 52/3:236-239, 1984.
58. FRITSMA G, ENGELMANN G, YOUSUF M: Control mechanism in platelet activation. *Am J Med Tech* 47:813-817, 1981.

-
59. GANDA OP, ARKIN CF: Hyperfibrinogenemia: An important risk factor for vascular complications in diabetes. *Diabetes Care* 15:1245-1250, 1992.
 60. GARCIA-FRADE LJ, DE LA CALLE H, ALAVA I, NAVARRO LJ, CREIGHTON LJ, GAFFNEY PJ: Diabetes mellitus as a hypercoaguable state: Is there a relationship with fibrin fragments and vascular damage. *Thromb Res* 47:533-540, 1987.
 61. GREEN F, HUMPHRIES S: Control of plasma fibrinogen levels. *Baillieres Clin Haematol* 2:945-957, 1989.
 62. GRUDEN G, BAZZAN M, STELLA S, PAGANO G, PILERI A, CAVALLO-PERIN P: Microalbuminuria in insulin-dependent diabetes is associated with high levels of prothrombin fragment 1+2. *Thromb Res* 72:541-546, 1993.
 63. GUILLAUSSEAU PJ, DUPUY E, BRYCKAERT MC, TIMSIT J, CHANSON P, TOBELEM G, CAEN JP, LUBETSKI J: Platelet-derived growth factor (PDGF) in type 1 diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 19:172-175, 1989.
 64. HAITAS B, BARNES AJ, CEDERHOLM-WILLIAMS SA, MOORE J, SHOGRY MEC, TURNER RC: Abnormal endothelial release of fibrinolytic activity and fibrinogen in diabetic microangiopathy. *Diabetologia* 27:493-496, 1984.
 65. HAMBURGER STA, MCEVER RP: GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood* 75:550-554, 1990.
 66. HARKER LA, MALPASS TW, BRANSON HE, HESSEL EA, SLITCHER SJ: Mechanism of abnormal bleeding in patients undergoing cardiopulmonary bypass: Acquired transient platelet dysfunction associated with selective α -granule release. *Blood* 56:824, 1980.
 67. HAWIGER J, KLOCZEWIAK M, TIMMONS S: Platelet receptor mechanism for adhesive macromolecules. In: Oates JA, Hawiger J, Ross R (eds): *Interaction of platelets with the vessel wall*. American Physiological Society, Bethesda, MD:1-20, 1985.
 68. HERGESELL O, ANDRASSY K, GEBERTH S, GABATH S, NAWROTH PP: Plasma thrombomodulin levels are dependent on renal function. *Thromb Res* 72:455-458, 1993.
 69. HOLMSEN H: Classification and possible mechanisms of activation of drugs that inhibit platelet aggregation. *Semin Hematol* 8:50-80, 1976.

-
70. HOLMSEN H: Significance of testing platelet functions in vitro. *Eur J Clin Invest* 24:3-8, 1994.
 71. HOURDILLE P, HEILMANN E, COMBRIE R, WINCKLER J, CLEMETSON KJ, NURDEN AT: Thrombin induces a rapid redistribution of glycoprotein 1b-IX complexes within the membrane systems of activated human platelets. *Blood* 76:1503-1513, 1990.
 72. HSU-LIN SC, BERMAN CL, FURIE BC, AUGUST D, FURIE B: A platelet membrane protein expressed during platelet activation. *J Biol Chem* 259:9121-9126, 1984.
 73. HUSZKA M, KAPLAR M, REJTO L, TORNAI I, PALATKA K, LASZLO P, UDVARDY M: The association of reduced endothelium derived relaxing factor-NO production with endothelial damage and increased in vivo platelet activation in patients with diabetes mellitus. *Thromb Res* 86:173-180, 1997.
 74. INOUE T, HOSHI K, FUJITO T, SAKAI Y, MOROOKA S, SOHMA R: Early detection of platelet activation after coronary angioplasty. *Coron Artery Dis* 7:529-534, 1996.
 75. ISHIBASHI T, TANAKA K, TANAGUSHI Y: Platelet aggregation and coagulation in the pathogenesis of diabetic retinopathy in rats. *Diabetes* 30:601-606, 1981.
 76. ISHII M, UCHIYAMA H, KAZAMA M: Soluble thrombomodulin antigen in conditioned medium is increased by damage of endothelial cells. *Thromb Haemost* 65:618-623, 1991.
 77. IWASHIMA Y, SATO T, WATANABE K, OOSHIMA E, HIRAISHI S, ISHII A, KAZAMA M, MAKINO I: Elevation of plasma thrombomodulin level in diabetic patients with early diabetic nephropathy. *Diabetes* 39:983-988, 1990.
 78. JACOBS J, SENA M, FOX N: The cost of hospitalization for the late complications of diabetes in the United States. *Diabet Med* 8:523-529, 1990.
 79. JOHNSTON GI, COOK RG, MCEVER RP: Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: Sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell* 56:1033-1044, 1989.
 80. JOHNSTON GI, PICKETT EB, MCEVER RP, GEORGE JN: Heterogeneity of platelet secretion in response to thrombin demonstrated by fluorescence flow cytometry. *Blood* 69:1401-1403, 1987.

