

**Aus der neurologischen Klinik und Poliklinik
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf**

Direktor Prof. Dr. med. C. Weiller

**Die Bedeutung des genetischen Polymorphismus
im Gerinnungssystem und in der Akut-Phase-Reaktion
bei Patienten mit ischämischem Schlaganfall**

Promotion

**zur Erlangen des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg**

vorgelegt von

Naoya Koseki

aus Chigasaki/Japan

Hamburg2005

Angenommen von dem Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuß, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuß: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuß: 3. Gutachter/in:

Für Collo (1987 - 2003)
Meinen Hund und guten Freund



Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 4 |
| 1.1 | Pathophysiologie des ischämischen Hirninfarktes | 4 |
| 1.1.1 | Die Penumbra | 5 |
| 1.2 | Akut-Phase-Reaktion | 5 |
| 1.3 | Akutbehandlung des ischämischen Hirninfarktes | 6 |
| 1.3.1 | Die moderne Behandlungsstrategie des frischen ischämischen Hirninfarktes | 7 |
| 1.3.2 | Primär- und Sekundärprävention | 7 |
| 1.4 | Genetische Polymorphismen der Akut-Phase-Proteine | 8 |
| 1.5 | Kasuistik | 8 |
| 1.5.1 | Der Fall „ED“ | 9 |
| 1.6 | Fibrinogen | 10 |
| 1.6.1 | Polymorphismen des Fibrinogens | 11 |
| 1.7 | GPIIb/IIIa-Komplex Fibrinogenrezeptor | 11 |
| 1.8 | Akut-Phase-Protein | 12 |
| 1.9 | Die Akutbehandlung des ischämischen Hirninfarktes in Zukunft | 13 |
| 1.10 | Das Ziel dieser Arbeit | 14 |
| 2 | Material und Methode | 15 |
| 2.1 | Puffer | 15 |
| 2.2 | DNA-Präparation | 15 |
| 2.3 | PCR | 16 |
| 2.3.1 | Standard-PCR | 16 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.3.2 | Multiplex-PCR | 17 |
| 2.3.3 | Mismatch-PCR | 18 |
| 2.4 | Verdau | 19 |
| 2.5 | Ethanol-fällung..... | 21 |
| 2.6 | Elektrophorese | 21 |
| 2.7 | Southern-Blot..... | 21 |
| 2.8 | Statistische Auswertung | 23 |
| 2.8.1 | Untersuchte Patienten | 23 |
| 2.8.2 | TOAST-Kriterien..... | 24 |
| 2.8.3 | Scandinavian Stroke Score (SSS)..... | 24 |
| 3 | Ergebnisse..... | 28 |
| 3.1 | PCR..... | 28 |
| 3.1.1 | Standard-PCR..... | 28 |
| 3.1.2 | Multiplex-PCR | 28 |
| 3.2 | Kasuistik..... | 30 |
| 3.3 | Genotypisierung von Patienten mit einem akuten ischämischen Schlaganfall..... | 32 |
| 3.3.1 | Untersuchte Patienten | 32 |
| 3.3.2 | Polymorphismus Fibrinogen -455 G/A..... | 33 |
| 3.3.3 | Polymorphismus GPIIb 2622 T/G (Ile 843 Ser)..... | 48 |
| 3.3.4 | Polymorphismus GPIIIa 196 T/C (Leu 33 Pro)..... | 57 |
| 3.3.5 | Polymorphismus Fibrinogen -854 G/A..... | 66 |
| 4 | Diskussion..... | 68 |
| 4.1 | Fibrinogen -455 G/A und Fibrinogen -854 G/A..... | 68 |

| | | |
|-----|---|-----------|
| 4.2 | GPIIb 2622 T/G (Ile 843 Ser) und GPIIIa 196 T/C (Leu 33 Pro)..... | 71 |
| 5 | Zusammenfassung | 74 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 75 |
| 7 | Abkürzungen | 84 |
| 8 | Danksagung | 86 |
| 9 | Lebenslauf | 87 |
| 10 | Erklärung | 88 |

1 Einleitung

Schlaganfälle sind die dritthäufigste (in Japan nach Krebserkrankungen die zweithäufigste) (Sugimoto T, 1999) Todesursache, ferner die führende Ursache dauernder Invalidität und medizin-ökonomisch betrachtet in westlichen Industrieländern die teuerste Krankheitsgruppe (Poeck K, 2001). Ischämische Infarkte sind die häufigste neurologische Krankheit überhaupt und liegen bei 80 % der Patienten dem Schlaganfall zugrunde (Maurice Victor, 2001). Es ist vorauszusagen, daß diese wichtige Krankheit durch die Überalterung der Gesellschaft weiterhin sowohl medizinisch als auch sozio-ökonomisch an Bedeutung zunehmen wird.

1.1 Pathophysiologie des ischämischen Hirninfarktes

Die ischämischen Hirninfarkte werden durch Durchblutungsstörungen im Hirngewebe verursacht. Obwohl das Gehirn nur 2 % des Körpergewichts ausmacht (Andre Parent, 1995), erhält es in körperlicher Ruhe ca. 15 % des gesamten Herzminutenvolumens (ca. 55 ml/100 g/ min) (Kety SS, 1948) und verbraucht etwa 20 % des gesamten Sauerstoffbedarfs des Körpers (ca. 3,3 ml/100 g/min) (Luft and Finkelstein, 1968). Da das Gehirn fast keine Energievorräte besitzt und nur kurzfristig in der Lage ist, den anaeroben Stoffwechselweg zu gehen, stellt es sich als das empfindlichste Gewebe für die Unterbrechung der Energie- und Sauerstoffzufuhr dar (Löffler G, 1997). Bei vollständigem Zirkulationsstop, z.B. bei einem Adams-Stokes-Anfall, treten areal-spezifische Funktionsausfall nach 5-10 Sekunden ein. Nach 4-5 Minuten kommt es zu den ersten Nekrosen an Ganglienzellen im betroffenen Gebiet. Einen Herzstillstand von 8-10 Minuten kann das Gehirn nicht überleben (Heiss, 1983; Siesjo, 1988). Ferner ist die Gefährdung von dem Ausmaß der Durchblutungsbeeinträchtigung abhängig. Während bei einem Unterschreiten der Ischämieschwelle (ca. 23 ml/100 g/ min) des lokalen Hirngewebes nur eine temporäre neurologische Funktionsstörung des Gehirns auftritt (Astrup, 1982; Astrup et al., 1977; Branston et al., 1974), wie es bei einer transitorischen ischämischen Attacke (TIA) der Fall ist, kann die zelluläre Integrität der Hirnzelle bei einem Unterschreiten der Infarktschwelle (ca. 12 ml/100 g/ min) nicht mehr aufrechterhalten werden (Heiss, 1983; Siesjo, 1988). ATP wird verbraucht und das Membranpotential bricht zusammen. Das extrazelluläre Kalium sowie das intrazelluläre Kalzium steigen und das

Milieu wird sauer (Vinken, 1972). Es kommt zu einem Gewebsuntergang, einem Hirninfarkt.

1.1.1 Die Penumbra

Bei einem Infarkt wird ein Gefälle der Durchblutung (ischämische Penumbra) angenommen, das sich von schweren Durchblutungsstörungen im Zentrum (Infarkt) bis zu grenzwertig durchbluteten, kollateralisierten Bereichen der peripheren Anteile erstreckt. Die Schäden innerhalb der Infarktzone sind irreparabel, wohingegen eine hohe Gefährdung des Gewebes der Penumbra vorliegt. Allerdings schreiten bei anhaltender Durchblutungsminde- rung die irreversiblen Läsionen in der Penumbra weiter fort. Der Pathomechanismus des Infarktes und der selektiven neuronalen Schädigung in der Periinfarktzone wurde oben bereits beschrieben, wobei die Korrelation zwischen der Dauer der Ischämie und dem Schädigungsgrad besonders betont wurde (Heiss, 1983; Nedergaard, 1988). Die Pathophysiologie in der Penumbra ist einzigartig. In diesem Areal ist die zelluläre Substratausnutzung, d.h. die Sauerstoff- und Glukoseentnahme aus dem Blut und der Metabolismus vermindert (Baron et al., 1984; Kuhl et al., 1980; Nedergaard, 1988), obwohl die Durchblutung wegen der Laktazidose autoregulatorisch gesteigert ist. Als Ursache der Zellschädigung werden Energiemangel, Exzitotoxizität, Lipolyse, die Formation freier Radikale und Kalziuminflux in die Zellen angesehen, was zuerst zum Verlust der elektrischen Aktivität führt und dann zum zellulären Zusammenbruch (Harris et al., 1981; Strong et al., 1983). Es kommt zu einer Gewebsnekrose, die sowohl eine lokale als auch eine systemische Entzündungsreaktion verursacht.

1.2 Akut-Phase-Reaktion

Auf eine lokale Entzündung reagiert der Organismus mit der Akut-Phase-Reaktion (APR), die erste Phase der systemischen Entzündungsreaktion. Der adäquate Reiz für die APR sind die Zytokine, Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) (Baumann and Gauldie, 1994), die von Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten in den geschädigten Gewebsteilen freigesetzt werden (Ali et al., 1997). Sie gelangen auf dem Blutweg zur Leber und lösen dort die Biosynthese der Akut-Phase-Proteine (APP) aus (Kushner, 1982; Steel and Whitehead, 1994), zu deren Hauptvertreter auch C-reaktives-Protein (CRP), Fibrinogen und α 1-Antichymotrypsin

gehören (Kushner et al., 1981). Den genannten Proteinen ist gemeinsam, daß ihre Konzentration innerhalb von 6-48 Stunden nach dem Auftreten einer lokalen Entzündungsreaktion im Organismus um ein Vielfaches zunimmt (Kushner et al., 1981). Der Sinn dieser Reaktion ist, die Entzündung zu lokalisieren und ihre Ausbreitung zu verhindern (Janeway CA, 1997). So vermindern die Proteinaseinhibitoren der Akut-Phase-Proteine, z.B. α 1-Antitrypsin und α 1-Antichymotrypsin, die Verminderung der Gewebsschädigungen durch freigesetzte Proteinasen (Rubin E, 1999). Ein Anstieg der Fibrinogenkonzentration erleichtert die Thrombusbildung und erschwert so die Ausbreitung eines Infektes (Blomback, 1996). Fibrinogen determiniert durch seine absolute Menge und asymmetrische Form zu einem großen Teil die Plasmaviskosität (Blann et al., 1998). Eine erhöhte Viskosität setzt den Widerstand in einem Gefäß herauf und verringert damit die Perfusion des Gewebes. Es wurde berichtet, daß die dopplersonographisch gemessene Fließgeschwindigkeit in den Arteriae cerebri mediae nach medikamentöser Senkung des Fibrinogens zunimmt (Izumi et al., 1996). So konnte z.B. gezeigt werden, daß eine Senkung des Fibrinogenspiegels nach Gabe von Ancrod im Tiermodell das Infarktvolumen vermindert. Dies wurde gemessen durch *multislice* T2-gewichtete Magnetresonanz-Tomographie und läßt eine Verbesserung der Mikrozirkulation vermuten (Elger et al., 1997).

Welchen Einfluß könnte diese Entzündungsreaktion des Organismus auf die von endgültigem Gewebsuntergang gefährdete Penumbra haben? Die Penumbra wird mikrozi-kulatorisch über Kollateralen blutversorgt (Nedergaard, 1988). Die systemische Entzündung beeinflusst die Mikrozirkulation in der Periinfarktzone durch eine Erhöhung der Plasmaviskosität (Blann et al., 1998) und durch eine Erleichterung der Thrombozytenaggregation ungünstig (Blomback, 1996; Grotta et al., 1982). Es wurde auch berichtet, daß das Ausmaß der Entzündung nach einem Schlaganfall mit der Prognose korreliert (Di Napoli et al., 2001a; Di Napoli et al., 2001b; Di Napoli et al., 2001c).

1.3 Akutbehandlung des ischämischen Hirninfarktes

Die aktuelle Therapie ischämischer Schlaganfälle hat das Ziel, die Schädigung des Gehirns minimal zu halten um damit eine Verbesserung der Langzeitprognose zu erreichen. Da Neurone nicht regenerieren können, ist es bei einer akuten Situation essentiell, weiteren Verschluß zu verhindern und eine ausreichende Perfusion in der ischämischen

Region zu sichern. Die Prävention ist jedoch allen Therapiemöglichkeiten überlegen und sollte auch weiter das primäre Ziel in der Behandlung der Schlaganfälle bleiben.

1.3.1 Die moderne Behandlungsstrategie des frischen ischämischen Hirninfarktes

Die Therapie eines Schlaganfalls besteht aus Akuttherapie und Primär- bzw. Sekundärprävention. Bei der Akuttherapie eines ischämischen Schlaganfalls basiert die Behandlung darauf, daß durch Lysetherapie mit rekombiniertem Gewebsplasminogen Aktivator (rt-PA) in einem Zeitfenster von 3 Stunden nach dem Beginn der klinischen Symptome das Spätergebnis verbessert werden kann (Marler et al., 2000; NINDS-rt-PA-Stroke-Study-Group, 2000). In den letzten Jahren hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, daß Schlaganfälle, genau wie Herzinfarkte, medizinische Notfälle sind. Ziel aller Sofortmaßnahmen bei Schlaganfallpatienten ist es, eine Stabilisierung und Normalisierung allgemeiner Körperfunktionen herbeizuführen und, falls sich therapeutische Konsequenzen absehen lassen, den Patienten in eine Klinik zu bringen, in der Diagnostik und spezielle Therapie durchgeführt werden können. So haben sich in den Kliniken Schlaganfallspezialstationen, so genannte *Strokeunits* etabliert, auf denen mit der Diagnostik und Therapie von Schlaganfällen besonders vertraute Neurologen, Internisten, Krankenschwestern, Logopäden und Krankengymnasten zusammenarbeiten und eine standardisierte Behandlung der Patienten durchführen. Dadurch kann man gegenüber einer normalen peripheren Station ein verbessertes Langzeitergebnis erreichen (Glader et al., 2001; Indredavik et al., 1999; Indredavik et al., 1997). Bei inkompletten, leichteren Schlaganfällen geht man davon aus, daß eine rechtzeitige Therapie und Prophylaxe die Penumbra retten und die Entwicklung eines schwereren Schlaganfalls verhindern kann (NINDS-rt-PA-Stroke-Study-Group, 2000). Die spezielle Behandlung richtet sich nach den Ursachen der Ischämie. Schwerpunkte sind Antikoagulation zur Vermeidung der Embolierезидивen und Progression einer Thrombusformation, Thrombozytenaggregationshemmer bei thromboembolischen Ursachen, osmotische Diuretika zur Hirnödembehandlung sowie Thrombolysetherapie zur möglichst raschen Rekanalisierung ver- schlossener Gefäße.

1.3.2 Primär- und Sekundärprävention

Zur Primär-, bzw. Sekundärprävention steht neben Behandlung und Ausschaltung der Risikofaktoren eine Reihe von Medikamenten zur Verfügung. Die Auswahl der Medi-

kamente sollte nicht nur nach klinischer Symptomatik, der Phase der Krankheit oder Preisen der Medikamente, sondern individuell angepaßt auch nach Verträglichkeit und Begleiterkrankungen gerichtet sein. So ersetzt man Hemmstoffe der Cyklooxygenase (z.B. Acetylsalizylsäure (ASS)/Aspirin[®]) nach thromboembolischen Infarkten unter ASS-Prophylaxe oder bei einer Unverträglichkeit durch P2Y1-ADP-Rezeptor-Antagonisten (z.B. Clopidogrel/Iscover[®]) (Urbano LA, 2004) oder bei Hochrisikopatienten durch Fibrinogenrezeptor GP IIb/IIIa-Antagonisten (z.B. Abciximab/Reopro[®]) (Sherman, 2003) als Thrombozytenaggregationshemmer. Intraindividuelle genetische Unterschiede werden zur Zeit in der Klinik noch kaum in die Urteilsfindung zur Wahl des am meisten geeigneten Medikaments einbezogen. Schon in der nahen Zukunft wird es mit Sicherheit unentbehrlich, daß man bei der Medikamentenauswahl neben den genauen pharmakokinetisch-pharmakodynamischen Eigenschaften auch die physiologisch-biochemischen Entstehungsmechanismen des Schlaganfalls und die individuellen Faktoren mitberücksichtigt, um die Prognose des Schlaganfallpatienten zu verbessern.

1.4 Genetische Polymorphismen der Akut-Phase-Proteine

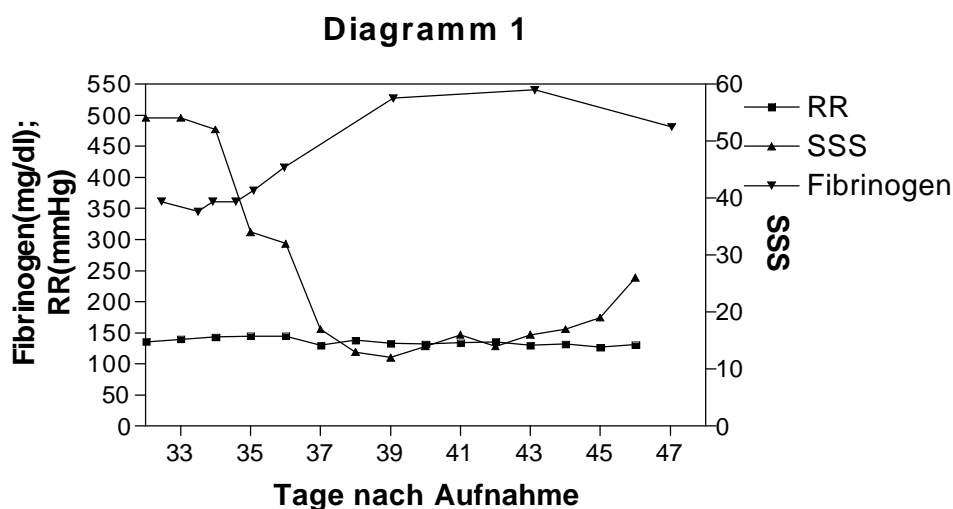
Polymorphismen und Mutationen von Genen der Akut-Phase-Reaktion und des Gerinnungssystems können in vielerlei Weise die Inzidenz des ischämischen Schlaganfalls und die Wahrscheinlichkeit eines erneuten Infarktes beeinflussen. Die Gabe eines für ein Individuum ungeeigneten Medikaments hat nicht nur einen geringeren Effekt, sondern birgt die Gefahr einer Schädigung durch Nebenwirkungen, hier zumeist Blutungskomplikationen. Es ist also von großer Bedeutung, das für den jeweiligen Patienten am meisten geeignete Medikament zu finden. So konnte z.B. gezeigt werden, daß die Primärprophylaxe gegen kardiovaskuläre Erkrankung mit ASS nur bei Individuen mit einer chronischen Erhöhung der Akut-Phase-Proteine nützlich ist (Ridker et al., 1997).

1.5 Kasuistik

Bei einem Fall im Universitäts-Krankenhaus Eppendorf kam man zu der Hypothese, daß der durch Fibrinogen vermittelte Mechanismus der Perfusionsminderung eine Schlüsselrolle in der Entstehung des Schlaganfalls haben und daher einen möglichen Angriffspunkt für medikamentöse Therapie darstellen könnte.

1.5.1 Der Fall „ED“

Die 55-jährige Patientin ED litt anfangs an einem durch eine linksseitige Sinus-cavernosus-Fistel hervorgerufenen Orbitaspitzensyndrom und wurde zum endovaskulären Verschluss der Fistel zugewiesen. Nach erfolgreichem Verschluss der Fistel bildete sich innerhalb von Wochen in dem betroffenen Bereich der intrakraniellen Carotis ein fusiformes Aneurysma aus. Um einer Ruptur zuvorzukommen, entschied man sich für den Versuch eines endovaskulären Verschlusses der linken Arteria carotis interna (ACI). Bei temporärem Verschluss zeigten sich linkshemispherielle transitorische Attacken durch eine Insuffizienz der intrakraniellen Kollateralwege. Vor dem endgültigen Verschluss wurde deshalb ein extra-intrakranieller Bypass von der linken Arteria temporalis superficialis zur linken Arteria cerebri media angelegt (STA-MCA Anastomose). Nach endgültigem endovaskulärem Verschluss der ACI blieb die Patientin unter Überwachung auf der Stroke Unit im UKE über 36 Stunden symptomfrei, entwickelte dann jedoch multiple Infarkte der linken Hemisphäre. Ein Verschluss des Bypasses oder ein Blutdruckabfall konnten als Ursachen der Perfusionsstörung ausgeschlossen werden. Die Besonderheit an diesem Fall war, daß sich der Schlaganfall auf der neurologischen Station unter regelmäßigem Monitoring der Fibrinogenwerte ereignete. Bei einer genauen Durchsicht der Krankenunterlagen konnte man sehen, daß eine diskrete neurologische Symptomatik dem Fibrinogenanstieg im Plasma vorausging und mit einer weiteren klinischen Verschlechterungen seinen Maximalwert erreichte (Diagramm 1).



Die Tatsache, daß die steile Anstieg des Fibrinogen-Plasmaspiegels gut mit der Progression der Symptomatik der Patientin korrelierte, führte zu der Hypothese, daß der durch initiale Ischämie verursachte Fibrinogenanstieg zu einer weiteren Durchblutungsstörung führt und sich so der darauf resultierende Teufelskreis schließt. Dies ließe sich pathophysiologisch entweder durch eine Erhöhung der Blutviskosität oder durch eine Förderung der Plättchenaktivierung und Blutgerinnung mit nachfolgender multipler Embolisierung aus dem Bypass erklären.

1.6 Fibrinogen

Fibrinogen ist ein 340 kDa großes homodimeres Protein, und jede Untereinheit besteht aus drei Polypeptidketten, α -, β -, und γ -Kette, die durch Disulfidbindung miteinander verbunden sind. Alle drei Ketten haben ihr Gen innerhalb eines Bereichs von 50 kb auf dem Chromosom 4, von 4q23 bis 32 (Chung et al., 1990; Humphries et al., 1984; Kant et al., 1985). Die ADP-Freisetzung aus Erythrozyten durch hohe Scherkräfte (Born, 1977), z.B. in arteriellen Stenosen, führt zu einer Konformationsänderung des Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa-Komplex auf den Blutplättchen (Koenig and Ernst, 1992), der damit Fibrinogen binden kann. Das Fibrinogen führt zur Vernetzung mit anderen Plättchen und zur Bildung von Thrombozytenaggregaten (Gartner et al., 1993; Rooney et al., 1998). Weiterhin wird Fibrinogen im Rahmen der Gerinnungsreaktion durch Thrombin gespalten und das entstehende Fibrin vernetzt. Der dabei entstehende instabile Fibrin-Thrombus wird in Folge durch aktivierten Faktor XIII (Fibrin-Stabilisierender-Faktor) zum endgültigen Thrombus. Dies ist das Endprodukt der Gerinnungskaskade.

Genetische Faktoren bekommen zunehmend klinische Aufmerksamkeit als potentielle Prädispositionsfaktor der zerebrovaskulären Erkrankungen (Venti et al., 2002). In einer Population wird der genetische Polymorphismus durch das Vorkommen von zwei oder mehr genetisch determinierten alternativen Phänotypen, hervorgerufen durch verschiedene Allele, definiert. Die seltenste Form kann nicht allein durch wiederholte Mutation aufrechterhalten werden. Ein Genlocus wird als polymorph bezeichnet, wenn das oder die seltenen Allele eine Häufigkeit von mindestens 0,01 (1 %) haben und demzufolge Heterozygote für dieses Allel mit einer Häufigkeit von mehr als 2 % vorkommen (Ford, 1966).

1.6.1 Polymorphismen des Fibrinogens

Bei der Regulation der Fibrinogensynthese kommt dem β -Fibrinogen-Gen eine wichtige Rolle zu (Anderson et al., 1993). Intrazellulär befinden sich α - und γ -Ketten im Überschuß. Die Geschwindigkeit der β -Kettensynthese ist der limitierende Schritt der Fibrinogensynthese (Roy et al., 1994; Yu et al., 1983; Yu et al., 1984). Mehrere prospektive epidemiologische Studien konnten zeigen, daß eine erhöhte Fibrinogenkonzentration ein unabhängiger Risikofaktor atherosklerotisch bedingter Erkrankungen wie Herzinfarkt und ischämischen Schlaganfall ist (Ernst and Resch, 1995; Heinrich and Assmann, 1995; Qizilbash, 1995; Thompson et al., 1995; Wilhelmsen et al., 1984). Dabei scheint das Risiko, durch erhöhtes Fibrinogen einen ischämischen Schlaganfall zu erleiden, dem Risiko durch erhöhten Blutdruck und erhöhtes Serumcholesterin durchaus gleich zu kommen (Wilhelmsen et al., 1984). Im Promotor des Gens der Fibrinogen β -Ketten wurden mehrere Polymorphismen identifiziert. Diese zeigten eine erhöhte basale Transkription des β -Fibrinogen-Gens bei Transfektion in HepG2-Zellen (Huber et al., 1990). Der G/A-Austausch an Position -455, bzw. den G/A-Austausch an Position -854, kommen mit einer Allelfrequenz von 21,4 % bzw. 18,6 % in der mitteleuropäischen Bevölkerung vor (van 't Hooft et al., 1999). Dies korrelierte mit signifikant erhöhtem Fibrinogenspiegel in gesunden Probanden mit dem A-Allel des Polymorphismus -854 G/A (van 't Hooft et al., 1999) oder dem A-Allel des -455 G/A Polymorphismus (Gardemann et al., 1997; van 't Hooft et al., 1999). Zudem zeigten Träger des A-Allels an der Position -455 einen deutlich verstärkten Fibrinogenanstieg in der Akut-Phase-Reaktion (Ferrer-Antunes et al., 1998; Gardemann et al., 1997). Dieses den Fibrinogenspiegel erhöhende A-Allel wurde vermehrt bei Patienten mit makroangiopathischen Hirninfarkten (Kessler et al., 1997) und als unabhängiger Risikofaktor für Hirninfarkte bei hypertensiven Patienten (Nishiuma et al., 1998) beschrieben, und scheint mit einer beschleunigten Progression der Koronaratherosklerose assoziiert zu sein (de Maat et al., 1998).

1.7 GPIIb/IIIa-Komplex Fibrinogenrezeptor

Fibrinogen vernetzt aktivierte Plättchen über eine Bindung an den GPIIb/IIIa-Komplex. Die Wichtigkeit dieser Aktivierung wird durch die klinisch-therapeutische Stellung von Anti-GPIIb/IIIa-Substanzen deutlich, die zur Zeit als stärkster Thrombozytenaggregati-

onshemmer gelten (Hardman, 2001). Eine verstärkte Plättchen-Aktivierung wurde insbesondere bei Individuen mit atherosklerotisch oder hämodynamisch bedingten Infarkten beobachtet (Konstantopoulos et al., 1995). Bei diesen Individuen lässt sich eine erhöhte Inzidenz so genannter Mikroembolie-Signale in der transkranialen Dopplersonographie nachweisen (Babikian et al., 1997). Ihre Frequenz korreliert mit dem Grad der atherosklerotischen Veränderungen (Babikian et al., 1997; Droste et al., 1999) und dem Risiko eines ischämischen Hirninfarktes (Babikian et al., 1997; Droste et al., 1999; Tong and Albers, 1995). Inwieweit genetische Besonderheiten des Fibrinogen- und Plättchenmetabolismus die Mikroembolie-Signal-Frequenz beeinflussen würde, wurde bisher nicht untersucht. Eine erhöhte Inzidenz des Plättchen-Glykoprotein IIb HPA-3 Polymorphismus war in einer Studie signifikant mit erhöhter Mortalität nach ischämischen Schlaganfall assoziiert (Carter et al., 1999). Dabei findet sich ein T/G-Austausch, der eine Isoleucin zu Serin-Mutation an Position 843 der schweren Kette des GPIIb Proteins zur Folge hat. Diese Mutation scheint die Konformation der Fibrinogen-Bindestelle zu verändern und führt damit wohl zu einer verstärkten Bindung von Fibrinogen, besonders im Bereich sehr hoher Fibrinogenkonzentrationen (Carter et al., 1999). Das PLA2-Allel des anderen Glykoproteins GPIIIa konnte ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für den ischämischen Schlaganfall korreliert werden (Wagner et al., 1998). Bei diesem HPA-1 genannten Polymorphismus an Position 33 des GPIIIa Proteins führt ein T/C Austausch entweder zur Benützung der Aminosäure Leucin (PIA1) oder zu Prolin (PIA2). PIA2 positive Blutplättchen haben eine erniedrigte Schwelle für Plättchen- oder GPIIb/IIIa-Aktivierung und binden leichter Fibrinogen. Die verschiedenen Allel-Formen zeigen eine veränderte Sensitivität für aggregationshemmende Medikamente wie Acetylsalizylsäure (ASS). PIA1/A2 positive Plättchen zeigen die höchste Sensitivität für ASS (Michelson et al., 2000).

1.8 Akut-Phase-Protein

Akut-Phase-Proteine (APP), zu denen auch Fibrinogen gehört, werden im Rahmen der Akut-Phase-Reaktion (APR) von der Leber als Antwort auf die Zytokine Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), die bei Infektionen oder Nekrosen gebildet werden, synthetisiert. Das Zytokin IL-6 ist der direkte und gleichzeitig der wichtigste Regulator der APP-Synthese und damit auch des Fibrinogens. In der Promoterregion des Gens für die Fibrinogen- β -Kette wurden Abschnitte

identifiziert, durch die die Synthese dieses Peptids durch IL-6 beeinflusst wird (Anderson et al., 1993). Im Tiermodell des ischämischen Hirninfarktes wird IL-6 von aktivierten Gliazellen und Neuronen in der Penumbra synthetisiert (Block et al., 2000). Beim ischämischen Hirninfarkt im Tiermodell konnte gezeigt werden, daß der Anstieg von Interleukin-6 und einer APR u.a. vom Infarktvolumen abhängig ist (Beamer et al., 1998). Die Gesamtheit der Stoffwechselreaktionen auf Interleukin-6 kann als prokoagulatorisch beschrieben werden (Stouthard et al., 1996). Die Tatsache, daß eine akute Infektion ein Risikofaktor für den ischämischen Schlaganfall ist (Grau et al., 1998; Syrjanen et al., 1988), könnte durch diese prokoagulatorische Wirkung erklärt werden. Da IL-6 auch in atherosklerotischen Plaques gebildet wird und dadurch die Fibrinogensynthese steigert (Seino et al., 1994), wird dies als mögliche Erklärung dafür vorgeschlagen, daß das Vorliegen der Risikofaktoren für Atherosklerose, wie Diabetes mellitus, Adipositas und Hypercholesterinämie, mit erhöhten Fibrinogenspiegeln assoziiert ist (Folsom et al., 1991). Ein G/C-Austausch an Stelle -174 der IL-6-Promoterregion kommt mit einer Allelfrequenz von 40,3 % vor (Fishman et al., 1998). Im Gegensatz zum häufigeren G-Allel führt das C-Allel *in vitro* nicht zu einer Steigerung der Interleukin-6-Synthese durch verschiedene Stimuli und homozygote Träger dieses Allels haben signifikant niedrigere Interleukin-6-Spiegel (Fishman et al., 1998). Die Rolle dieses Polymorphismus beim ischämischen Hirninfarkt oder Modulation des Fibrinogenspiegels wurde bisher nicht untersucht.

1.9 Die Akutbehandlung des ischämischen Hirninfarktes in Zukunft

Mit der schnellen Entwicklung der molekularbiologischen Forschung in den letzten Jahren weißt man heute, daß zahlreiche Polymorphismen biochemisch relevante Bedeutung haben und für bestimmte Krankheiten prädisponierend sein können. Das bessere Wissen über die Bedeutung und die biochemischen Mechanismen einzelner Polymorphismen bieten uns die Möglichkeit neuer und effektiverer pharmakologischer Angriffspunkte bei genetisch gefährdeten Personen, sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch. Es könnte genetisch bedingte Unterschiede auch in der Regulation der Akut-Phase-Reaktion und deren Auswirkungen auf die Blutgerinnung existieren. Inwieweit das Ausmaß der Akut-Phase-Reaktion dem Verlauf eines ischämischen Hirninfarktes mitbestimmt, ist bisher nicht bekannt. Auch ob das Ausmaß der Reaktion mit ihren prokoagulatorischen Konsequenzen Einfluß auf den akuten Verlauf der Erkrankung oder auf das Risiko eines erneuten Infarktes hat, ist bisher nicht systematisch untersucht

das Risiko eines erneuten Infarktes hat, ist bisher nicht systematisch untersucht worden. Die Assoziation bestimmter Polymorphismen als Risikofaktoren für unterschiedliche Infarkttypen wurde bisher nur in Ansätzen untersucht (Kessler et al., 1997). Aber wenn sich die Hypothese als richtig beweisen sollte, daß bestimmte Polymorphismen eine entscheidende Rolle im Anstieg des Fibrinogens in der Akut-Phase-Reaktion spielen, würde eine vorbeugenden Therapie mit Fibraten (zur Senkung des Fibrinogens) oder einer forcierten Thrombozytenaggregationshemmung in der Akut-Phase des ischämischen Schlaganfalls an Bedeutung zunehmen. Gerade die vielfältigen pharmakologischen Möglichkeiten, das Thrombozytenaggregationssystem anzugreifen, und die hohe Inzidenz des Schlaganfalls bzw. dessen große Bedeutung in unserem Gesundheitssystem macht das Konzept um so attraktiver, nach genetischen Unterschieden, differenziert und effektiv therapeutisch anzusetzen.

1.10 Das Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte ich fünf Genpolymorphismen, Interleukin-6 -174 G/C, Fibrinogen -455 G/A, Fibrinogen -854 G/A, GPIIb 2622 T/G (Ile 843 Ser) und GPIIIa 196 T/C (Leu 33 Pro), die direkt oder indirekt Bedeutung in der Regulation der Fibrinogensynthese und Thrombozytenaggregation haben und untereinander eine funktionelle Kaskade bilden. Es sollte untersucht werden, ob diese Genpolymorphismen bei der Entstehung eines Schlaganfalls eine Rolle spielen bzw. ob sie auf den klinischen Verlauf nach einem stattgefundenen Schlaganfall Einfluß haben. Als Pilotprojekt einer eventuellen weiteren, vergrößerten Polymorphismusstudie wurden 73 Patienten mit einem ischämischen Schlaganfall untersucht.

2 Material und Methode

2.1 Puffer

5 x TBE

90 mM Tris Base

2 mM EDTA

20 x SSC

3 M NaCl

0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat

2.2 DNA-Präparation

Die Blutproben stammten von Patienten der *Strokeunit* des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die 2,5 ml EDTA-Blutproben wurden bis zur Extraktion bei -80 °C aufbewahrt.

DNA wurde aus dem Blut durch „*silica gel based DNA purification*“ mit einem kommerziellen Kit (QIAamp DNA Mini Kit[®]: QIAGEN) präpariert. Zuerst wird 200 µl Patientenblut in ein 1,5 ml Miro Test Tube pipettiert. Das Blut wird mit zugehörigen 20 µl Protease und 200 µl Puffer (chaotrope Salze) gemischt und nach kurzem Vortexen für 10 Minuten in 56 °C warmem Wasserbad inkubiert. Dadurch werden die Proteine denaturiert und die DNA kann von den Histonproteinen gelöst werden. Anschließend wird 200 µl Ethanol absoluta zugegeben. Nach erneutem kurzem Vortexen wird die Lösung in eine zugehörige Säule mit Silica-Membran (QIAamp spin Säule[®]: QIAGEN) in ein 2 ml Sammeltube umpipettiert und für 2 min mit Geschwindigkeit von 16000 x g zentrifugiert. Die an die Silicat-Membran gebundene DNA wird mit zugehörigem Puffer zwei Mal gereinigt. Schließlich wird die DNA mit 200 µl Wasser für 2 min bei 16000 x g zentrifugiert und eluiert. Die mittlere Konzentration der DNA-Lösungen war 27 ng DNA/µl.

2.3 PCR

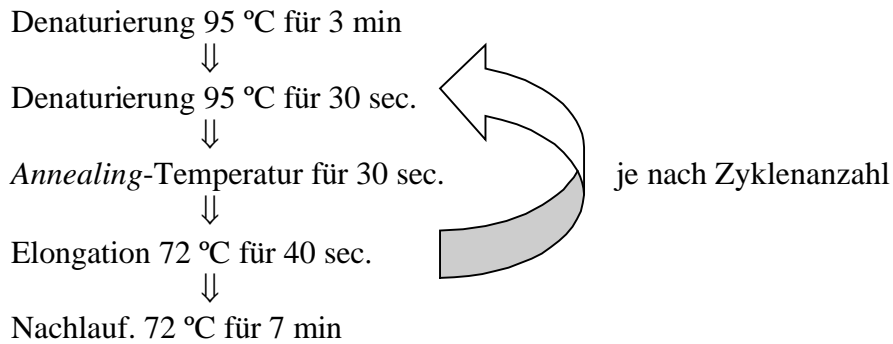
2.3.1 Standard-PCR

Zur Amplifikation der DNA-Frequenzen wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (PCR-Maschine T-Gradient Thermoblock[®]: Biometra) durchgeführt. Die Primer wurden durch Oligo 6,0[®] (Primer Analysis Software, Insights) gewählt (Tabelle 1). Bei der Wahl der Primer wurden Primer mit ähnlicher *Annealing* (Anheften der Oligonukleotide)-Temperatur erstellt, so daß die Möglichkeit bestand, mehrere Fragmente in einer Reaktion zu amplifizieren (Multiplex-PCR).