81. JONES RL, PETERSON CM: The fluid phase of coagulation and the accelerated atherosclerosis of diabetes mellitus. *Diabetes* 30:33-38, 1981.
82. JUDE B, FONTAINE P: Modifications of monocyte procoagulant activity in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost* 17:445-447, 1991.
83. KAPLAN KL, NOSSEL HL, DRILLINGS M, LESZNIK G: Radioimmunoassay of platelet factor and β -thromboglobulin: Development and application to studies of platelet release in relation to fibrinopeptide A generation. *Br J Haematol* 39:129-146, 1978.
84. KERRY PJ, CURTIS AD: Standardization of β -thromboglobulin and platelet factor 4: A collaborative study to establish international standards for β -TG and PF 4. *Thromb Haemost* 53:51-55, 1985.
85. KESTIN AS, VALERI CR, KHURI SF, LOSCALZO J, ELLIS PA, MACGREGOR H, BIRJINIUK V, OUIMET H, PASCHE B, NELSON MJ, BENOIT SE, RODINO LJ, BARNARD MR, MICHELSON AD: The platelet function defect of cardiopulmonary bypass. *Blood* 82:107-117, 1993
86. KNÖBL P, SCHERNTHANER G, SCHNACK C, PIETSCHMANN P, GRIESMACHER A, PRAGER R, MÜLLER M: Thrombogenic factors are related to urinary albumin excretion rate in type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 36:1045-1050, 1993.
87. KWAAN HC: Changes in blood coagulation, platelet function, and plasminogen-plasmin system in diabetes. *Diabetes* 41:32-35, 1992.
88. LANE DA, MANUCCI PM, BAUER KA, BERTINA M, BOCHKOV NP, BOULYJENKOV V, CHANDY DAHLBÄCK B, GINTER EK, MILETICH JP, ROSENDAAL FR, SELIGSOHN U: Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost* 76:651-662, 1996.
89. LARSEN E, CELI A, GILBERT GE, FURIE BC, ERBAN JK, BONFANU R, WAGNER DD, FURIE B: PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 59:305-312, 1989.
90. LARSEN E, PALABRICA T, SAJER S, GILBERT GE, WAGNER DD, FURIE BC, FURIE B: PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate. *Cell* 63:467-474, 1990.