Tabelle 1: Primer

| | |
|------------------------------|---------------------------------------|
| Interleukin-6 -174 G/C | 5'-GGG GGC TGC GAT GGA GT-3' |
| | 5'-CCT GGA GGG GAG ATA GAG C-3' |
| Fibrinogen -455 G/A | 5'-TAC TGG GAT TTG GAT TAC TGA CTG-3' |
| | 5'-AAA CTA CAC AAG CTC CGA AAG A-3' |
| Fibrinogen -854 G/A | 5'-TAC TGG GAT TTG GAT TAC TGA CTG-3' |
| | 5'-AAT GAG GCC CAT TTT CCT TGA ATT-3' |
| GPIIb 2622 T/G (Ile 843 Ser) | 5'-GGC CCC AGA CCA ACC AC-3' |
| | 5'-TCA GCT CAC CCC AGA CAC AAG-3' |
| GPIIIa 196 T/C (Leu 33 Pro) | 5'-TCC CCT TTC TGT ACA ACG GTC CTA-3' |
| | 5'-GTA CTC GGG CCT CAC TCA CTG-3' |

Das Grundschema für den Ansatz einer Standard-PCR bestand aus 1x PCR-Puffer (50 mM KCL, 1,5 mM Tris-HCL und 1.5 mM MgCl) (Eppendorf), 1,2 µM dNTP (Eppendorf), 1 U Platinum Taq-DNA-Polymerase (Gibco BRL, Life Technologies), 0,4 µM jedes Primers, ca. 27 ng DNA-Template. Ein Ansatz hatte ein Endvolumen von 25 µl. Die optimale *Annealing*-Temperatur und Zyklenanzahl für die jeweiligen Oligonukleotidenpaare wurde ausgetestet. Das Grundschema für PCR besteht aus Denaturierung, *Annealing* und Elongation zu neuen Doppelsträngen.



Nach Vorheizen der PCR-Maschine wird die DNA zunächst bei 95 °C zu Einzelsträngen denaturiert. Danach wird die Lösung auf die *Annealing*-Temperatur abgekühlt, so daß sich zwei Oligonukleotide aneinanderlagern, die der Sequenz der beiden Einzelstränge komplementär sind. Durch DNA-Polymerase werden die beiden Einzelstränge bei 72 °C zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert (Elongation). Anschließend wiederholt sich dieser Reaktionszyklus und die DNA-Fragmente werden exponentiell amplifiziert.

2.3.2 Multiplex-PCR

Unter „Multiplex-PCR“ versteht man eine PCR, bei der mehrere Fragmente in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden. Dadurch erscheinen auf dem Elektrophorese-Gel unterschiedliche DNA-Fragment-Banden. Es werden mehrere Primerpaare in eine PCR-Reaktionslösung gegeben.

Die Schwierigkeit in dieser Methode liegt darin, daß die Primerpaare jeweils unterschiedliche optimale *Annealing*-Temperatur besitzen und, je nach Reaktionsbedingung, auch unterschiedliche Affinität zu den jeweiligen komplementären DNA-Fragmenten zeigen. Daraus resultieren unterschiedliche starke Banden auf dem Agarose-Gel. Ein weiteres Problem ist, daß die Banden nach dem Verdau mit einer Restriktionsendonuklease, bei ähnlicher Fragmentgröße auf dem Agarose-Gel schwer zu unterscheiden sind.

Als erster Schritt wird, wie schon oben geschrieben, die optimale Bedingung für alle individuelle Primerpaare gesucht. Die Temperatur für *Annealing* und Elongation werden angepaßt bis die Produkte der allen Primerpaare ähnlich dicke und deutliche Bande zeigen. Dann versucht man eine Multiplex-PCR mit allen Primerpaare zuerst in gleicher Konzentration. Je nach Unterschied der Dicke der individuellen Banden „titriert“ man

Primerkonzentration, *Annealing*-Temperatur und Elongationszeit in Abstand von jeweils 0,1-0,2 µM, 1 °C und 30 Sekunden bis alle Banden optimal zu sehen sind.

Ein PCR-Ansatz für Multiplex-PCR bestand aus 1 x PCR-Puffer (50 mM KCL, 1,5 mM Tris-HCL und 1.5 mM MgCl) (Eppendorf), 1,2 µM dNTP (Eppendorf, Hamburg, Germany), 1 U Platinum Taq-DNA-Polymerase (Gibco BRL, Life Technologies), Primer nach Titration (siehe Ergebnis), ca. 80 ng DNA-Template. Ein Ansatz hatte in ein Endvolumen von 50 µl.

2.3.3 Mismatch-PCR

Um die Diagnose des Polymorphismus Fibrinogen -854 G/A mit einer Restriktionsendonuklease zu stellen, war es unbedingt nötig, eine passende Schnittstelle zu finden. Es gibt jedoch keine Restriktionsendonuklease, die genau an der Stelle des Polymorphismus Fibrinogen -854 G/A schneidet. Um dieses Problem zu lösen, habe ich versucht, bei der Amplifikation mit der PCR eine solche Stelle neu zu schaffen, in dem ich einen modifizierten Primer benutzte. Die Restriktionsendonuklease EcoR I schneidet die folgende Stelle.



während die tatsächliche Sequenz der zu amplifizierenden Stelle



ist. Um die gewünschte Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease EcoR I herzustellen, wurde deswegen das folgende Primerpaar benutzt:



Beim *Annealing* sollte dann diese Stelle umschrieben werden, damit sie von EcoR I erkannt wird. Wenn die zu untersuchende DNA Guanin an dieser Stelle hat, sollte diese

Stelle geschnitten werden und wenn diese Stelle Adenin hat, sollte diese Stelle nicht geschnitten werden.

2.4 Verdau

Für die Erkennung der einzelnen Polymorphismen habe ich mit Restriktionsendonukleasen (Tabelle 2) die entsprechenden Stellen geschnitten (oder nicht geschnitten), damit man auf dem Agarose-Gel anhand des Bandmusters die Polymorphismendiagnose stellen konnte.

Die verwendeten Restriktionsendonuklease waren SfaN I für Interleukin-6 -174 G/C, Hae III für Fibrinogen -455 G/A, EcoR I für Fibrinogen -854 G/A, Fok I für GPIIb 2622 T/G (Ile 843 Ser) und Msp I für GPIIIa 196 T/C (Leu 33 Pro) (alle Enzyme von New England Biolabs).

Tabelle 2: Schnittstelle der Restriktionsendonuklease

| | |
|--|---|
| SfaN I Interleukin-6 -174 G/C | 5'...GCATC(N) ₅ ▼...3' 3'...CGTAG(N) ₉ ▲...5' |
| Hae III Fibrinogen -455 G/A | 5'...GG▼CC...3' 3'...CC▲GG...5' |
| EcoR I Fibrinogen -854 G/A | 5'...G▼AATT C...3' 3'...C TTAA▲G...5' |
| Fok I GPIIb 2622 T/G (Ile 843 Ser) | 5'...GGATG(N) ₉ ▼...3' 3'...CCTAC(N) ₁₃ ▲...5' |
| Msp I GPIIIa 196 T/C (Leu 33 Pro) | 5'...C▼CG G...3' 3'...G GC▲C...5' |

Die Verdauelösungen (Tabelle 3) wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Tabelle 3: Verdauelösungen

Fibrinogen -455 G/A

| | |
|-------------------------------|------------|
| Hae III | 20 U |
| 10 x NE Puffer 2 [®] | 1 x |
| Multiplex-PCR Produkt | Ca. 540 ng |

GPIIb 2622 T/G (Ile 843 Ser)

| | |
|-------------------------------|------------|
| Fok I | 20 U |
| 10 x NE Puffer 4 [®] | 1 x |
| Multiplex-PCR Produkt | Ca. 540 ng |

GPIIIa 196 T/C (Leu 33 Pro)

| | |
|-------------------------------|------------|
| Msp I | 20 U |
| 10 x NE Puffer 2 [®] | 1 x |
| Multiplex-PCR Produkt | Ca. 540 ng |

Interleukin-6 -174 G/C

| | |
|-------------------------------|-------------|
| SfaN I | 30 U |
| 10 x NE Puffer 2 [®] | 1 x |
| PCR Produkt | Ca. 1,05 µg |

Fibrinogen -854 G/A

| | |
|------------------------------------|-------------|
| EcoR I | 30 U |
| 10 x NE Puffer Eco RI [®] | 1 x |
| PCR Produkt | Ca. 1,05 µg |

2.5 Ethanolfällung

Die verdaute DNA wurde durch Ethanolfällung aufkonzentriert. 200 µl Verdauprodukt wurde mit -20 °C kaltem Ethanol und 20 µl Natriumacetat 3 M (pH 5,2) versetzt und kurz gevortext. Danach wurde die Lösung für 10 Minuten bei -80 °C gekühlt und gleich im Anschluß bei 5 °C für 60min mit 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit 300 µl -20 °C kaltem 70 %igen Ethanol gewaschen und erneut bei 5 °C mit 16000 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Dekantieren des Überstandes und erneutes Waschen mit 300 µl 70 %iger, -20 °C kalter Ethanollösung. Erneut zentrifugieren bei 5 °C für 20 Minuten mit 16000 x g. Der Überstand wurde erneut abgegossen und das Minitube mit der Öffnung nach unten über Nacht bei 4 °C getrocknet. Das makroskopisch nicht sichtbare Pellet blieb so ausreichend feucht, damit die DNA nicht untrennbar miteinander verklebte. Am Ende wurde das Pellet im 8 µl destilliertem Wasser über 3 Stunden im Thermomixer bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung eluiert.

2.6 Elektrophorese

Um die verschiedenen Polymorphismen zu unterscheiden, wurden die Restriktionsfragmente der PCR-Produkte nach dem Prinzip des Restriktionsfragment Längenpolymorphismus (RFLP) getrennt und sichtbar gemacht. Als Gel nahm ich 2 %iges Agarose-Gel (SeaKam LE[®]: Biowhittaker Molecular Applications) mit 1x TBE und 1 µg/ml Ethidiumbromid. Ethidiumbromid fluoresziert nach Bindung an DNA-Doppelhelix unter UV-Licht intensiv und dient zur Darstellung der Banden. Da die erwarteten Banden in den Größenbereich von zwischen ca. 100 und 600 Basepaaren (Bp) lagen, wurde als Größenmarker die 100 Bp-Leiter (Gibco BRL, Life Technologies) benutzt. Die Spannung des Elektrophoresegerätes (Sub-Cell[®] GT: Bio-Rad, Life Science) ist 3 V/cm, die Laufzeit war je nach Größe der erwarteten Banden 60 bis 180 Minuten. Anschließend wurde das Agarose-Gel auf den UV-Lichtmonitor gebracht und die Banden identifiziert.

2.7 Southern-Blot

Zur selektiven Darstellung der Multiplex-PCR wurden die durch Agarosegel-Elektrophorese der Größe nach aufgetrennten Fragmente mittels des „Southern-Blot“ Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und die einzelnen Fragmente

durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Primern des jeweiligen Produktes hybridisiert.

Nachdem die DNA-Fragmente in einem Agarose-Gel aufgetrennt wurden, wird das Gel mit alkalischer Lösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) behandelt, um die DNA zu denaturieren. Nach Denaturierung der DNA wurde die Nitrocellulosemembran (Parablot[®], MACHEREY-NAGEL) unmittelbar auf das Gel gelegt. Als Transferpuffer wurde 20 x SSC verwendet. Nach erfolgreichem Transfer wurde die Membran vorsichtig vom Gel gelöst und in 1,5 M Tris-HCl (pH 7,5) neutralisiert. Nachdem man die Membran gut mit 2 x SSC gewaschen hat, trocknete man es bei Raumtemperatur auf einem Filterpapier. Zum Schluß wurden die DNA-Fragmente durch UV-Licht auf die Membran fixiert (UV-Stratalinker 1800[®], Stratagene).

2.7.1.1 Primer-Markierung

Die Oligonukleotide wurden an ihrem 5'-Ende mit einem radioaktiven Phosphorisotop (³²P) (Amersham Biosciences) markiert. Durch die T4-Polynukleotidkinase wurde das ³²P in γ -Stellung eines Adenosintriphosphats (³²P) an den 5' OH-Rest eines DNA-Stranges angehängt. Die Reaktion lief in 1 x T4-Polynukleotidkinase (PNK) Puffer (Promega) mit Endkonzentration von 1 mM Oligonukleotiden, 50 μ Ci γ -³²P ATP und 1 Unit/ μ l T4 PNK in 10 μ l Wasser für 15 Minuten bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40 μ l TE-Puffer beendet und die radioaktiv markierten Oligonukleotide wurde mittels Sephadex-G25 Quick-Spin-Säule[®] (Boehringer Mannheim Corporation) nach Angabe der Hersteller aufgereinigt. Dabei handelte es sich um ein Filtersystem aus Harz und Silikamembran, das die DNA bis zu einer Größe von 10 Bp überwiegend eliminierte und so die Aufreinigung der radioaktiv markierten Oligonukleotide von γ -³²P-ATP ermöglichte. Die spezifische Aktivität der markierten Oligonukleotide lag immer über 10⁷ Impulsen/min/pmol Oligonukleotid.

2.7.1.2 Hybridisierung und Autoradiographie

Die „abgeklatschte (geblottete)“ Nitrocellulosemembran wurde in eine Lösung mit einer ³²P radioaktiv markierten DNA-Sonde eingetaucht. Dabei wurden Salzkonzentration und Temperatur so gewählt, daß die Wasserstoffbrücken zwischen dem als Sonde fungierenden Einzelstrang und dem komplementären DNA-Fragment optimal stabilisieren konnten. Fragmente, mit denen die Sonde hybridisierte, wurden durch Autoradiographie

sichtbar gemacht. Die Nitrozellulosemembran wurde zuerst in die mit 2 x SSC gefüllte Hybridisierungsröhre geschoben und dann wird 2 x SSC abgegossen. 5 ml Hybridisierungslösung (0,6 M NaCl, 0,12 M Tris, 4 mM EDTA, 4,4 mM Na-Pyrophosphat, 0,2 % SDS, ca. 3,3 µM Heparin) wurde im Anschluß hinzugefügt und 30 min bei 42 °C unter ständiger Bewegung vorinkubiert (Hybridisierungssofen OV 5[®]: Biometra). 10⁷ Impulse/min/ml radioaktiv markierte Oligonukleotide wurden als komplementärer DNA-Strang zugegeben und über Nacht bei 42 °C unter ständiger Bewegung hybridisiert. Dann wurde die Nitrozellulosemembran mit 2 x SSC und 0,1 %igem SDS für jeweils 10 min bei Raumtemperatur, bei 55 °C und bei 60 °C gewaschen. Die radioaktiv markierten Banden wurden mit einem Phosphorimager (BAS2000[®], Fuji Photo Film) dargestellt und das digitale Bild mit der Tina-Software (Version 2.10h[®]: Raytest) bearbeitet.

2.8 Statistische Auswertung

2.8.1 Untersuchte Patienten

Die untersuchten Patienten wurden im Zeitraum zwischen dem 14.03.2000 und dem 28.08.2000 in die *Strokeunit* des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf aufgenommen. Bei diesen Patienten wurde während des Krankenhaus-Aufenthaltes der klinische Verlauf anhand des Scandinavian Stroke Score (Scandinavian-Stroke-Study-Group, 1985; Scandinavian-Stroke-Study-Group, 1987; Scandinavian-Stroke-Study-Group, 1988) dokumentiert (Tabelle 6). Die regelmäßig erhobenen Labortwerte (Fibrinogen, Quickwert, Plasma-Thrombinzeit (PTZ), aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), Leukozytenzahl, Hämatokrit (Hkt), C-Reaktives-Protein (CRP)) als auch die Ergebnisse des kranialen Computertomogramms, der Doppler- und Duplexsonografie der hirnversorgenden Arterien, des Elektrokardiogramm (EKG) und weiterer Diagnostik (Computer Tomographie (CT), Magnet Resonanz Tomographie (MRT), transthorakale Echokardiographie (TTE), transösophageale Echokardiographie (TEE)) wurden der Krankenakte entnommen.

Ferner wurden das Alter und das Geschlecht der Patienten, der Zeitpunkt des Schlaganfalls, die Sicherheit der Ereigniszeit, der Zeitraum bis zur Aufnahme, die Durchführung einer Lysetherapie, die betroffenen Gefäße, die Risikofaktoren, die Vorerkrankungen, die vom Patienten eingenommenen Medikamente, das Vorliegen einer Infektion bei Einlieferung und der Temperaturverlauf während des Klinikaufenthaltes registriert. Die

Ergebnisse der bildgebenden und sonographischen Untersuchungen als auch des EKG wurden zur Einteilung der Schlaganfalltypen gemäß der TOAST-Kriterien (Adams et al., 1993; Gordon et al., 1993) verwandt (Tabelle 4).

2.8.2 TOAST-Kriterien

Um die Untergruppierung der ischämischen Schlaganfällen zu standardisieren, wurden die TOAST (*The Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment*)-Kriterien (Adams et al., 1993; Gordon et al., 1993) verwendet (Tabelle 4). Die Ätiologie der ischämischen Schlaganfälle hat großen Einfluß auf deren Prognose, Verlauf und das therapeutische Vorgehen. In den TOAST -Kriterien wird die Ursache der ischämischen Schlaganfälle in fünf Untergruppen unterteilt. 1. Zerebrale Ischämie durch Atherosklerose der großen hirnversorgenden Arterien. 2. Zerebrale Ischämie durch kardiale Embolie. 3. Zerebrale Ischämie durch Mikroangiopathie. 4. Zerebrale Ischämie anderer Ätiologie. 5. Zerebrale Ischämie unbestimmbarer Ätiologie. Die Diagnose wird auf Basis klinischer Befunde, Anamnese und bildgebende Untersuchungen gestellt, wobei die Ärzte je nach ihrer Sicherheit der Diagnose das Adjektiv „mögliche“ und „wahrscheinliche“ angeben können. Der Vorteil an diesen Kriterien ist einfache Verwendbarkeit und gute Übereinstimmung zwischen verschiedenen Untersuchern.

2.8.3 Scandinavian Stroke Score (SSS)

Der Scandinavian Stroke Score (SSS) (Scandinavian-Stroke-Study-Group, 1985; Scandinavian-Stroke-Study-Group, 1987; Scandinavian-Stroke-Study-Group, 1988) dient der Erfassung des Schweregrades und zur Verlaufsdokumentation nach einem Schlaganfall. Insbesondere Patienten mit einem wechselnden Defizit werden hiermit erfaßt. Die Kraftprüfung betrifft die betroffene Seite. Eine im Verlauf steigende Punktzahl dokumentiert Besserung, eine sinkende Punktzahl dagegen eine Verschlechterung. Es sind maximal 58 und minimal 2 Punkte möglich. Dabei werden Bewußtseinslage, Augenbewegung, Kraft des Armes, Kraft der Hand, Kraft des Beins, Orientierung zur Person, Zeit und Ort, Sprache, Fazialisparese und Gehfähigkeit beurteilt (Tabelle 5).

Tabelle 4: TOAST-Kriterien

| |
|--|
| 1. Wahrscheinliche zerebrale Ischämie durch Atherosklerose der großen hirnversorgenden Arterien |
| <p><u>1.1 Klinik</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Kortikale Symptome: Aphasie, Neglect usw. • Hirnstammsymptomatik • Claudicatio intermittens • TIAs im selben Gefäßversorgungsgebiet |
| <p><u>1.2 Bildgebung</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Kortikale Beteiligung oder Hirnstamm- oder Subkortikaler Infarkt > 1,5 cm |
| <p><u>1.3 Doppler-/Duplexsonografie/ Angiographie</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Stenose > 50% der versorgenden extrakraniellen oder intrakraniellen Arterie |
| <p><u>1.4 Ferner</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Kein Hinweis auf Risikofaktor für kardiale Embolien |
| 2. Wahrscheinliche zerebrale Ischämie durch kardiale Embolie |
| <p><u>2.1 Kardiale Emboliequelle</u></p> <p><u>2.1.1 Emboliequelle mit großem Risiko</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Mechanische prothetische Herzklappe • Mitralstenose mit Vorhofflimmern • Vorhofflimmern (anderes als idiopathisches Vorhofflimmern) • Links atrialer/atrialer flottierender Thrombus • Sick Sinus-Syndrom • Anamnestische Myokardinfarkt(<4 Wochen) • Links ventrikulärer Thrombus • Dilatative Kardiomyopathie • Akinetisches linkes Kammersegment • Vorhofmyxom • Endokarditis durch Infektion <p><u>2.1.2. Emboliequelle mit mittlerem Risiko</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Mitralklappenprolaps • Mitralklappenringverkalkung • Mitralstenose ohne Vorhofflimmern • Links atriale Turbulenz • Vorhofseptumaneurhysma • PFO (Persistierendes Foramen Ovale) • Vorhofflattern • Idiopathisches Vorhofflimmern • Bioprothetische Herzklappe • Nicht bakterielle thrombotische Endokarditis • Stauung durch Herzinsuffizienz • Hypokinetische linke Kammersegment • Anamnestische Myokardinfarkt(> 4Wochen, <6Monaten) |

Tabelle 4 (Fortsetzung): TOAST-Kriterien

| |
|--|
| <p><u>2.2 Anamnese</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • TIA oder Schlaganfall in mehr als einem Gefäßversorgungsgebiet • Systemische Embolie |
| <p><u>2.3 Bildgebung</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Siehe 1.3 |
| <p><u>2.4 Ferner</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Ausschluß der potentiellen Emboliequelle der Atherosklerose der großen hirnversorgenden Arterien |
| <p>3. Zerebrale Ischämie durch Verschuß kleiner Arterien</p> |
| <p><u>3.1 Klinik</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Klassisches lakunäres Syndrom (<i>pure motor stroke, pure sensory stroke</i>) • Kein zerebrales kortikales Symptomatik (Aphasie, Neglect, Apraxie usw.) |
| <p><u>3.2 Anamnese</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Diabetes mellitus • Arterielle Hypertonie |
| <p><u>3.3 Bildgebung</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Normales CT/MRT Befund oder subkortikale hemisphärische Läsion unter Durchmesser 1,5cm |
| <p><u>3.4 Ferner</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Ausschluß einer potentielle kardiale Emboliequelle • Keine mehr als 50%ige Stenose intra- bzw. extrakranieller hirnversorgender Arterien |
| <p>4. Zerebrale Ischämie anderer Ätiologie</p> |
| <p><u>4.1 Bildgebung</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Akuter ischämischer Schlaganfall |
| <p><u>4.2 Ferner</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Bluttest/Serologie ergibt Hinweis auf anderweitige Ätiologie (Vaskulitis, Koagulopathie) • Arteriographie ergibt Hinweis auf nicht atherosklerotische Gefäßpathologie • Ausschluß kardioembolischer/ arterioarterieller Genese |
| <p>5. Zerebrale Ischämie unbestimbarer Ätiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> • Untersuchungen zu unvollständig für eine mögliche Ätiologie • Bei vollständigen Untersuchungen keine Ätiologie möglich • Mehr als eine Ätiologie möglich |
| <p>6. Mögliche gegen wahrscheinliche Ursache</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nur mittlerer Risikofaktor für Kardioembolie, sonst keine pathologischen Befunde bei kompletten Untersuchungen (gilt für 2) • Risikofaktor gefunden (Stenose, Herzinfarkt etc.), Klinik und Bildgebung entsprechend, kein Ausschluß andere Ätiologie (gilt für 1 und 2) • Klinik und Bildgebung entsprechend, kein Ausschluß von Stenosen oder kardialer Emboliequellen (gilt für 3) |

Tabelle 5: Scandinavian Stroke Score (SSS)

| 1 | Bewußtseinslage | Punkte |
|----------|---|------------------------|
| | <ul style="list-style-type: none"> • Wach • Somnolent/Orientiert • Somnolent/Nicht orientiert | 6 4 2 |
| 2 | Augenbewegung | Punkte |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Ungestört • Blicklähmung • Symmetrische Blickabweichung | 4 2 0 |
| 3 | Kraft Arm | Punkte |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Normal • Heben über die Horizontale möglich • Heben bis zur Horizontalen und Beugung • Bewegen ohne Schwerkraft möglich • Plegie | 6 5 4 2 0 |
| 4 | Kraft Hand | Punkte |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Normal • Minderbewegung, aber kompletter Faustschluß möglich • Minderbewegung, aber kompletter Faustschluß nicht möglich • Plegie | 6 4 2 0 |
| 5 | Kraft Bein | Punkte |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Normal • Minderbewegung, aber volles Bewegungsausmaß möglich • Minderbewegung, aber Kniebewegung im Bett möglich • Bewegung ohne Schwerkraft möglich • Plegie | 6 5 4 2 0 |
| 6 | Orientierung | Punkte |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Zur Person, Zeit und Ort • Zwei der o.g. Parameter • Einen der o.g. Parameter • Desorientiert | 6 4 2 0 |
| 7 | Sprache | Punkte |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Keine Aphasie • Eingeschränkter Sprachgebrauch • Keine Sätze, aber mehr als Ja und Nein • Ja/Nein oder weniger | 10 6 3 0 |
| 8 | Fazialisparese | Punkte |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Keine • Vorhanden | 2 0 |
| 9 | Gang | Punkte |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Fünf Meter ohne Hilfe • Mit Hilfe • Mit Hilfe einer anderen Person • Sitzen ohne Hilfe • Bettlägerig | 12 9 6 3 0 |

3 Ergebnisse

3.1 PCR

3.1.1 Standard-PCR

In der Standard-PCR der einzelnen Genfragmente wurde die optimale *Annealing*-Temperatur und die Anzahl der Zyklen für die jeweiligen Primerpaare festgestellt. Die optimale *Annealing*-Temperatur war für IL-6 -174 G/C 65 °C, für Fibrinogen -455 G/A 55 °C, für Fibrinogen -854 G/A 50 °C für GPIIb 2622 T/G 65°C und für GPIIIa 196 T/C 60 °C. Die optimale Zyklenanzahl lag zwischen 35 und 40, wobei sich bei höherer Zyklenanzahl eine stärkere Anfälligkeit für Kontamination darstellte. In der Abbildung 1 sieht man die Banden der Genfragmente, die durch Standard-PCR im Einzelnen amplifiziert wurden. Neben den einzelnen Reihen sieht man die jeweiligen Negativkontrollen. Die Banden im Bereich unter 100 Basenpaaren (Bp) sind die Oligonukleotide.

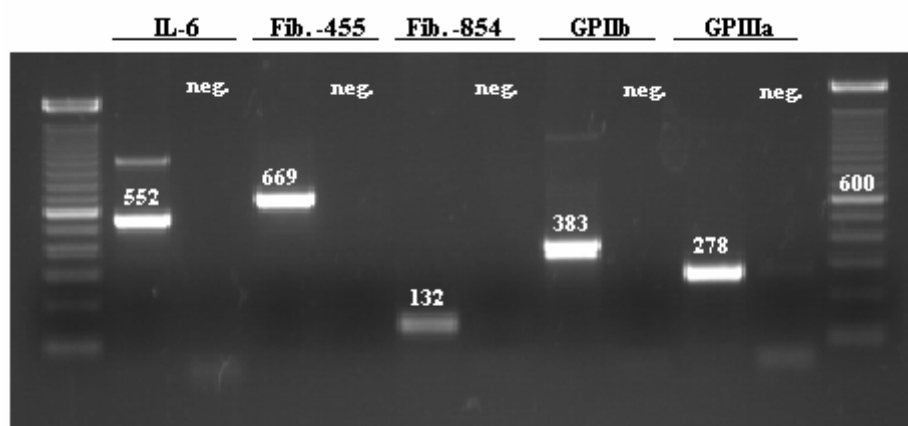


Abbildung 1: Standard-PCR Von links nach rechts: IL-6 -174 G/C (552 Bp), Fibrinogen -455 G/A (669 Bp), Fibrinogen -854 G/A (132 Bp), GP IIb 2622 T/G (383 Bp), GP IIIa 196 T/C (278 Bp). An beiden Enden 100 Bp Leiter. Die dicke Bande in der Leiter entspricht 600 Bp.

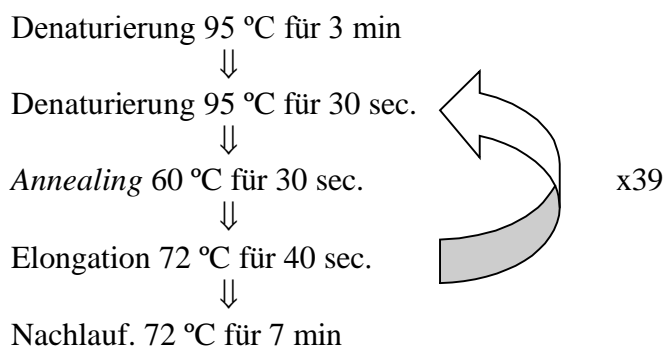
3.1.2 Multiplex-PCR

Um die Anzahl der einzelnen PCR möglichst gering zu halten, sollte nun versucht werden, die Amplifikation mehrerer Fragmente im Sinne einer Multiplex-PCR zu kombinieren. Nach den Daten aus den Standard-PCR wurde Multiplex-PCR mit den Primer-

Ergebnisse

paaren von Fibrinogen -455 G/A, GPIIb 2622 T/G und GPIIIa 196 T/C durchgeführt. Die optimale *Annealing*-Temperatur war 55 °C, die Zyklenanzahl 40. Die Spannung des Elektrophoresegerätes war 3 V/cm, die Laufzeit 60 Minuten. Wegen der unterschiedlichen Affinität zum DNA-Template wurde die Konzentration der einzelnen Primerpaare titriert. Durch „Titration“ stellte sich das Primerverhältnis von 25 pM, 4 pM, 2 pM als optimal heraus.

Das Programm für Multiplex-PCR war:



Die DNA-Konzentration in den Produkten der Multiplex-PCR in diesem Schema war im Durchschnitt ca. 140 ng/µl.

In der Abbildung 2 sieht man das Gel. Die Banden zeigen von oben nach unten Fibrinogen -455 G/A (669 Bp), GPIIb 2622 T/G (383 Bp), GPIIIa 196 T/C (278 Bp). Die erste Reihe (ganz links) ist die Positivkontrolle, die letzte (ganz rechts) die Negativkontrolle.

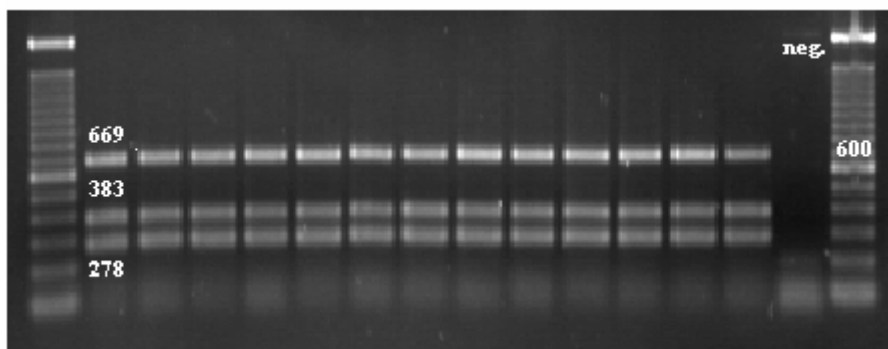


Abbildung 2: Multiplex-PCR von 12 Schlaganfallpatienten Die Banden von oben nach unten; Fibrinogen -455 G/A (669 Bp), GP IIb 2622 T/G (383 Bp), GP IIIa 196 T/C (278 Bp). Ganz unten sind die Banden von Oligonukleotiden zu sehen. An beiden Enden sind 100 Bp Leitern zu sehen. Die dicke Bande in der Leiter entspricht 600 Bp.

3.2 Kasuistik

Mit der Zustimmung der Patientin ED, die in der Einleitung erwähnt wurde, wurde ihre DNA aus EDTA-Blut isoliert. Die fünf Gene, für die eine Modulation der Fibrinogensynthese oder der prokoagulatorischen Wirkung des Fibrinogens gezeigt wurde, wurden mittels PCR amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen SfaN I (IL-6 -174 G/C), Hae III (Fibrinogen -455 G/A), Fok I (GPIIb 2622 T/G) und Msp I (GPIIIa 196 T/C) verdaut und auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 3). Anhand des Schnittmusters konnten die jeweiligen Genotypen zugeordnet werden. Zur Kontrolle wurden die Fragmente zusätzlich sequenziert.

In der Abbildung 3 ist zu sehen, daß die Patientin ED homozygot für das C-Allel des Polymorphismus -174 G/C im Promotor des Interleukin-6-Gens ist. Das Restriktionsenzym SfaN I schneidet nur bei einer Nukleotidensequenz von „5'...GCATC(N)₅▼...3'“. Bei einem Homozygot für das C-Allel ist diese Sequenz in der komplementären DNA „5'...GCATG(N)₅▼...3'“, so daß diese Stelle nicht geschnitten werden kann.

Ergebnisse

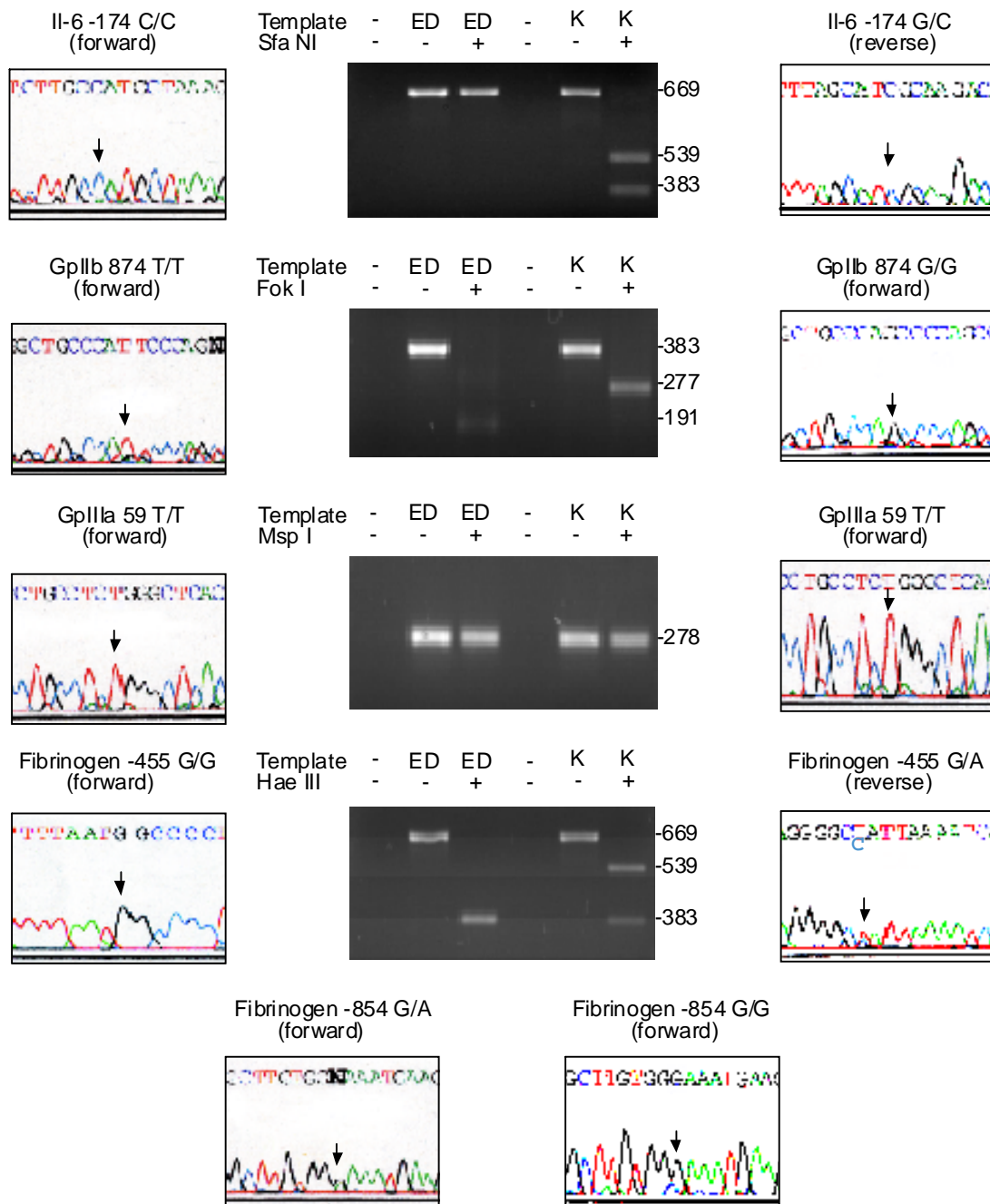


Abbildung 3: Verdau der Patienten-DNA ED und einer Kontroll-DNA nach Amplifikation mit den bezeichneten Restriktionsenzymen. An beiden Seiten sind die entsprechenden Sequenzen dargestellt. Bei Fibrinogen -854 G/A ist die PCR nicht gelungen.

Die Patientin ist homozygot für das G-Allel des Polymorphismus -854 G/A und heterozygot für den Polymorphismus -455 G/A im Promotor der β -Kette des Fibrinogens. Bei dem Fibrinogen -854 G/A Polymorphismus wurde eine Mismatch-PCR versucht, auf welche später detailliert eingegangen wird. Die Diagnose des Polymorphismus in der Kasuistik wurde, da die PCR nicht wie gewünscht gelang, per Sequenzierung festgestellt (Abbildung 3). Bei Homozygoten für das G-Allel des Polymorphismus -455 G/A ist die Bande von 539 Bp nicht zu sehen. Die Stelle „5'...GG[▼]CC...3'“ wird komplett geschnitten, während es bei der heterozygoten Kontrolle nur teilweise geschnitten wird. Die Genotypisierung des Polymorphismus Isoleucin 843 Serin der schweren Kette des GPIIb ergab Homozygotie für T (Isoleucin), was zu einer verstärkten Fibrinogenbindung führen soll (Michelson et al., 2000). Auch hier wird die komplementäre Verdauungsstelle „3'...CCTAC(N)₁₃▲...5'“ komplett verdaut, was sonst zu einem Verbleiben des Bandes 277 Bp führen würde, wie es bei der G (Serin) homozygoten Kontrolle der Fall ist.

Das einen weiteren Risikofaktor darstellende PIA2-Allel des GPIIIa war nicht nachweisbar. Die Patientin ED ist homozygot für T (Leucin) an dieser Stelle. Das 278 Bp Fragment wird nicht geschnitten. Die Homozygotie für PIA2-Allel des GPIIIa ist in der mitteleuropäischen Bevölkerung sehr selten und beträgt ca. 2 % (Unkelbach et al., 1995).

Die Ergebnisse des Restriktionsverdaus wurden durch Sequenzierung der PCR-Produkte überprüft. Diese stimmten mit den Ergebnissen der Restriktionsanalyse überein (Abbildung 3).