-
91. LECHLER E: Hämorrhagische Diathesen. In Classen M, Diehl V, Kochsiek K (eds): *Innere Medizin*, Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 2. Auflage, S.220-246, 1993.
 92. LEURS PB, VAN OERLE R, WOLFFENBUTTEL BHR, HAMULYAK K: Increased tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and coagulation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Thromb Haemost* 77:472-476, 1997.
 93. LORENZI M, CAGLIERO E: Pathobiology of endothelial and other vascular cells in diabetes mellitus. *Diabetes* 40:653-659, 1991.
 94. LOSCALZO J, MELNICK B, HARDIN RI: Interactions of platelet factor 4 and the glycosaminoglycans. *Arch Biochem Biophys* 240:446-455, 1985.
 95. MAIELLO M, BOERI D, BONADONNA R, ODETTI P, SACARELLO A: Platelet and clotting activities after cold stress in diabetic patients. *Thromb Res* 50:885-894, 1988.
 96. MARONGIU F, CONTI M, MAMELI G, SORANO GG, COSSU E, CIRILLO R, BALESTRIERI A: Is the imbalance between thrombin and plasmin activity in diabetes related to the behaviour of antiplasmin activity?. *Thromb Res* 58:91-99, 1990.
 97. MATSUDA T, MORISHITA E, JOKAJI H, ASAKURA H, SAITO M, YOSHIDA T, TAKEMOTO K: Mechanism on disorders of coagulation and fibrinolysis in diabetes. *Diabetes* 45:109-110, 1996.
 98. MAYFIELD R, HALUSHKA P, WOHLTMANN H, LOPES-VIRELLA M, CHAMBERS J, LOADHOLT C, COLWELL J: Platelet function during continuous insulin infusion treatment in insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes* 34:1127-1133, 1985.
 99. MCEVER RP, MARTIN NM: A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem* 259:9799-9804, 1984.
 100. MCEVER RP: Properties of GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium. *Blood Cells* 16:73-83, 1990.
 101. MCEVER RP: The clinical significance of platelet membrane glycoproteins. *Hematol Oncol Clin North Am* 4:87-101, 1990.
 102. METZELAAR MJ, SIXMA JJ, NIEUWENHUIS HK: Detection of platelet activation using activation specific monoclonal antibodies. *Blood Cells* 16:85-96, 1990.

-
103. MICHELSON AD, BARNARD MR: Plasmin-induced redistribution of platelet glycoprotein 1b. *Blood* 76:2005-2010, 1990.
 104. MICHELSON AD, BENOIT SE, KROLL MH, LI JM, ROHRER MJ, KESTIN AS, BARNARD MR: The activation-induced decrease in the platelet surface expression of the glycoprotein 1b-IX complex is reversible. *Blood* 83:3562-3573, 1994.
 105. MICHELSON AD: Flow cytometry: A clinical test of platelet function. *Blood* 87:4925-4936, 1996.
 106. MICHELSON AD: Platelet activation by thrombin can be directly measured in whole blood through the use of the peptide GPRP and flow cytometry: methods and clinical applications. *Blood Coagul Fibrinolysis* 5:121-131, 1994.
 107. MICHELSON AD: Thrombin-induced down-regulation of the platelet membrane glycoprotein 1b-IX complex. *Semin Thromb Hemost* 18:18-27, 1992.
 108. MIZUNO K, SATOMURA K, MIYAMOTO A, ARAKAWA K, SHIBUYA T, TSUNENORI A, KURITA A, NAKAMURA H, AMBROSE J: Angioscopic evaluation of coronary-artery thrombin in acute coronary syndromes. *New Engl J Med* 326:287-291, 1992.
 109. MORALE M, DE NEGRI F, CARMASSI F: Fibrin(ogen) and diabetes mellitus: don't forget fibrinolysis. *Diabetologia* 40:735-737, 1997.
 110. OSTERMANN H, VAN DE LOO J: Factors of the hemostatic system in diabetic patients-a survey of controlled studies. *Haemostasis* 16:386-416, 1986.
 111. PACKHAM MA: Methods for detection of hypersensitive platelets. *Thromb Haemost* 40:175-195, 1978.
 112. PARKER RI, GRALNICK HR: Identification of platelet glycoprotein IIb/IIIa as the major binding site for released platelet-von Willebrand factor. *Blood* 68:732-736, 1986.
 113. PRESTON FE, WARD JD, MARCOLA BH, PORTER NR, TIMPERLEY WR: Elevated β -thromboglobulin levels and circulating platelet aggregates in diabetic microangiopathy. *Lancet*:238-239, 1978.