3.3 Genotypisierung von Patienten mit einem akuten ischämischen Schlaganfall

3.3.1 Untersuchte Patienten

Zuerst wurden die Akten von 96 Patienten aus der *Strokeunit* des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, die zwischen dem 14.03.2000 und dem 28.08.2000 eingeliefert wurden, untersucht. Davon wurden insgesamt 23 Patienten aus der Studie ausgeschlossen. Bei 3 Patienten waren die Krankenakten für unseren Zweck nicht ausreichend detailliert dokumentiert, 9 Patienten hatten keinen Schlaganfall (Motorradunfall, Myasthenia gravis, Migräne, Meningeosis carcinomatosa usw.), 4 Patienten hatten nur eine Transitorische Ischämische Attacke (TIA) ohne Schlaganfall im eigentlichen Sinne und

4 Patienten hatten einen hämorrhagischen Infarkt. Die letzten beiden Gruppen wurden zum besseren Vergleich von dem Patientenkollektiv ausgeschlossen. Ebenso ausgeschlossen wurden 2 Patienten, die erst Wochen nach dem Schlaganfall aufgenommen wurden. 1 Patient wurde im Zeitraum nach der Entlassung erneut aufgenommen und wurde statistisch nur einmal mitgezählt.

Von den 73 Schlaganfallpatienten waren 40 männlich, 33 weiblich, das Durchschnittsalter der Gesamtgruppe war $64,3 \pm 14,4$ Jahre, der männlichen Patienten $60,8 \pm 14,4$ Jahre, der weiblichen Patienten $68,5 \pm 13,4$ Jahre. Bei Einteilung der Schlaganfalltypen nach den TOAST-Kriterien (Kapitel 2.8.2) hatten 20 Patienten einen Schlaganfall kardioembolischer Genese, 16 Patienten einen Schlaganfall atherothrombotischer Genese, 13 Patienten einen Schlaganfall lakunärer Genese, 20 Patienten einen Schlaganfall unbestimmbarer Genese, 4 Patienten hatten einen Schlaganfall sonstiger Genese (3 Vertebralisdissektionen, 1 Vaskulitis). Die Zeit vom Schlaganfall bis zur Klinikaufnahme entsprach $17,8 \pm 19,4$ Minuten. Zusätzlich wurden SSS der Aufnahme, Anzahl der Patienten, die eine Lysetherapie bekommen haben, die Differenz des SSS bei Entlassung und Aufnahme (Δ SSS) mit und ohne Lysepatienten, Anzahl der Patienten mit TIA und Infarkt in der Anamnese für jeden Typ der Polymorphismen Fibrinogen -455 G/A, GPIIb 2622 T/G und GPIIIa 196 T/C errechnet und verglichen (Tabelle 6, 12, 16).

Auf die Untersuchung des Interleukin-6 Polymorphismus mußten aus Kostengründen des teureren Enzyms Sfa NI verzichtet werden.

3.3.2 Polymorphismus Fibrinogen -455 G/A

3.3.2.1 PCR und Genotypbestimmung

Beim Polymorphismus Fibrinogen -455 G/A konnte ich alle zu untersuchende Segmente erfolgreich durch die PCR amplifizieren. Nach der PCR wurde das Multiplex-PCR-Produkt mit der Restriktionsendonuklease *Hae III* verdaut und die Verdauprodukt auf dem Agarose-Gel durch die Elektrophorese getrennt. Dabei zeigten sich die Banden 539 Bp und 383 Bp klar auf dem Gel, so daß man die Diagnose des Genpolymorphismus auf dem Gel problemlos stellen konnte. Man sah bei den G-Homozygoten nur die 383 Bp Bande, bei A-Homozygoten nur die 539 Bp Bande und beide Banden bei den Heterozygoten (Abbildung 4).

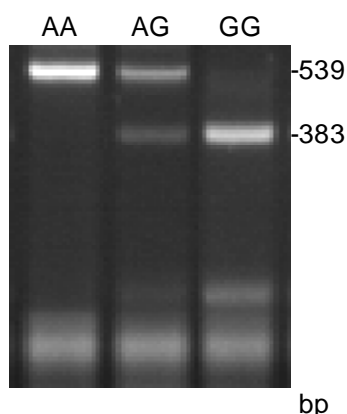


Abbildung 4: Fibrinogen -455 G/A Verdau des Produktes einer Multiplex-PCR mit der Restriktionsendonuklease *Hae III* auf einem Agarose-Gel. Verdauemuster von Polymorphismus Fibrinogen -455 G/A.

3.3.2.2 Unter den A-Allel-Trägern kommt das männliche Geschlecht signifikant häufiger vor. Altersdurchschnitt, *Scandinavian Stroke Score* (SSS) bei Aufnahme und Variabilität des *Scandinavian Stroke Scores* (Δ SSS) war nicht statistisch signifikanter unterschiedlich zwischen G-Homozygoten und A-Allel-Trägern

Von den 73 untersuchten Patienten waren 51 G-homozygot (70 %) (25 männlich/26 weiblich), 20 heterozygot (27 %) (13 männlich/7 weiblich) und 2 A-homozygot (3 %) (2 männlich/0 weiblich). Dieses entsprach 22 A-Allel-Träger (30 %) (15 männlich/7 weiblich).

Um zu überprüfen, ob bei einem Alleltyp eine Geschlechtshäufung vorkommt, wurde die Anzahl der männlichen und weiblichen Patienten von den G-Homozygoten (25 männlich/26 weiblich) und A-Allel-Trägern (15 männlich/7 weiblich) durch den Chi-square Test statistisch verglichen. Es zeigte sich, daß unter den A-Allel-Trägern das männliche Geschlecht signifikant häufiger vorkommt ($p = 0,019$) (Tabelle 6).

Weiter wurden die G-Homozygoten und A-Allel-Träger in den folgenden Punkten verglichen; 1. Altersdurchschnitt („Bekommen die A-Allel-Träger im jüngeren Alter einen Schlaganfall?“), 2. *Scandinavian Stroke Score* bei Aufnahme („Ging es den A-Allel-Träger bei Aufnahme klinisch schlechter?“), 3. Variabilität des *Scandinavian Stroke Scores* (Δ SSS) für die Patienten mit Lysetherapie („Zeigten die A-Allel-Träger während des Krankenaufenthaltes klinisch eher eine Verschlechterung oder Verbesserung?“), 4.

Variabilität des *Scandinavian Stroke Scores* (Δ SSS) für die Patienten ohne Lysetherapie („Zeigten die A-Allel-Träger, wenn man nur die Patienten ohne Lysetherapie vergleicht, während des Krankenhausaufenthaltes klinisch eher eine Verschlechterung oder Verbesserung?) und 5. Anzahl der Patienten, die eine Lysetherapie bei Aufnahme bekommen hat („Die Patienten mit Lysetherapie sollten sich klinisch deutlich gebessert gehabt haben. Hatte eine Allel-Gruppe zufällig häufiger Lysetherapie bekommen?“). Aufgrund der geringen Patientenzahl wurden die A-Homozygoten nicht allein mit den G-Homozygoten verglichen.

1. Der Altersdurchschnitt war $63,9 \pm 13,4$ Jahre für die G-Homozygoten und $65,3 \pm 16,7$ Jahre für die A-Allel-Träger. Der statistische Vergleich durch den U-Test nach Mann und Whitney zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,75$) (Tabelle 6).

2. Der Durchschnitt des *Scandinavian Stroke Score* bei Aufnahme war bei den G-Homozygoten $35,9 \pm 11,8$, bei den A-Allel-Trägern $35,6 \pm 13,7$. Der statistische Vergleich durch den U-Test nach Mann und Whitney zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,508$) (Tabelle 6).

3. Der Durchschnitt der Variabilität des *Scandinavian Stroke Scores* (Δ SSS) für die Patienten mit Lysetherapie war für die G-Homozygoten $8,5 \pm 9,0$, für die A-Allel-Träger $5,0 \pm 12,6$. Der statistische Vergleich durch den U-Test nach Mann und Whitney zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,138$) (Tabelle 6).

4. Der Durchschnitt der Variabilität des *Scandinavian Stroke Scores* (Δ SSS) für die Patienten ohne Lysetherapie war für die G-Homozygoten $7,4 \pm 7,9$, für die A-Allel-Träger $3,9 \pm 11,6$. Der statistische Vergleich durch den U-Test nach Mann und Whitney zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,12$) (Tabelle 6).

5. Durch den Chi-square Test konnte sichergestellt werden, daß keine der beiden Allel-Gruppen zufällig häufiger Lysetherapie bekam ($p = 0,072$).

Es wurde ebenfalls überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen zerebrovaskulärem Rezidivereignis und Alleltypen besteht. Unter den G-Homozygoten hatten 37 Patienten ein zerebrovaskuläres Erstereignis, 14 Patienten hatten ein zerebrovaskuläres Rezidivereignis, unter den A-Allel-Träger hatten 14 Patienten ein zerebrovaskuläres Erstereignis, 8 Patienten hatten ein zerebrovaskuläres Rezidivereignis. Die Anzahl der Patienten wurde durch den Chi-square Test verglichen. Es zeigte sich keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,446$) (Tabelle 6).

Ergebnisse

Die Anzahl der Patienten für die Allel-Gruppen, die G-Homozygoten, die G-Allel-Träger, die Heterozygoten, die A-Allel-Träger und die A-Homozygoten wurden nach den TOAST-Kriterien in atherothrombotische Genese, kardioembolische Genese, mikrovaskuläre Genese, sonstige Genese und unbestimmbare Genese (Genese, die nicht eindeutig in eine bestimmte Gruppe nach den TOAST-Kriterien einzuteilen war) unterteilt und tabellarisch dargestellt (Tabelle 6).

| | G-Homozygote | G-Träger | Heterozygote | A-Homozygote | A-Träger |
|---|--------------|-----------|--------------|--------------|-----------------------------|
| Patienten (männlich/weiblich) n = 73 (40/33) | 51(25/26) | 71(38/33) | 20(13/7) | 2(2/0) | 22(15/7) * |
| Altersdurchschnitt | 63,9 ± 13,4 | 64,0±14,4 | 64,1 ± 17,1 | 77,1 ± 5,2 | 65,3 ± 16,7 ^{n.s.} |
| SSS bei Aufnahme | 35,9 ± 11,8 | 35,2±12,2 | 34,4 ± 13,5 | 48,0 ± 11,3 | 35,6 ± 13,7 ^{n.s.} |
| ΔSSS (mit Lysepatienten) | 8,5 ± 9,0 | 7,4±10,3 | 4,7 ± 13,0 | 8,5 ± 10,6 | 5,0 ± 12,6 ^{n.s.} |
| ΔSSS (ohne Lysepatienten) | 7,4 ± 7,9 | 6,1±9,4 | 3,4 ± 11,9 | 8,5 ± 10,6 | 3,9 ± 11,6 ^{n.s.} |
| Lysetherapie (ja/nein) | 11/40 | 12/59 | 1/19 | 0/2 | 1/21 ^{n.s.} |
| Zerebrovaskuläres Erstereignis (n = 51) | 37 | 40 | 13 | 1 | 14 |
| Zerebrovaskuläres Rezidivereignis (n = 22) | 14 | 21 | 7 | 1 | 8 |
| Schlaganfalltyp: (gesamt n = 73) | (n = 51) | (n = 71) | (n = 20) | (n = 2) | (n = 22) |
| Atherothrombotisch (n = 16) | 10 | 14 | 4 | 2 | 6 |
| Kardioembolisch (n = 20) | 17 | 20 | 3 | 0 | 3 |
| Mikrovaskulär (n = 13) | 8 | 13 | 5 | 0 | 5 |
| Sonstige Genese (n = 4) | 3 | 4 | 1 | 0 | 1 |
| Unbestimmbar (n = 20) | 13 | 20 | 7 | 0 | 7 |

Tabelle 6: Polymorphismus Fibrinogen -455 G/A 73 Patienten: Anzahl der Patienten und Geschlechtsverhältnis (männlich/weiblich), Altersdurchschnitt ± Standardabweichung (± SD), Scandinavian Stroke Score (SSS) bei Aufnahme ± SD, Differenz des SSS bei Aufnahme und Entlassung (ΔSSS) für die Patienten mit Lysetherapie und ohne Lysetherapie ± SD, Anzahl der Patienten mit und ohne Lysetherapie wurde für die G-Homozygoten, die G-Allel-Träger, die Heterozygoten, die A-Allel-Träger und die A-Homozygoten tabellarisch dargestellt. Die G-Homozygoten und die A-Allel-Träger wurden in Geschlechtsverhältnis, Altersdurchschnitt, Scandinavian Stroke Score (SSS) bei Aufnahme und in der Differenz des SSS bei Aufnahme und Entlassung (ΔSSS) für die Patienten mit Lysetherapie und ohne Lysetherapie durch den U-Test nach Mann und Whitney verglichen. Es zeigte sich, daß unter den A-Allel-Trägern signifikant häufiger das männliche Geschlecht vorkommt (p = 0,019). Die G-Homozygoten und die A-Allel-Träger wurden in Anzahl der Patienten mit und ohne Lysetherapie, in Anzahl der Patienten mit Rezidivschlaganfall durch den Chi-square Test verglichen. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (p > 0,05). Für jede oben genannte Allel-Gruppe wurde die Anzahl der Patienten nach der Schlaganfallgenese nach TOAST unterteilt und tabellarisch dargestellt. Die beiden Gruppen „G-Homozygote“ und „A-Träger“, die statistisch verglichen wurden, sind grau markiert.

3.3.2.3 Das A-Allel des Polymorphismus -455 G/A kommt unter den Patienten mit atherothrombotischen Schlaganfall in Vergleich zu den Patienten mit kardioembolischen Schlaganfall signifikant häufiger vor

Die Allelzahl und die Allelfrequenz des Polymorphismus Fibrinogen -455 G/A wurden für jede Schlaganfallgenese nach den TOAST-Kriterien berechnet und tabellarisch dargestellt (Tabelle 7).

Bei den 73 untersuchten Patienten war die Allelzahl 122 für das G-Allel und 24 für das A-Allel, die Allelfrequenz für das A-Allel war 0,16. Von 73 untersuchten Patienten hatten 16 Patienten einen Schlaganfall atherothrombotischer, 20 Patienten einen kardioembolischer, 13 Patienten einen mikrovasculärer und 4 Patienten einen sonstiger Ursachen. Die Allelzahl des G-Allels und A-Allels waren 24 und 8 bei den Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer Genese, 37 und 3 bei den Patienten mit einem kardioembolischer, 21 und 5 bei den Patienten mit einem mikrovasculärer und 7 und 1 bei den Patienten mit einem sonstiger Ursachen. Die A-Allelfrequenz war 0,25 bei den Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer, 0,08 bei den Patienten mit einem kardioembolischer, 0,19 bei den Patienten mit einem mikrovasculärer und 0,13 bei den Patienten mit einem sonstiger Ursachen.

Von den 73 Patienten hatten 20 Patienten einen Schlaganfall durch eine unbestimmbare Ursache, die nicht eindeutig in eine der oben genannten Gruppe eingeteilt werden konnte. Die Allelhäufigkeit war bei ihnen 33 G-Allel und 7 A-Allel, die A-Allelfrequenz war 0,18. Durch CCT-Befunde konnte diese Gruppe in eine Gruppe mit einem bildmorphologisch makroangiopathischen Schlaganfall und in eine Gruppe mit einem bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall unterteilt werden. Von ihnen hatten 12 Patienten einen bildmorphologisch makroangiopathischen, 8 Patienten hatten einen bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall. Die Allelzahl des G-Allels und des A-Allels waren 19 und 5 für die Patienten mit einem bildmorphologisch makroangiopathischen, 15 und 1 für die Patienten mit einem bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall. Die A-Allelfrequenz war 0,21 für die Patienten mit einem bildmorphologisch makroangiopathischen, 0,06 für die Patienten mit einem bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall (Tabelle 7).

Die Allelzahl für die Gruppe mit der Schlaganfallgenese „atherothrombotisch“, „kardioembolisch“ und „mikrovasculär“ wurden durch den Chi-square Test miteinander

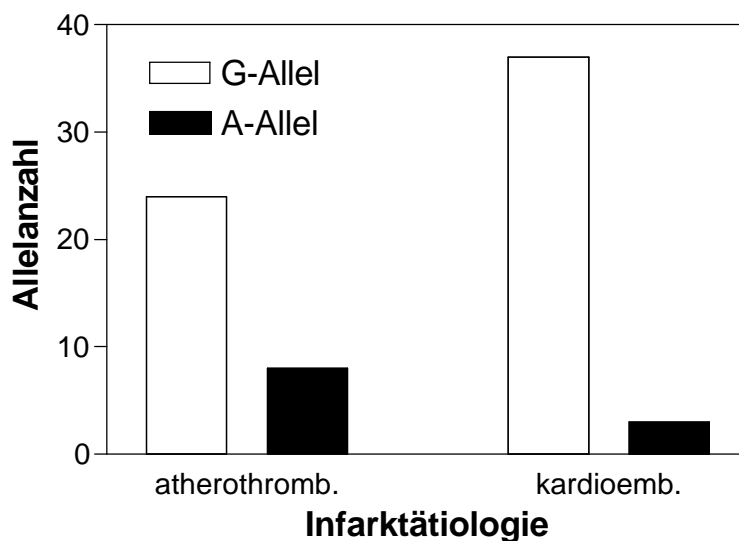
Ergebnisse

verglichen. Die Allelfrequenz des A-Allels zeigte zwischen den Patientengruppen mit einem Schlaganfall atherothrombotischer und kardioembolischer Schlaganfallgenese einen signifikanten Unterschied. Unter den Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer Genese war die Allelhäufigkeit für A-Allel des Polymorphismus -455 G/A in Vergleich zu den Patienten mit einem Schlaganfall kardioembolischer Genese signifikant höher ($p = 0,04$) (Tabelle 7 und Diagramm 2).

Die Vergleich zwischen „atherothrombotisch“ und „mikrovaskulär“ ($p = 0,6$), „kardioembolisch“ und „mikrovaskulär“ ($p = 0,154$) zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied (Tabelle 7).

| | Fib -455 G/A | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|---------------|------------|------------|
| | Allelzahl G/A (Allelfrequenz A) | Atherothromb. | Kardioemb. | Mikrovask. |
| Allelzahl (73x2) | 122/24 (0,16) | | | |
| Schlaganfalltyp (Allelzahl) | | | | |
| • Atherothrombotisch (16x2) | 24/8 (0,25) | - | * | n.s. |
| • Kardioembolisch (20x2) | 37/3 (0,08) | * | - | n.s. |
| • Mikrovaskulär (13x2) | 21/5 (0,19) | n.s. | n.s. | - |
| • Sonstige Genese (4x2) | 7/1 (0,13) | | - | |
| • Unbestimmbar (20x2) | 33/7 (0,18) | | - | |
| - Makroangiopathisch (12x2) | 19/5 (0,21) | | | |
| - Mikroangiopathisch (8x2) | 15/1(0,06) | | | |

Tabelle 7: Polymorphismus Fibrinogen -455 G/A Allelhäufigkeit und Allelfrequenz für jede Schlaganfallgenese. Die 73 Patienten wurden in Schlaganfalltypen nach TOAST-Kriterien eingeteilt und die Allelzahl und A-Allelhäufigkeit tabellarisch dargestellt. Die Allelhäufigkeit für die Schlaganfallpatienten mit atherothrombotischer Genese, kardioembolischer Genese und mikrovaskulärer Genese wurden durch den Chi-square Test miteinander verglichen. Die A-Allel zeigte eine signifikant höhere Allelfrequenz ($P = 0,04$) in der Patientengruppe mit atherothrombotischer Schlaganfallgenese im Vergleich zu der Gruppe mit kardioembolischer Schlaganfallgenese. Die Patienten mit Schlaganfall sonstiger Genese wurden wegen ihrer heterogenen Pathophysiologie und geringeren Anzahl der Patienten nicht in den Vergleich einbezogen. * = signifikant ($P < 0,05$), n.s. = nicht signifikant ($P > 0,05$).



| Infarktätio-logie | G | A |
|-------------------|------|-----|
| atherothromb. | 24.0 | 8.0 |
| kardioemb. | 37.0 | 3.0 |

Diagramm 2: Häufigkeitsverteilung der A- und G-Allele in der atherothrombotischen und kardioembolischen Infarktgruppe In der atherothrombotischen Infarktgruppe (n = 16) waren die Allelhäufigkeit für A-Allel 0,25, für die kardioembolischen Infarktgruppe (n = 20) 0,08. Die statistische Analyse durch den Chi-square Test zeigte, daß die A-Allelhäufigkeit in der atherothrombotischen Infarktgruppe signifikant höher ist als in der kardioembolischen Infarktgruppe. (P < 0,05)

3.3.2.4 Es gibt keine signifikante Häufung des A-Allels in der Patientengruppe mit einem zerebrovaskulären Rezidivschlaganfall in Vergleich zu der Gruppe mit einem zerebrovaskulären Erstereignis

Die untersuchten 73 Patienten wurden im Weiteren in eine Gruppe mit einem oder mehreren zerebrovaskulären Rezidivereignissen und in eine Gruppe mit Erstereignis unterteilt. 22 Patienten hatten ein oder mehrere Rezidivereignisse, 51 Patienten hatten ihr zerebrovaskuläres Erstereignis. In der Patientengruppe mit Rezidivschlaganfall hatten 8 Patienten einen Schlaganfall atherothrombotischer, 4 Patienten einen kardioembolischer, 3 Patienten einen mikrovaskulärer Genese, kein Patient hatte einen Schlaganfall sonstiger Genese. 7 Patienten hatten einen Schlaganfall nicht bestimmbarer Genese, die nicht eindeutig in eine der oben genannten Gruppe eingeteilt werden konnte. Von ihnen

hatten 3 Patienten einen bildmorphologisch makroangiopathischen, 4 Patienten hatten einen bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall (Tabelle 8).