114. RABIE MJ, BLASHILL A, FURIE B, FURIE BC: Prothrombin fragment 1.2.3, a major product of prothrombin activation in human plasma. *J Biol Chem* 261:13210-13215, 1986.
115. RODGERS RPC, LEVIN J: A critical reappraisal of the bleeding time. *Thromb Haemost* 16:1, 1991.
116. RÖSEN P, TSCHÖPE D: Chronische Hyperglykämie als Ursache endothelialer Dysfunktion im Diabetes. *Berichte der ÖGKC* 14:124-131, 1991.
117. RUF A, MORGENSTERN E: Ultrastructural aspects of platelet adhesion on subendothelial structures. *Semin Thromb Hemost* 21:119-122, 1995.
118. SADLER JE, LENTZ STR, SHEEHAN JP, TSIANG M, WU Q: Structure-function relationships of the thrombin-thrombomodulin interaction. *Haemostasis* 23:183-193, 1993.
119. SALEM HH: The natural anticoagulants. *Clin Haematol* 15:371, 1986.
120. SCHARF R, HARKER L: Thrombosis and atherosclerosis: Regulatory role of interactions among blood components and endothelium. *Blood* 55:131-144, 1987.
121. SCHERNTHANER G, VUKOVICH T, KNÖBL P, HAY U, MÜLLER MM: The effect of near-normoglycaemic control on plasma levels of coagulation factor VII and the anticoagulant proteins C and S in insulin-dependent diabetic patients. *Br J Haematol* 73:356-359, 1989.
122. SCHMID-SCHÖNBEIN H: Physiologie und Pathophysiologie der Mikrozirkulation sowie Konsequenzen für deren pharmakologischen Behandlung. In: Messmer K, Fagrell B (eds): *Mikrozirkulation und arterielle Verschlusskrankheiten*. Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sydney:22-38, 1981.
123. SERNAU T, WILHELM C, SEYFERT U, GABATH S, HENKELS M, AMIRAL J, BERGIS KH, ZIEGLER WAHL P, NAWROTH PP: Thrombomodulin ist ein Marker für mikrovaskuläre, aber nicht für makrovaskuläre Endothelzellschädigung. *Vasa* 24:347-353, 1995.
124. SEVITT S: Platelets and foam cells in the evolution of atherosclerosis: Histological and immunohistological studies of human lesions. *Atherosclerosis* 61:107-115, 1986.

125. SHATTIL SJ, CUNNINGHAM N, HOXIE JA: Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 70:307-315, 1987.
126. SINZINGER H: Role of platelets in atherosclerosis. *Semin Thromb Hemostas* 12:124-133, 1986.
127. SIXMA JJ: Interaction of blood platelets with the vessel wall. In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD (eds): *Haemostasis and Thrombosis 1*, Third Edn. London: Churchill-Livingstone:259-285, 1994.
128. SKEAR RJ: Platelet Degranulation. In: Gordon A (ed): *Platelets in Biology and Pathology 2*. Amsterdam, Elsevier/North Holland:321, 1981.
129. SPODICK DH: Inflammation and the onset of myocardial infarction. *Ann Intern Med* 102:699-702, 1985.
130. STOUT RW: The endothelial cell in diabetes. In: Belfiore F (ed): *Front Diabetes*. Karger, Basel:116-124, 1987.
131. THOMPSON CB, JAKUBOWSKI JA, QUINN PG, DEYKIN D, VALERI CR: Platelet size as determinant of platelet function. *J Lab Clin Med* 101:205-213, 1983.
132. TSCHÖPE D, ESSER J, SCHWIPPERT B, RÖSEN P, KEHREL B, NIEUWENHUIS HK, GRIES FA: Large platelets circulate in an activated state in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemostas* 17:433-439, 1991.
133. TSCHÖPE D, OSTERMANN H, HÜBINGER A, ZIEGLER D, WIEFELS K, GRIES FA: Elevated platelet activation in type 1 diabetics with chronic complications under long term near normoglycemic control. *Haemostasis* 20:93-98, 1990.
134. TSCHÖPE D, RÖSEN P, GRIES FA: Increased platelet function as risk factor for diabetic microangiopathy. In: Spannuth E, G Pindur, E Wenzel (eds): *Thromboembolic Risk and Dysbalance of Haemostasis*. Schattauer, Stuttgart:1.22-1.30, 1989.
135. TSCHÖPE D, RÖSEN P, SCHWIPPERT B, GRIES FA: Platelets in diabetes: The role in the hemostatic regulation in atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost* 19:122-128, 1993.
136. TSCHÖPE D, RÖSEN P, SCHWIPPERT B, KEHREL B, SCHAUSEIL S, ESSER J, GRIES FA: Platelet analysis using flowcytometric procedures. *Platelets* 1/3:127-133, 1990.

-
137. TSCHÖPE D: The activated megacaryocyte-platelet-system in vascular disease: Focus on diabetes. *Semin Thromb Hemost* 21:152-160, 1995.
 138. TUSZINSKY GP, ROTHMAN VL, MURPHY A, SIEGLER K, KNUDSEN KA: Thrombospondin promotes platelet aggregation. *Blood* 72:109-115, 1988.
 139. UDVARDY M, TOROK I, RAK K: Plasma thromboxane and prostacycline metabolite ratio in atherosclerosis and diabetes mellitus. *Thromb Res* 47:479-484, 1987.
 140. VAGUE P, JUHAN-VAGUE I: Fibrinogen, fibrinolysis and diabetes mellitus: A comment. *Diabetologia* 40:738-740, 1997.
 141. VIRCHOW R: *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin*. Frankfurt, Meidiger Sohn:477, 1856.
 142. VOISIN PJ, ROUSSELLE D, STREIFF F, DEBRY G, STOLTZ JF, DROUIN P: Reduction of beta-thromboglobulin levels in diabetics controlled by artificial pancreas. *Metabolism* 32:138-141, 1983.
 143. VON RUECKER A, DICKERHOFF R, BIDLINGMAIER F: Bestimmung der Blutplättchenkonzentration mit Hilfe monoklonaler Antikörper (CD41a/CD42b/CD61). *Lab Med* 19:295-302, 1995.
 144. VUKOVICH TC, SCHERNTHANER G: Decreased protein C levels in patients with insulin-dependent type 1 diabetes mellitus. *Diabetes* 35:617-619, 1986.
 145. WALKER FJ: Regulation of activated protein C by a new protein. *J Biol Chem* 255:5521, 1980.
 146. WEKSLER BB: Platelets and the inflammatory response. *Clin Lab Med* 3:667, 1983.
 147. WENDEL-DRAKE JD, PLOW EF, KUNICKI TJ, WOODS VL, KELLER DM, GINSBERG MH: Localisation of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses. *Am J Pathol* 124:324-343, 1986.
 148. WIECZOREK I, PELL ACH, MCIVER B, MAACGREGOR IR, LUDLAM CA, FRIER BM: Coagulation and fibrinolytic system in type 1 diabetes: effects of venous occlusion and insulin-induced hypoglycaemia. *Clin Sci* 84:79-86, 1993.
 149. WOLFF R, PLOW EF, GINSBERG MH: Interaction of thrombospondin with resting and stimulated human platelets. *J Biol Chem* 261:6840-6846, 1986.

150. WU KK, HOAK JC: A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency. *Lancet* 19:924-926, 1974.
151. YAQOUB M, PATRICK AW, MCCELLAND P, STEVENSON A, MASON H, WHITE MC, BELL GM: Relationship between markers of endothelial dysfunction, oxidant injury and tubular damage in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Sci* 85:557-562, 1993.
152. YOKOYAMA H, MYRUP B, ROSSING P, OSTERGAARD PB: Increased tissue factor pathway inhibitor activity in IDDM patients with nephropathy. *Diabetes Care* 19:441-445, 1996.

7. TABELLEN

7.1. ALTER

Tab. 1: Alter

Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10 - 20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Alter [Jahre]	33,0 \pm 11,1	41,1 \pm 11,1	49,3 \pm 13,1

7.2. KRANKHEITSDAUER

Tab. 2: Krankheitsdauer

Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10 - 20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Krankheitsdauer [Jahre]	6,5 \pm 2,2	15,8 \pm 3,2	29,6 \pm 8,8

7.3. DATEN DER THROMBOZYTENAKTIVIERUNG

Tab. 3: GMP-140 [% d. N.], GP1b [AMFU] und PF-4 [IU/ml]

Mittelwerte \pm Standardabweichung; Normalwerte: GMP-140: $5 \pm 1,1$ % d. N.; PF-4: 0-5 IU/ml.