In der Patientengruppe mit zerebrovaskulären Erstereignis hatten 8 Patienten einen Schlaganfall atherothrombotischer, 16 Patienten einen kardioembolischer, 10 Patienten einen mikrovaskulärer, 4 Patienten einen sonstiger Genese. 9 Patienten hatten einen bildmorphologisch makroangiopathischen Schlaganfall unbestimmbarer Genese und 4 Patienten hatten einen bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall unbestimmbarer Genese (Tabelle 8).

In der Patientengruppe mit Rezidivschlaganfall war die Allelzahl des G-Allels und A-Allels 35 und 9 für die Gesamtgruppe (A-Allelfrequenz 0,21), 12 und 4 für die atherothrombotische (A-Allelfrequenz 0,25), 7 und 1 für die kardioembolische (A-Allelfrequenz 0,13), 5 und 1 für die mikrovaskuläre Genese (A-Allelfrequenz 0,17), 5 und 1 für die bildmorphologisch makroangiopathische unbestimmbare Genese (A-Allelfrequenz 0,17) und 7 und 1 für die bildmorphologisch mikroangiopathische unbestimmbare Genese (A-Allelfrequenz 0,13) (Tabelle 8).

In der Patientengruppe mit zerebrovaskulären Erstereignis waren die Allelzahl des G-Allels und A-Allels 87 und 15 für die Gesamtgruppe (A-Allelfrequenz 0,15), 12 und 4 für die atherothrombotische (A-Allelfrequenz 0,25), 30 und 2 für die kardioembolische (A-Allelfrequenz 0,06), 16 und 4 für die mikrovaskuläre (A-Allelfrequenz 0,2), 7 und 1 für die sonstige Genese (A-Allelfrequenz 0,13), 14 und 4 für die bildmorphologisch makroangiopathische Genese (A-Allelfrequenz 0,22) und 8 und 0 für die bildmorphologisch mikroangiopathische Genese (A-Allelfrequenz 0) (Tabelle 8).

Die Allelhäufigkeit für jede Schlaganfallgenese der beiden Gruppen wurde durch den Chi-square Test verglichen. Es zeigten sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05 = \text{n.s.}$) (Tabelle 8)

| | Fib -455 G/A | | | | | | |
|--|------------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|
| | Allelzahl G/A (Allelfrequenz A) | A | K | M | S | U | |
| | | | | | | Makro | Mikro |
| Zerebrovaskuläres Rezidivereignis (22x2) | 35/9 (0,21) | 12/4 (0,25) | 7/1 (0,13) | 5/1 (0,17) | 0/0 (0) | 5/1 (0,17) | 7/1 (0,13) |
| Zerebrovaskuläres Erstereignis(51x2) | 87/15 (0,15) n.s. | 12/4 (0,25) n.s. | 30/2 (0,06) n.s. | 16/4 (0,2) n.s. | 7/1 (0,13) n.s. | 14/4 0,22 n.s. | 8/0 (0) n.s. |

Tabelle 8: Polymorphismus Fibrinogen -455 G/A Unterteilung in zerebrovaskuläres Rezidivereignis und Erstereignis. Allelzahl und Allelfrequenz für jede Schlaganfallgenese wurden tabellarisch dargestellt. (A = atherothrombotisch, K = kardioembolisch, M = mikrovaskulär, S = sonstige Genese, U = unbestimmbare Genese). Die Verteilung der Allelhäufigkeit für die Gruppen, mit Rezidivereignis und mit zerebrovaskulärem Erstereignis, wurde für jede Schlaganfallgenese durch den Chi-square Test miteinander verglichen. n.s. = nicht signifikant ($P > 0,05$).

3.3.2.5 Bei Patienten mit zerebrovaskulärem Erstereignis ist die Häufung des A-Allels des Polymorphismus -455 G/A unter den Patienten mit atherothrombotischem Schlaganfall nicht mehr signifikant in Vergleich zu den Patienten mit kardioembolischem Schlaganfall

Um zu überprüfen, ob in der Patientengruppe mit zerebrovaskulärem Erstereignis die Allelhäufigkeit für A-Allel des Polymorphismus -455 G/A unter den Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer Genese in Vergleich zu den Patienten mit Schlaganfall kardioembolischer Genese auch signifikant erhöht ist, wie es bei den oben genannten 73 Patienten war, wurde diese Fragestellung bei den 51 Patienten mit zerebrovaskulärem Erstereignis untersucht.

Bei den 51 untersuchten Patienten mit zerebrovaskulärem Erstereignis war die Allelzahl 87 für das G-Allel und 15 für das A-Allel, die Allelfrequenz für das A-Allel war 0,15. Von 51 untersuchten Patienten hatten 16 Patienten einen Schlaganfall atherothrombotischer, 16 Patienten einen kardioembolischer, 10 Patienten einen mikrovaskulärer und 4 Patienten einen sonstiger Ursache. Die Allelzahl des G-Allels und A-Allels waren 12 und 4 bei den Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer Genese, 30 und 2 bei den Patienten mit einem kardioembolischer, 16 und 4 bei den Patienten mit einem mikrovaskulärer und 7 und 1 bei den Patienten mit einem sonstiger

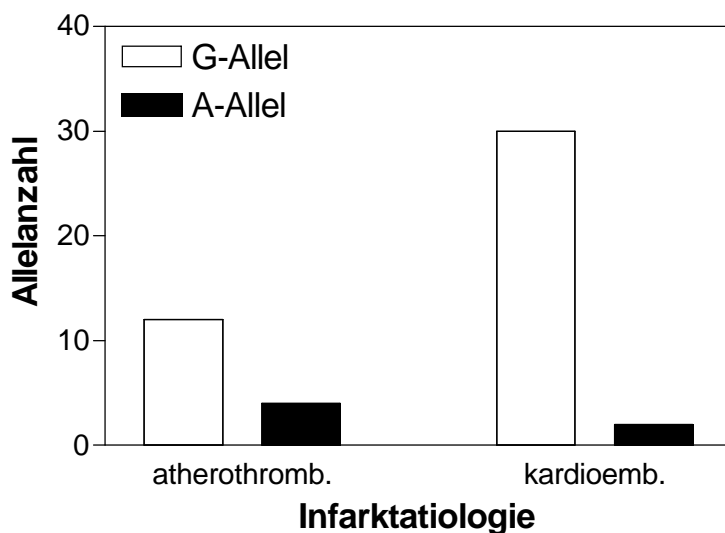
Genese. Die A-Allelfrequenz war 0,25 bei den Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer, 0,06 bei den Patienten mit einem kardioembolischer, 0,2 bei den Patienten mit einem mikrovaskulärer und 0,13 bei den Patienten mit einem sonstiger Ursache. Von den 51 Patienten hatten 13 Patienten einen Schlaganfall unbestimmbarer Ursache. Bei ihnen war die Allelhäufigkeit 22 G-Allele und 4 A-Allele, die A-Allelfrequenz war 0,15. Durch CCT-Befunde konnte diese Patienten in eine Gruppe mit einem bildmorphologisch makroangiopathischen Schlaganfall und in eine Gruppe mit einem bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall unterteilt werden. Von den 13 Patienten hatten 8 Patienten einen bildmorphologisch makroangiopathischen, 4 Patienten hatten einen bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall. Die Allelzahl des G-Allels und des A-Allels waren 14 und 4 für die Patienten mit einem bildmorphologisch makroangiopathischen, 8 und 0 für die Patienten mit einem bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall. Die A-Allelfrequenz war 0,22 für die Patienten mit einem bildmorphologisch makroangiopathischen, 0 für die Patienten mit einem bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall (Tabelle 9).

Die Allelzahl für die Gruppe mit der Schlaganfallgenese „atherothrombotisch“, „kardioembolisch“ und „mikrovaskulär“ wurden durch den Chi-square Test miteinander verglichen. Die Allelfrequenz des A-Allel zeigte zwischen den beiden Patientengruppen mit einem Schlaganfall atherothrombotischer und kardioembolischer Schlaganfallgenese zwar aufgrund geringer Patientenzahl keinen signifikanten Unterschied, jedoch eine klare Tendenz blieb wie bei den 73 Patienten, so daß die Allelhäufigkeit des A-Allels unter den Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer Genese in Vergleich zu den Patienten mit einem Schlaganfall kardioembolischer Genese deutlich höher war ($p = 0,064$) (Tabelle 9 und Diagramm 3). Der Vergleich zwischen „atherothrombotisch“ und „mikrovaskulär“ ($p = 0,72$), „kardioembolisch“ und „mikrovaskulär“ ($p = 0,131$) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied (Tabelle 9). Die Patientengruppe mit einer sonstigen Schlaganfallgenese wurde aufgrund ihrer heterogenen Pathophysiologie (Vertebraldissektionen und Vaskulitis) und ihrer geringen Anzahl nicht zum statistischen Vergleich herangezogen.

Ergebnisse

| | Fib -455 G/A | | | |
|----------------------------|------------------------------------|---------------|------------|------------|
| | Allelzahl G/A (Allelfrequenz A) | Atherothromb. | Kardioemb. | Mikrovask. |
| Allelzahl (51x2) | 87/15 (0,15) | | | |
| Schlaganfalltyp | | | | |
| • Atherothrombotisch (8x2) | 12/4 (0,25) | - | n.s. | n.s. |
| • Kardioembolisch (16x2) | 30/2 (0,06) | n.s. | - | n.s. |
| • Mikrovaskulär (10x2) | 16/4 (0,2) | n.s. | n.s. | - |
| • Sonstige Genese (4x2) | 7/1 (0,13) | | - | |
| • Unbestimmbar (13x2) | 22/4 (0,15) | | - | |
| - Makroangiopathisch (9x2) | 14/4 (0,22) | | | |
| - Mikroangiopathisch (4x2) | 8/0 (0) | | | |

Tabelle 9: Polymorphismus Fibrinogen -455 G/A Allelhäufigkeit und Allelfrequenz für jeden Schlaganfalltyp bei 51 Patienten mit zerebrovaskulärem Erstereignis. Die 51 Patienten mit zerebrovaskulärem Erstereignis wurden in Schlaganfallgenese nach TOAST-Kriterien eingeteilt und die Allelzahl und A-Allelfrequenz tabellarisch dargestellt. Die Allelhäufigkeit für die Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer Genese, kardioembolischer Genese und mikrovaskulärer Genese wurde durch den Chi-square Test miteinander verglichen. Die Patienten mit einem Schlaganfall sonstiger Schlaganfallgenese wurden wegen ihrer heterogenen Pathophysiologie und geringeren Anzahl der Patienten nicht in den Vergleich einbezogen. Die Patienten mit einem Schlaganfall unbestimmbarer Genese wurden nach den CCT-Befunden weiter in die bildmorphologisch mikroangiopathische und bildmorphologisch makroangiopathische Gruppe unterteilt. * = signifikant ($P < 0,05$), n.s. = nicht signifikant ($P > 0,05$).



| | G-Allel | A-Allel |
|---------------|---------|---------|
| atherothromb. | 12.0 | 4.0 |
| kardioemb. | 30.0 | 2.0 |

Diagramm 3: Häufigkeitsverteilung der A- und G-Allele in der atherothrombotischen und kardioembolischen Infarktgruppen bei zerebrovaskulärem Erstereignis
 In der atherothrombotischen Infarktgruppe (n = 8) war die Allelhäufigkeit für A-Allel 0,25, für die kardioembolischen Infarktgruppe (n = 16) 0,06. Die statistische Analyse durch den Chi-square Test zeigte, daß die A-Allelhäufigkeit in der atherothrombotischen Infarktgruppe nicht signifikant höher lag als in der kardioembolischen Infarktgruppe (P = 0,064), die Tendenz, daß die A-Allelhäufigkeit bei den Patienten mit atherothrombotischer Schlaganfallgenese in Vergleich zu bei den Patienten mit kardioembolischer Schlaganfallgenese deutlich höher war, ist deutlich zu erkennen.

3.3.2.6 Der Fibrinogen-Plasmaspiegel zeigte nach einem makrovaskulären Schlaganfall bei den A-Allel-Trägern des Beta-Fibrinogen Polymorphismus -455 G/A eine größere Schwankung als bei den G-Homozygoten

Um die Hypothese zu prüfen, ob der Fibrinogen Polymorphismus -455 G/A in der Regulation des Fibrinogenspiegels eine Rolle spielt und Fibrinogen nach einem Schlaganfall in Rahmen der Akut-Phase-Reaktion bei den A-Allel-Träger stärker erhöht ist, wurden die Fibrinogen-Plasmaspiegel der G-Homozygoten und der A-Allel-Trägern untersucht. Als Kontrolle wurden neben dem Fibrinogen-Plasmaspiegel die zwei weiteren klinisch wichtigen Entzündungsparameter, Leukozytenzahl und CRP-Plasmaspiegel untersucht.

38 Patienten mit Faktoren, die den Fibrinogen-Plasmaspiegel beeinflussen (Infektionen, Z.n. Operation, chronisch entzündliche Erkrankungen, usw.), wurden aus der ursprünglichen Patientengruppe ausgeschlossen. Nach dem Ausschluß verblieben 35 Patienten. Eine statistische Untersuchung in dieser Subgruppe zeigte eine Differenz des Fibrinogen-Plasmaspiegels für G-Homozygoten und A-Allel-Träger bei Patienten mit makroangiopathischem Schlaganfall. Um das Ergebnis zu bestätigen, wurden gezielt zusätzliche 25 Patienten mit makroangiopathischem Schlaganfall herangezogen und untersucht. Die neu gebildete Patientengruppe mit makroangiopathischem Schlaganfall umfaßte 60 Patienten (35 männlich, 25 weiblich). 38 Patienten waren homozygot für G-Allel, 19 heterozygot und 3 homozygot für A-Allel. Das Durchschnittsalter der Gruppe lag bei $69,0 \pm 14,4$ Jahre, bei den männlichen Patienten lag es bei $66,2 \pm 14,4$ Jahren, bei den weiblichen Patienten lag es bei $72,9 \pm 13,6$ Jahren. Der makroangiopathische Schlaganfall zeigte bei allen Patienten einen eindeutigen Territorialinfarkt im CCT, entspricht daher den Gruppen „zerebrale Ischämie durch Atherosklerose der großen hirnversorgenden Arterien“ (n = 17) und „zerebrale Ischämie unbestimmbarer Ätiologie“ (n = 21) nach TOAST-Kriterien. Die betroffenen Gefäße waren in 52 Fällen das Stromgebiet der Arteria cerebri media, in 8 Fällen das Stromgebiet der Arteria cerebri posterior und kein Fall im Stromgebiet der Arteria cerebri anterior.

Die Fibrinogen-Plasmaspiegel wurden aus den regelmäßig durchgeführten Routinelaboruntersuchungen auf der *Strokeunit* übernommen. Die Durchschnittswerte des Fibrinogen-Plasmaspiegels sowie die Maximalwerte, die Minimalwerte und die Variabilität des Fibrinogen-Plasmaspiegels (Maximalwerte - Minimalwerte) wurden bestimmt (Tabelle 10). Die Durchschnittswerte des Fibrinogen-Plasmaspiegels und deren Standardabweichung wurden für die G-Homozygoten und die A-Allel-Träger getrennt berechnet. Die Werte der beiden Gruppen wurden durch den U-Test nach Mann und Whitney statistisch verglichen.

Die Variabilität des Fibrinogen-Plasmaspiegels war bei den A-Allel-Trägern in Vergleich zu den G-Homozygoten signifikant größer ($p = 0,031$) (Diagramm 4). Dieses bedeutet, daß der Fibrinogen-Plasmaspiegel nach einem makrovaskulären Schlaganfall in der Akutphase bei den A-Allel-Trägern eine größere Schwankung zeigt im Vergleich zu den G-Homozygoten. Die Variabilität bei den G-Homozygoten betrug $1,25 \pm 0,29$ g/l, bei den A-Allel-Träger $1,39 \pm 0,30$ g/l.

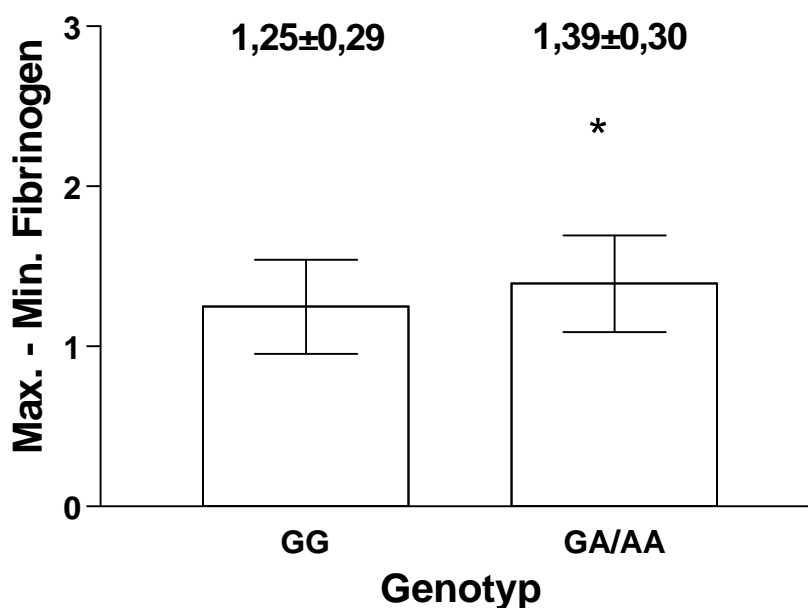


Diagramm 4: Variabilität (Max-Min) des Fibrinogen-Plasmaspiegels bei Fibrinogen -455 Polymorphismus Die Variabilität bei den G-Homozygoten (GG) war $1,25 \pm 0,29$, bei den A-Allel-Trägern $1,39 \pm 0,30$. Statistisch signifikante Unterschied zwischen beiden Gruppen durch den U-Test nach Mann und Whitney ($p < 0,031$).