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10 - 20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
GMP-140 [% d. N.]	$8,9 \pm 6,3$	$4,8 \pm 3,3$	$4,7 \pm 1,9$
GP1b [AMFU]	$357,4 \pm 39,9$	$311,2 \pm 41,9$	$333,0 \pm 53,6$
PF-4 [IU/ml]	$140,9 \pm 65,8$	$105,3 \pm 72,0$	$112,4 \pm 50,1$

7.4. THROMBOMODULIN

Tab. 4: Thrombomodulin [ng/ml]

Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10 - 20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Thrombomodulin [ng/ml]	$30,2 \pm 15,8$	$40,6 \pm 19,9$	$34,9 \pm 12,8$

7.5. PARAMETER DER PLASMATISCHEN GERINNUNG

7.5.1. GERINNUNGSUNTERSUCHUNGEN

Tab. 5: Quick [% d. N.], TZ [s] und PTT [s]

Mittelwerte \pm Standardabweichung; Normalwerte: Quick: 70-130 % d. N.; TZ: < 21 s; PTT: 26-36 s.

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10 - 20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe3
Quick [% d. N.]	97,7 \pm 3,5	93,1 \pm 8,5	96,6 \pm 4,3
TZ [s]	17,1 \pm 1,1	17,6 \pm 1,5	17,1 \pm 1,2
PTT [s]	34,8 \pm 3,2	34,5 \pm 3,5	34,4 \pm 3,3

7.5.2. FIBRINOGEN

Tab. 6: Fibrinogen [g/l]

Mittelwerte \pm Standardabweichung; Normalwert: 1,8-3,5 g/l.

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10 - 20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Fibrinogen [g/l]	3,7 \pm 1,1	3,2 \pm 0,8	3,5 \pm 0,8

7.5.3. ANTITHROMBIN

Tab. 7: Antithrombin III [% d.N.]

Mittelwerte \pm Standardabweichung; Normalwert: 75-125 % d. N..

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10 - 20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
AT III [% d. N.]	106,0 \pm 27,2	94,1 \pm 16,8	102,6 \pm 35,9

7.5.4. PROTEIN S

Tab. 8: Freies Protein S [% d.PSges.] und Gesamt-Protein S [% d. N.]

Mittelwerte \pm Standardabweichung; Normalwerte: Freies Protein S: 30-45 % d.PSges.;

Gesamt-Protein S: 70-140 % d. N..

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10 - 20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Gesamt-ProteinS [%d.N.]	97,2 \pm 12,9	90,1 \pm 13,3	96,8 \pm 23,0
Freies Protein S [% d.PS ges.]	30,1 \pm 6,0	27,7 \pm 4,9	31,6 \pm 8,7

7.5.5. PROTHROMBINFRAGMENT F 1+2

Tab. 9: Prothrombinfragment F 1+2 [nmol/l]

Mittelwerte \pm Standardabweichung; Normalwert: 0,4-1,1 nmol/l.

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10 - 20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Prothrombinfragment F 1+2 [nmol/l]	26,6 \pm 48,5	3,5 \pm 5,1	5,3 \pm 8,6

7.6. LABORCHEMISCHE PARAMETER

7.6.1. BLUTZUCKER

Tab. 11: Blutzucker [mg/dl]

Mittelwert \pm Standardabweichung; Normalwert: 60-100 mg/dl.

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10 - 20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Blutzucker [mg/dl]	150,6 \pm 91,8	190,4 \pm 65,9	182,8 \pm 51,1

7.6.2. HbA1c

Tab. 12: HbA1c [% d. Ges.Hb]

Mittelwert \pm Standardabweichung; Normalwert: 4,2-5,9 % d. Ges.Hb.

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10 - 20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
HbA1c [% d. Ges.Hb]	8,9 \pm 2,3	7,5 \pm 0,7	8,1 \pm 1,4

7.6.3. THROMBOZYTEN

Tab. 13: Thrombozytenzahl [Tsd./mcl]

Mittelwert \pm Standardabweichung; Normalwert: 140-440 Tsd./mcl.

Gruppe 1: n = 11 (Diabetesdauer < 10 Jahre)

Gruppe 2: n = 9 (Diabetesdauer 10 - 20 Jahre)

Gruppe 3: n = 11 (Diabetesdauer > 20 Jahre)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Thrombozyten [Tsd./mcl]	242 \pm 58	259 \pm 47	240 \pm 57

8. ANHANG

8.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

β-TG	β-Thromboglobulin
AMFU	Arbitrary mean fluorescent Units
AT	Antithrombin
CD	Cluster of differentiation
d. N.	der Norm
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECGF	Endothelial cell growth factor
EDRF	Endothelial cell derived relaxation factor
FITC	Fluoreszin-Isothiozyanat
FS	Forward angle light scatter
g	Erdbeschleunigung
G	Gage
GMP	Granule membrane protein
GP	Glykoprotein
Hb	Hämoglobin
IDDM	Insulin dependent diabetes mellitus
Ig	Immunglobulin
mW	Milliwatt
n	Stichprobenumfang
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PADGEM	Platelet activation dependent granule external membrane
PBS	Phosphate-buffered-saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PF 4	Plättchenfaktor 4
PS	Protein S
PTT	partielle Thromboplastinzeit
SSC	Side angle light scatter
Suppl	Supplement
TZ	Thrombinzeit

Vol.	Volume
vWF	von Willebrand Faktor
W	Watt

8.2. DANKSAGUNG

An dieser Stelle danke ich allen, die mich während der Ausarbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Frau Prof. Dr. B. Kemkes-Matthes danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und ihre überaus großzügig gewährte Unterstützung bei der Durchführung, der wissenschaftlichen Betreuung und der Abfassung der Arbeit.

Herrn PD Dr. med. A.C. Matzdorff danke ich ganz herzlich für seine optimale Betreuung bis zur Fertigstellung meiner Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt den von mir untersuchten Patienten für ihre freundliche Mitarbeit. Bei Frau Dr. med. E. Mäser möchte ich mich bedanken für die gute Koordination zwischen den von ihr in der Diabetes-Ambulanz der Medizinischen Klinik 3 betreuten Patienten und der praktischen Durchführung meiner Arbeit. Auch Herrn PD Dr. med. H.-P. Hammes danke ich für die jederzeit gute Zusammenarbeit bei der praktischen und theoretischen Realisation dieser Arbeit.

Bei Frau Nees, Frau Kühnel und den übrigen Mitarbeiterinnen aus dem Gerinnungslabor, sowie bei den Mitarbeiterinnen des von Prof. Dr. med. R. Voss geleiteten Thrombozytenfunktionslabors bedanke ich mich.

Darüber hinaus danke ich Herrn Pabst und Herrn Dr. Bödecker vom Institut für Medizinische Informatik für die Beratung und Durchführung des statistischen Anteils der Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für den großen Rückhalt in den entscheidenden Phasen und bedanke mich bei Frau S. Urban für ihre besondere Unterstützung während der endgültigen Fertigstellung meiner Dissertation.

8.3. LEBENSLAUF

27.05.1970	geboren in Recklinghausen
1976-1980	Besuch der kath. Grundschule in Recklinghausen-Speckhorn
1980-1989	Besuch des Marie-Curie-Gymnasiums in Recklinghausen
1989	Abitur
Herbst 1989	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Giessen
Frühjahr 1992	Ärztliche Vorprüfung
Frühjahr 1993	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Frühjahr 1995	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Herbst 1995 bis Winter 1996	Absolvierung des Praktischen Jahres an der Justus-Liebig-Universität Giessen, dem Kreiskrankenhaus Giessen in Lich und dem Klinikum Wetzlar; dreimonatige Unterbrechung wegen Krankheit im Frühjahr/Sommer 1996
31.01.1997	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 1997 bis September 1999	Arzt im Praktikum und Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim
Oktober 1999 bis September 2000	Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesiologie des Kreiskrankenhauses Giessen in Lich
seit Oktober 2000	Assistenzarzt in der Abteilung Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin des St. Vincenz-Krankenhauses in Limburg