Als Vergleich wurden ebenfalls für den CRP-Plasmaspiegel und die Leukozytenzahl die Werte bei der Aufnahme, die Durchschnittswerte während des Krankenhausaufenthalts sowie deren Maximalwerte und Minimalwerte inklusiv der Variabilität (Maximalwerte - Minimalwerte) erfaßt und tabellarisch dargestellt (Tabelle 10).

Der CRP-Plasmaspiegel bei Aufnahme war für G-Homozygote $21,9 \pm 37,8$ mg/l und A-Allel-Träger $16,1 \pm 31,2$ mg/l, die Durchschnittswerte während des Krankenhausaufenthalts waren $24,9 \pm 34,0$ mg/l und $9,4 \pm 2,7$ /nl, die Maximalwerte $35,0 \pm 52,3$ mg/l und $39,2 \pm 47,7$ mg/l, die Minimalwerte $14,97 \pm 18,77$ mg/l und $15,64 \pm 29,15$ mg/l und die Variabilität (Maximalwerte - Minimalwerte) war $2,96 \pm 6,44$ mg/l und $4,11 \pm 5,44$ mg/l (Tabelle 10).

Die Leukozytenzahl bei Aufnahme war für die G-Homozygote und die A-Allel-Träger $9,0 \pm 3,6$ /nl und $9,4 \pm 2,7$ /nl, die Durchschnittswerte während des Krankenhausaufenthalts $9,0 \pm 3,3$ /nl und $9,9 \pm 2,6$ /nl, die Maximalwerte $10,0 \pm 3,7$ /nl und $11,3 \pm 3,2$ /nl,

Ergebnisse

die Minimalwerte $8,1 \pm 2,9$ /nl und $8,5 \pm 2,4$ /nl und die Variabilität (Maximalwerte - Minimalwerte) war $1,24 \pm 0,20$ /nl und $1,37 \pm 0,40$ /nl (Tabelle 10).

Die Werte der beiden Gruppen wurden durch den U-Test nach Mann und Whitney statistisch verglichen. Sie zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p > 0,05$) (Tabelle 10).

| | | G-Homozygote (n = 38) | A-Allel-Träger (n = 22) | U-Test |
|-------------------------------|------------|--------------------------|----------------------------|--------|
| Aufnahme | Fibrinogen | 4,1±1,3 g/l | 4,1±1,8 g/l | n.s. |
| | CRP | 21,9±37,8 mg/l | 16,1±31,2 mg/l | n.s. |
| | Leukozyten | 9,0±3,6 /nl | 9,4±2,7 /nl | n.s. |
| Durchschnitt | Fibrinogen | 4,4±1,2 g/l | 4,4±1,5 g/l | n.s. |
| | CRP | 24,9±34,0 mg/l | 25,2±34,0 mg/l | n.s. |
| | Leukozyten | 9,0±3,3 /nl | 9,9±2,6 /nl | n.s. |
| Maximum | Fibrinogen | 4,7±1,3 g/l | 5,0±1,8 g/l | n.s. |
| | CRP | 35,0±52,3 mg/l | 39,2±47,7 mg/l | n.s. |
| | Leukozyten | 10,0±3,7 /nl | 11,3±3,2 /nl | n.s. |
| Minimum Fibrinogen | | 3,98±1,25 g/l | 3,72±1,50 g/l | n.s. |
| | CRP | 14,97±18,77 mg/l | 15,64±29,15 mg/l | n.s. |
| | Leukozyten | 8,1±2,9 /nl | 8,5±2,4 /nl | n.s. |
| Variabilität (Max. - Min.) | Fibrinogen | 1,25±0,29 g/l | 1,39±0,30 g/l | * |
| | CRP | 2,96±6,44 mg/l | 4,11±5,44 mg/l | n.s. |
| | Leukozyten | 1,24±0,20 /nl | 1,37±0,40 /nl | n.s. |

Tabelle 10: Plasmapwerte für Fibrinogen, CRP und Leukozyten bei Fibrinogen -455 Polymorphismus Dargestellt wurden die Durchschnittswerte \pm Standardabweichung (\pm SD) für die G-Homozygoten und die A-Allel-Träger bei der Aufnahme, Durchschnittswerte während des Krankenhausaufenthaltes, Maximalwerte, Minimalwerte und Variabilität (Maximalwert - Minimalwert) für den Fibrinogen-Plasmaspiegel, den CRP-Plasmaspiegel und die Leukozytenzahl. Die Variabilität der G-Homozygoten und der A-Allel-Träger zeigte sich statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Keine statistisch signifikanten Unterschiede fanden sich bei CRP- und Leukozytenwerten. Die Werte für die G-Homozygoten und die A-Allel-Träger wurden durch den U-Test (nach Mann und Whitney) verglichen. * = signifikant ($P < 0,05$), n.s. = nicht signifikant ($P > 0,05$).

3.3.3 Polymorphismus GPIIb 2622 T/G (Ile 843 Ser)

3.3.3.1 PCR, Southern-Blot und Genotypbestimmung

Beim Polymorphismus GPIIb 2622 T/G konnte ich alle zu untersuchenden Segmente erfolgreich durch die PCR amplifizieren. Nach der PCR wurde das Multiplex-PCR-Produkt mit der Restriktionsendonuklease *Fok I* verdaut und das Verdauprodukt auf dem Agarose-Gel durch die Elektrophorese getrennt. Nach Übertragung der DNA im Southern-Blot Verfahren auf eine Membran wurden die 278 Bp- und 186 Bp-Banden mittels Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden dargestellt. Die Diagnose des Genpolymorphismus konnte auf der Membran problemlos gestellt werden. Man sah bei den G-Heterozygoten nur die 278 Bp Bande, bei T-Heterozygoten nur die 186 Bp Bande und beide Banden bei den Heterozygoten (Abbildung 5).

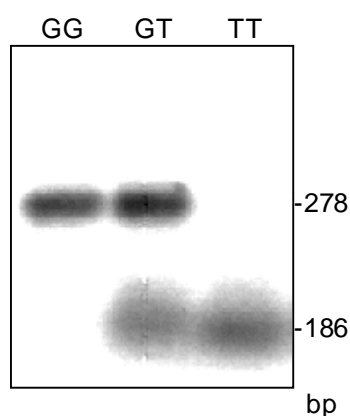


Abbildung 5: GPIIb 2622 T/G Autoradiogramm eines Southern-Blot von einem Agarose-Gel. Hier wurden die Banden mit 278 Bp und 186 Bp durch radioaktive Sonden markiert und dargestellt. Homozygot GG (Ile/Ile), Heterozygot GT (Ile/Ser), Homozygot TT (Ser/Ser)

3.3.3.2 Statistisch gibt es keinen Unterschied zwischen Alleltypen des Polymorphismus GPIIb 2622 T/G bei der Geschlechtsverteilung, dem Altersdurchschnitt, dem *Scandinavian Stroke Score* (SSS) bei Aufnahme und bei der Variabilität des *Scandinavian Stroke Scores* (Δ SSS)

Von den 73 untersuchten Patienten waren 20 T-homozygot (27,4 %) (8 männlich/12 weiblich), 34 T/G-heterozygot (46,6 %) (24 männlich/10 weiblich) und 19 G-

homozygot (26,0 %) (8 männlich/11 weiblich). Dies entsprach 53 G-Allel-Trägern (74,0 %) (32 männlich, 21 weiblich).

Um zu überprüfen, ob bei einem Alleltyp eine Geschlechtshäufung vorkommt, wurde die Anzahl der männlichen und weiblichen Patienten von den T-Homozygoten (8 männlich/12 weiblich) mit den G-Allel-Trägern (32 männlich/21 weiblich) und den G-Homozygoten (8 männlich/11 weiblich) durch den Chi-square Test statistisch verglichen. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (T-Homozygoten vs. G-Allel-Träger $p = 0,119$; T-Homozygote vs G-Homozygote $p = 0,894$). (Tabelle 11).

Bei dem Polymorphismus GPIIb 2622 T/G wurden ähnlich wie bei der Untersuchung des Polymorphismus Fibrinogen -455 die T-Homozygoten mit G-Allel-Träger und G-Homozygoten in den folgenden Punkten verglichen: 1. Altersdurchschnitt, 2. *Scandinavian Stroke Score* bei der Aufnahme, 3. Variabilität des *Scandinavian Stroke Scores* (Δ SSS) für die Patienten mit Lysetherapie, 4. Variabilität des *Scandinavian Stroke Scores* (Δ SSS) für die Patienten ohne Lysetherapie und 5. Anzahl der Patienten, die eine Lysetherapie bei Aufnahme bekommen haben.

1. Der Altersdurchschnitt war $65,8 \pm 13,4$ Jahre für die T-Homozygote, $63,7 \pm 14,7$ Jahre für die G-Allel-Träger und $59,5 \pm 14,3$ Jahre für G-Homozygoten. Der statistische Vergleich durch den U-Test nach Mann und Whitney zeigte keinen signifikanten Unterschied (T-Homozygote vs G-Allel-Träger $p = 0,131$; T-Homozygote vs G-Homozygote $p = 0,206$) (Tabelle 11).

2. Der Durchschnitt des *Scandinavian Stroke Score* bei Aufnahme war bei den T-Homozygoten $33,1 \pm 14,8$, bei den G-Allel-Trägern $36,5 \pm 11,2$ und bei den G-Homozygoten $38,3 \pm 8,4$. Der statistische Vergleich durch den U-Test nach Mann und Whitney zeigte keinen signifikanten Unterschied (T-Homozygote vs G-Allel-Träger $p = 0,414$, T-Homozygote vs G-Homozygote $p = 0,332$) (Tabelle 11).

3. Der Durchschnitt der Variabilität des *Scandinavian Stroke Scores* (Δ SSS) für die Patienten mit Lysetherapie war $6,1 \pm 8,3$ für die T-Homozygoten, $7,9 \pm 10,9$ für die G-Allel-Träger und $10,4 \pm 8,7$ für die G-Homozygoten. Der statistische Vergleich durch den U-Test nach Mann und Whitney zeigte keinen signifikanten Unterschied (T-Homozygote vs G-Allel-Träger $p = 0,404$; T-Homozygote vs G-Homozygote $p = 0,125$) (Tabelle 11).

4. Der Durchschnitt der Variabilität des *Scandinavian Stroke Scores* (Δ SSS) für die Patienten ohne Lysetherapie war für die T-Homozygoten $6,1 \pm 7,4$, für die G-Allel-Träger $6,2 \pm 10,1$ und für die G-Homozygoten $8,9 \pm 7,0$. Der statistische Vergleich durch den U-Test nach Mann und Whitney zeigte keinen signifikanten Unterschied (T-Homozygote vs G-Allel-Träger $p = 0,787$; T-Homozygote vs G-Homozygote $p = 0,288$) (Tabelle 11).

5. Durch den Chi-square Test konnte sichergestellt werden, daß die T-Homozygotengruppe im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen nicht zufällig häufiger Lysetherapie bekam (T-Homozygote vs G-Allel-Träger $p = 0,614$; T-Homozygote vs G-Homozygote $p = 0,639$).

Es wurde ebenfalls überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen zerebrovaskulären Rezidivereignissen und Genotyp besteht. Unter den T-Homozygoten hatten 15 Patienten ihr zerebrovaskuläres Erstereignis, 5 Patienten hatten Rezidivereignis, unter den G-Allel-Träger hatten 36 Patienten Erstereignis, 17 Patienten Rezidivereignis, unter den G-Homozygoten 14 Patienten Erstereignis, 5 Patienten hatten zerebrovaskuläres Rezidivereignis. Die Anzahl der Patienten wurde durch den Chi-square Test verglichen. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (T-Homozygote vs G-Allel-Träger $p = 0,557$; T-Homozygote vs G-Homozygote $p = 0,925$) (Tabelle 11).

Die Anzahl der Patienten für die Allel-Gruppen die T-Homozygoten, die T-Allel-Träger, die Heterozygoten, die G-Allel-Träger und die G-Homozygoten wurden nach der Schlaganfallgenese nach den TOAST-Kriterien in die atherothrombotische Genese, die kardioembolische Genese, die mikrovaskuläre Genese, die sonstige Genese und in die unbestimmbare Genese unterteilt (Tabelle 11).

Ergebnisse

| | T-Homozygote | T-Träger | Heterozygote | G-Träger | G-Homozygote |
|---|--------------|-----------|--------------|-----------------------------|----------------------------|
| Patienten (männlich/weiblich) n = 73 (40/33) | 20 (8/12) | 54(32/22) | 34 (24/10) | 53 (32/21) ^{n.s.} | 19 (8/11) ^{n.s.} |
| Altersdurchschnitt | 65,8 ± 13,9 | 66,0±14,2 | 66,1 ± 14,5 | 63,7 ±14,7 ^{n.s.} | 59,5 ±14,3 ^{n.s.} |
| SSS bei Aufnahme | 33,1 ± 14,8 | 34,7±13,4 | 35,6 ±12,5 | 36,5 ± 11,2 ^{n.s.} | 38,3 ± 8,4 ^{n.s.} |
| Lysepatienten(n = 13) | 4 | 7 | 3 | 8 | 5 |
| ΔSSS (mit Lysepatienten) | 6,1 ± 8,3 | 6,4±10,6 | 6,5 ± 11,9 | 7,9 ± 10,9 ^{n.s.} | 10,4 ± 8,7 ^{n.s.} |
| ΔSSS (ohne Lysepatienten) | 6,1 ± 7,4 | 5,4±9,9 | 5,0 ± 11,1 | 6,2 ± 10,1 ^{n.s.} | 8,9 ± 7,0 ^{n.s.} |
| Schlaganfalltyp; (gesamt n = 73) | (n = 20) | (n = 54) | (n = 34) | (n = 53) | (n = 19) |
| Atherothrombotisch (n = 16) | 5 | 12 | 7 | 11 | 4 |
| Kardioembolisch (n = 20) | 3 | 16 | 13 | 17 | 4 |
| Mikrovaskulär (n = 13) | 5 | 9 | 4 | 8 | 4 |
| Sonstige Genese (n = 4) | 2 | 3 | 1 | 2 | 1 |
| Unbestimmbar (n = 20) | 5 | 14 | 9 | 15 | 6 |
| Zerebrovaskuläres Erstereignis (n = 51) | 15 | 37 | 22 | 36 | 14 |
| Zerebrovaskuläres Rezidivereignis (n = 22) | 5 | 17 | 12 | 17 | 5 |

Tabelle 11: Polymorphismus GPIIb 2622 T/G 73 Patienten, Anzahl der Patienten und Geschlechtsverhältnis (männlich/weiblich), Altersdurchschnitt ± Standardabweichung (± SD), Scandinavian Stroke Score (SSS) bei Aufnahme ± SD, Anzahl der Patienten mit Lysetherapie, Differenz des SSS bei Aufnahme und Entlassung (ΔSSS) für die Patienten mit Lysetherapie und ohne Lysetherapie ± SD, Patientenanzahl für die Schlaganfalltypen, Patientenanzahl mit zerebrovaskulärem Rezidivereignis. Jede Gruppe wurde nach dem Genotyp weiter in die T-Homozygoten, die G-Träger, die Heterozygoten und die G-Homozygoten unterteilt. Die T-Homozygoten und die G-Träger bzw. die T-Homozygoten und die G-Homozygoten wurden in den Altersdurchschnitt, SSS bei der Aufnahme, ΔSSS mit Lysetherapie, ΔSSS ohne Lysetherapie durch den U-Test nach Mann und Whitney verglichen. In der Geschlechtsverteilung wurden die T-Homozygoten und die G-Träger bzw. die T-Homozygoten und die G-Homozygoten durch den Chi-square Test verglichen. Jede Genotypgruppe wurde nach der Schlaganfallgenese unterteilt. Die T-Homozygoten und die G-Träger bzw. die T-Homozygoten und die G-Homozygoten wurden in der Verteilung der Patientenzahl mit der Gesamtgruppe durch den Chi-square Test verglichen. Die Genverteilung der Patienten mit zerebrovaskulärem Rezidivereignis wurde ermittelt und die Patientenverteilung der T-Homozygoten und der G-Träger bzw. der G-Homozygoten mit der Gesamtgruppe durch den Chi-square Test verglichen. n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

3.3.3.3 Es gibt keine Häufung des G-Allels in einer bestimmten Schlaganfallgruppe

Die Allelzahl und die Allelfrequenz des Polymorphismus GPIIb 2622 T/G (Ile 843 Ser) wurde für jede Schlaganfallgenese nach den TOAST-Kriterien berechnet und tabellarisch dargestellt (Tabelle 12). Bei den 73 untersuchten Patienten war die Allelzahl 74 für das T-Allel und 72 für das G-Allel, die Allelfrequenz für das G-Allel war 0,49. Die Allelzahl des T-Allels und G-Allels waren 17 und 15 bei den Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer, 19 und 21 bei den Patienten mit einem kardioembo-

lischer, 14 und 12 bei den Patienten mit einem mikrovaskulärer und 5 und 3 bei den Patienten mit einem sonstiger Ursache. Die A-Allelfrequenz war 0,47 bei den Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer, 0,53 bei den Patienten mit einem kardi-
oembolischer, 0,46 bei den Patienten mit einem mikrovaskulärer und 0,38 bei den Patienten mit einem Schlaganfall sonstiger Ursache.

Von den 73 Patienten hatten 20 Patienten einen Schlaganfall unbestimmbarer Ursache, die man nicht eindeutig in die oben genannte Gruppe nach TOAST-Kriterien einteilen konnte. Bei ihnen war die Allelhäufigkeit 19 T-Allel und 21 G-Allel, die G-Allelfrequenz war 0,53. Durch CCT-Befunde konnte diese Gruppe in eine Gruppe mit einem bildmorphologisch makroangiopathischen Schlaganfall und in eine Gruppe mit einem bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall unterteilt werden. Von den 20 Patienten hatten 12 Patienten einen bildmorphologisch makroangiopathischen, 8 Patienten einen bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall. Die Allelzahl des T-Allels und des G-Allels waren 14 und 10 in der Gruppe mit einem bildmorphologisch makroangiopathischen, 8 und 8 in der Gruppe mit einem bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall. Die G-Allelfrequenz war 0,42 in der Gruppe mit einem bildmorphologisch makroangiopathischen, 0,5 in der Gruppe mit einem bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall (Tabelle 12).

Die Allelzahl für die Gruppe der Schlaganfallgenese „atherothrombotisch“, „kardi-
oembolisch“ und „mikrovaskulär“ wurden durch den Chi-square Test miteinander verglichen. Der Vergleich zwischen „atherothrombotisch“ und „kardi-
oembolisch“ ($p = 0,64$), „atherothrombotisch“ und „mikrovaskulär“ ($p = 0,96$), „kardi-
oembolisch“ und „mikrovaskulär“ ($p = 0,61$) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied (Tabelle 12).

Ergebnisse

| | GPIIb 2622 T/G | | | |
|-----------------------------|------------------------------------|---------------|------------|------------|
| | Allelzahl T/G (Allelfrequenz G) | Atherothromb. | Kardioemb. | Mikrovask. |
| Allelzahl (73x2) | 74/72 (0,49) | | | |
| Schlaganfalltyp | | | | |
| • Atherothrombotisch (16x2) | 17/15 (0,47) | - | n.s. | n.s. |
| • Kardioembolisch (20x2) | 19/21 (0,53) | n.s. | - | n.s. |
| • Mikrovaskulär (13x2) | 14/12 (0,46) | n.s. | n.s. | - |
| • Sonstige Genese (4x2) | 5/3 (0,38) | | - | |
| • Unbestimmbar (20x2) | 19/21 (0,53) | | - | |
| - Makroangiopathisch (12x2) | 14/10 (0,42) | | | |
| - Mikroangiopathisch (8x2) | 8/8 (0,5) | | | |

Tabelle 12: Polymorphismus GPIIb 2622 T/G. Allelhäufigkeit und Allelfrequenz für jeden Schlaganfalltyp. Die 73 Patienten wurden in Schlaganfalltypen nach TOAST-Kriterien eingeteilt und die Allelzahl und G-Allelhäufigkeit wurden tabellarisch dargestellt. Die Allelhäufigkeiten für die Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer Genese, kardioembolischer Genese und mikrovaskulärer Genese wurden durch den Chi-square Test miteinander verglichen. Die Patienten mit einem Schlaganfall sonstiger Genese wurden wegen ihrer heterogenen Pathophysiologie und geringeren Anzahl der Patienten nicht in den Vergleich einbezogen. Die Patientengruppe mit einem Schlaganfall unbestimmbarer Genese wurde nach den CCT-Befunden weiter in die bildmorphologisch mikroangiopathische und bildmorphologisch makroangiopathische Gruppe geteilt. n.s. = nicht signifikant ($P > 0,05$).

3.3.3.4 Zwischen den Schlaganfallgruppen „Erstereignis“ und „Rezidivereignis“ zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Allelverteilung des Polymorphismus GPIIb 2622 T/G

Die untersuchten 73 Patienten wurden im Weiteren in eine Gruppe mit einem oder mehreren zerebrovaskulären Rezidivereignissen und in eine Gruppe mit zerebrovaskulärem Erstereignis unterteilt. 22 Patienten hatten ein oder mehrere zerebrovaskuläre Rezidivereignisse, 51 Patienten hatten ihr zerebrovaskuläres Erstereignis. In der Patientengruppe mit Rezidivschlaganfall hatten 8 Patienten einen Schlaganfall atherothrombotischer, 4 Patienten einen kardioembolischer, 3 Patienten einen mikrovaskulärer Genese, kein Patient hatte einen Schlaganfall sonstiger Genese. 7 Patienten hatten einen Schlaganfall unbestimmbarer Genese. 3 von ihnen hatten einen bildmorphologisch makroangiopathischen Schlaganfall, 4 von ihnen hatten einen bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall (Tabelle 13).

In der Patientengruppe mit erstem Schlaganfall hatten 8 Patienten einen Schlaganfall atherothrombotischer, 16 Patienten einen kardioembolischer, 10 Patienten einen mikrovasculärer, 4 Patienten einen sonstiger Genese. 13 Patienten hatten einen Schlaganfall unbestimmbarer Genese. 9 von ihnen hatten einen bildmorphologisch makroangiopathischen Schlaganfall, 4 von ihnen hatten einen bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall (Tabelle 13).

In der Patientengruppe mit Rezidivschlaganfall waren die Allelzahl des T-Allels und G-Allels jeweils 22 und 22 für die Gesamtgruppe (G-Allelfrequenz 0,5), 8 und 8 für die atherothrombotische (G-Allelfrequenz 0,5), 4 und 4 für die kardioembolische (G-Allelfrequenz 0,5), 4 und 2 für die mikrovasculäre Genese (G-Allelfrequenz 0,33), 2 und 4 für die bildmorphologisch makroangiopathische (G-Allelfrequenz 0,67) und 4 und 4 für die bildmorphologisch mikroangiopathische Genese (G-Allelfrequenz 0,5) (Tabelle 13).

In der Patientengruppe mit erstem Schlaganfall waren die Allelzahl des T-Allels und G-Allels jeweils 52 und 50 für die Gesamtgruppe (G-Allelfrequenz 0,49), 9 und 7 für die atherothrombotische (G-Allelfrequenz 0,44), 15 und 17 für die kardioembolische (G-Allelfrequenz 0,53), 10 und 10 für die mikrovasculäre (G-Allelfrequenz 0,5), 5 und 3 für die sonstige Genese (G-Allelfrequenz 0,38), 9 und 9 für die bildmorphologisch makroangiopathische Genese (G-Allelfrequenz 0,5) und 4 und 4 für die bildmorphologisch mikroangiopathische Genese (G-Allelfrequenz 0,5) (Tabelle 13).

Die Allelhäufigkeit für jede Schlaganfallgenese der beiden Gruppen wurde durch den Chi-square Test verglichen. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05 = \text{n.s.}$) (Tabelle 13).

| | GPIIb 2622 T/G | | | | | | |
|---|------------------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| | Allelzahl T/G (Allelfrequenz G) | A | K | M | S | U | |
| | | | | | | Makro | Mikro |
| Zerebrovaskuläres Rezidivereignis (22x2) | 22/22 (0,5) | 8/8 (0,5) | 4/4 (0,5) | 4/2 (0,33) | 0/0 - | 2/4 (0,67) | 4/4 (0,5) |
| Zerebrovaskuläres Erstereignis(51x2) | 52/50 (0,49) n.s. | 9/7 (0,44) n.s. | 15/17 (0,53) n.s. | 10/10 (0,5) n.s. | 5/3 (0,38) - | 9/9 (0,5) n.s. | 4/4 (0,5) n.s. |

Tabelle 13: Polymorphismus GPIIb 2622 T/G Unterteilung in zerebrovaskuläres Rezidivereignis und zerebrovaskuläres Erstereignis 73 Patienten. Allelhäufigkeit und Allelfrequenz für jeden Schlaganfalltyp wurden tabellarisch dargestellt. (A = atherothrombotisch, K = kardioembolisch, M = mikrovaskulär, S = sonstige Genese, U = unbestimmbare Genese). Die Patientengruppe mit einem Schlaganfall unbestimmbarer Genese wurde nach den CCT-Befunden weiter in die bildmorphologisch mikroangiopathische und bildmorphologisch makroangiopathische Gruppe geteilt. Die Verteilung der Allelhäufigkeit für die Gruppe, mit zerebrovaskulärem Rezidivereignis und mit zerebrovaskulärem Erstereignis wurde für jede Schlaganfallgenese durch den Chi-square Test miteinander verglichen. n.s. = nicht signifikant ($P > 0,05$).

3.3.3.5 Es gibt keine Häufung des G-Allels für eine Gruppe bestimmter Schlaganfallgenese in der 51 Patienten mit zerebrovaskulären Erstereignis

Um zu prüfen, ob in der Patientengruppe mit zerebrovaskulärem Erstereignis eine erhöhte Allelhäufigkeit für G-Allel des Polymorphismus GPIIb 2622 T/G unter einer bestimmten Schlaganfallgenese vorkommt, wurde diese Fragestellung bei den 51 Patienten mit zerebrovaskulärem Erstereignis geprüft.

Bei den 51 untersuchten Patienten mit zerebrovaskulärem Erstereignis war die Allelzahl 52 für das T-Allel und 50 für das G-Allel, die Allelfrequenz für das G-Allel war 0,49. Von 51 untersuchten Patienten hatten 16 Patienten einen Schlaganfall atherothrombotischer Ursache, 16 Patienten einen kardioembolischer, 10 Patienten einen mikrovaskulärer Ursache und 4 Patienten hatten einen Schlaganfall sonstiger Ursachen. Die Allelzahl des T-Allels und G-Allels waren 9 und 7 bei den Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer Ursache, 15 und 17 bei den Patienten mit einem kardioembolischer, 10 und 10 bei den Patienten mit einem mikrovaskulärer und 5 und 3 bei den Patienten mit einem sonstiger Ursache. Die G-Allelfrequenz war 0,44 bei den Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer, 0,53 bei den Patienten mit einem

kardioembolischer, 0,5 bei den Patienten mit einem mikrovaskulärer Ursache und 0,38 bei den Patienten mit einem Schlaganfall sonstiger Ursache.

Von den 51 Patienten hatten 13 Patienten einen Schlaganfall unbestimmbarer Ursache. Bei ihnen war die Allelhäufigkeit jeweils 11 T-Allel und 15 G-Allel, die G-Allelfrequenz war somit 0,58. Durch CCT-Befunde konnte diese Gruppe in Gruppe mit einem bildmorphologisch makroangiopathischen Schlaganfall und mit einem bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall unterteilt werden. Von den 13 Patienten hatten 9 Patienten einen bildmorphologisch makroangiopathischen Schlaganfall, 4 Patienten einen bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall. Die Allelzahl des T-Allels und des G-Allels waren 11 und 7 für die Patienten mit einem bildmorphologisch makroangiopathischen Schlaganfall, 4 und 4 für die Patienten mit einem bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall. Die G-Allelfrequenz war 0,38 für die Patienten mit einem bildmorphologisch makroangiopathischen Schlaganfall, 0,5 für die Patienten mit einem bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall (Tabelle 14).

Die Allelzahl für die Gruppe mit der Schlaganfallgenese „atherothrombotisch“, „kardioembolisch“ und „mikrovaskulär“ wurden durch den Chi-square Test miteinander verglichen. Die Vergleich zwischen „atherothrombotisch“ und „kardioembolisch“ ($p = 0,54$), „atherothrombotisch“ und „mikrovaskulär“ ($p = 0,72$), „kardioembolisch“ und „mikrovaskulär“ ($p = 0,13$) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied (Tabelle 14). Die Patientengruppe mit einem Schlaganfall sonstiger Schlaganfallgenese wurde aufgrund ihrer heterogenen Pathophysiologie (Vertebraldissektionen und Vaskulitis) und ihrer geringen Anzahl nicht zum statistischen Vergleich herangezogen.

Ergebnisse

| | GPIIb 2622 T/G | | | |
|----------------------------|------------------------------------|---------------|------------|------------|
| | Allelzahl T/G (Allelfrequenz G) | Atherothromb. | Kardioemb. | Mikrovask. |
| Allelzahl (51x2) | 52/50 (0,49) | | | |
| Schlaganfalltyp | | | | |
| • Atherothrombotisch (8x2) | 9/7 (0,44) | - | n.s. | n.s. |
| • Kardioembolisch (16x2) | 15/17 (0,53) | n.s. | - | n.s. |
| • Mikrovaskulär (10x2) | 10/10 (0,5) | n.s. | n.s. | - |
| • Sonstige Genese (4x2) | 5/3 (0,38) | | - | |
| • Unbestimmbar (13x2) | 11/15 (0,58) | | - | |
| - Makroangiopathisch (9x2) | 11/7 (0,38) | | | |
| - Mikroangiopathisch (4x2) | 4/4 (0,5) | | | |

Tabelle 14: Polymorphismus GPIIb 2622 T/G. Allelhäufigkeit und Allelfrequenz für jeden Schlaganfalltyp bei 51 Patienten mit zerebrovaskulärem Erstereignis Die 51 Patienten mit zerebrovaskulärem Erstereignis wurden nach den TOAST-Kriterien eingeteilt und die Allelzahl und A-Allelhäufigkeit tabellarisch dargestellt. Die Allelhäufigkeit für die Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer, kardioembolischer und mikrovaskulärer Genese wurden durch den Chi-square Test miteinander verglichen. Die Patienten mit einem Schlaganfall sonstiger Genese wurden wegen ihrer heterogenen Pathophysiologie und geringeren Anzahl der Patienten nicht in den Vergleich einbezogen. Die Patientengruppe mit einem Schlaganfall unbestimmbarer Genese wurde nach den CCT-Befunden weiter in die bildmorphologisch mikroangiopathische und bild-morphologisch makroangiopathische Gruppe unterteilt. n.s. = nicht signifikant ($P > 0,05$).

3.3.4 Polymorphismus GPIIIa 196 T/C (Leu 33 Pro)

3.3.4.1 PCR und Genotypbestimmung

Beim Polymorphismus GPIIIa 196 T/C konnte ich alle zu untersuchenden Segmente erfolgreich durch die PCR amplifizieren. Nach der PCR wurde das Multiplex-PCR-Produkt mit der Restriktionsendonuklease *Msp I* verdaut und die Verdauprodukte auf dem Agarose-Gel durch die Elektrophorese getrennt. Dabei zeigten sich die Banden 278 Bp und 186 Bp klar auf dem Gel, so daß man die Diagnose des Genpolymorphismus auf dem Gel problemlos stellen konnte. Man sah bei den T-Homozygoten nur die 278 Bp Bande, bei C-Homozygoten nur die 186 Bp Bande und beide Banden bei den Heterozygoten (Abbildung 6).

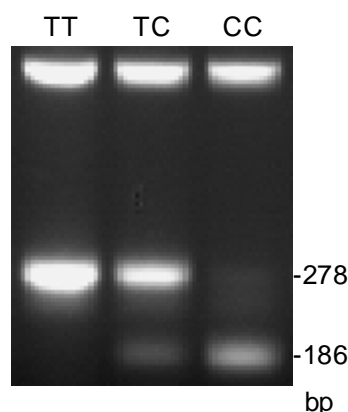


Abbildung 6: Polymorphismus GPIIIa 196 T/C Verdau des Produktes eines Multiplex-PCR mit der Restriktionsendonuklease *Msp I* auf einem Agarose-Gel. Verdaumuster von Polymorphismus GPIIIa 196 T/C (Leu 33 Pro). Homozygot TT (Leucin/Leucin), Heterozygot TC (Leucin/Prolin), Homozygot CC (Prolin/Prolin).

3.3.4.1 Statistischer Vergleich des Polymorphismus GPIIIa 196 T/C zeigt in der Geschlechtsverteilung, dem Altersdurchschnitt, dem SSS bei Aufnahme und dem Δ SSS statistisch keinen signifikanten Unterschied in Zusammenhang mit Alleltypen

Von den 73 untersuchten Patienten waren 54 T-homozygot (74,0 %) (31 männlich/23 weiblich), 18 T/C heterozygot (24,7 %) (8 männlich/10 weiblich) und 1 C-homozygot (1,4 %) (1 männlich/0 weiblich). Dies entsprach 19 C-Träger (26,0 %) (9 männlich, 10 weiblich).

Um zu überprüfen, ob bei einem Alleltyp eine Geschlechtshäufung vorkommt, wurde die Anzahl der männlichen und weiblichen Patienten von den T-Homozygoten (31 männlich/23 weiblich) mit den C-Allel-Trägern (9 männlich/10 weiblich) durch den Chi-square Test statistisch verglichen. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (T-Homozygote vs. C-Allel-Träger; $p = 0,450$) (Tabelle 15).

Bei dem Polymorphismus GPIIIa 196 T/C wurden ähnlich wie bei der Untersuchung des Polymorphismus Fibrinogen -455 und Polymorphismus GPIIb 2622 T/G die T-Homozygoten mit C-Allel-Träger in den folgenden Punkten verglichen; 1. Altersdurchschnitt, 2. *Scandinavian Stroke Score* bei der Aufnahme, 3. Variabilität des *Scandinavian Stroke Scores* (Δ SSS) für die Patienten mit Lysetherapie, 4. Variabilität des *Scandinavian Stroke Scores* (Δ SSS) für die Patienten ohne Lysetherapie, 5. Anzahl der Patienten, die eine Lysetherapie bei Aufnahme bekommen hat.

1. Der Altersdurchschnitt war $63,9 \pm 14,3$ Jahre für die T-Homozygoten und $65,6 \pm 14,9$ Jahre für die C-Allel-Träger. Der statistische Vergleich durch den U-Test nach Mann und Whitney zeigte keinen signifikanten Unterschied (T-Homozygote vs C-Allel-Träger $p = 0,821$) (Tabelle 15).

2. Der Durchschnitt des *Scandinavian Stroke Score* bei Aufnahme war bei den T-Homozygoten $35,2 \pm 13,1$, bei den C-Allel-Trägern $36,7 \pm 9,9$. Der statistische Vergleich durch den U-Test nach Mann und Whitney zeigte keinen signifikanten Unterschied (T-Homozygote vs C-Allel-Träger $p = 0,927$) (Tabelle 15).

3. Der Durchschnitt der Variabilität des *Scandinavian Stroke Scores* (Δ SSS) für die Patienten mit Lysetherapie war $7,4 \pm 10,6$ für die T-Homozygoten, $7,4 \pm 9,2$ für die C-Allel-Träger. Der statistische Vergleich durch den U-Test nach Mann und Whitney zeigte keinen signifikanten Unterschied (T-Homozygote vs C-Allel-Träger $p = 0,377$) (Tabelle 15).

4. Der Durchschnitt der Variabilität des *Scandinavian Stroke Scores* (Δ SSS) für die Patienten ohne Lysetherapie war für die T-Homozygoten $5,5 \pm 9,5$, für die C-Allel-Träger $8,1 \pm 9,1$. Der statistische Vergleich durch den U-Test nach Mann und Whitney zeigte keinen signifikanten Unterschied (T-Homozygote vs C-Allel-Träger $p = 0,588$) (Tabelle 15).

5. Durch den Chi-square Test konnte sichergestellt werden, daß die T-Homozygotengruppe im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen nicht zufällig häufiger Lysetherapie bekam (T-Homozygote vs C-Allel-Träger $p = 0,940$).

Es wurde ebenfalls überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen zerebrovaskulären Rezidivereignis und Alleltypen besteht. Unter den T-Homozygoten hatten 35 Patienten zerebrovaskuläres Erstereignis, 19 Patienten hatten zerebrovaskuläres Rezidivereignis, unter den C-Allel-Träger hatten 16 Patienten Erstereignis, 3 Patienten hatten Rezidivereignis. Die Anzahl der Patienten wurde durch den Chi-square Test verglichen. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (T-Homozygote vs C-Allel-Träger $p = 0,227$) (Tabelle 15).

Die T-Homozygoten, die T-Allel-Träger, die Heterozygoten, die C-Allel-Träger und die C-Homozygoten wurden nach der Schlaganfallgenese gemäß den TOAST-Kriterien in Gruppen mit Schlaganfall atherothrombotischer, kardioembolischer, mikrovaskulärer,

Ergebnisse

sonstiger und unbestimmbarer Genese unterteilt und tabellarisch dargestellt (Tabelle 15).

| | T-Homozygote | T-Träger | Heterozygote | C-Träger | C-Homozygote |
|---|--------------|------------|--------------|-----------------------------|--------------|
| Patienten (männlich/weiblich) n = 73 (40/33) | 54 (31/23) | 72 (39/33) | 18 (8/10) | 19 (9/10) ^{n.s.} | 1 (1/0) |
| Altersdurchschnitt | 63,9 ± 14,3 | 64,5±14,4 | 66,4 ± 14,9 | 65,6 ± 14,9 ^{n.s.} | 52,1 |
| SSS bei Aufnahme | 35,2 ± 13,1 | 36,0±11,9 | 38,3 ± 7,2 | 36,7 ± 9,9 ^{n.s.} | 8,0 |
| Lysepatienten(n = 13) | 9 | 12 | 3 | 3 | 0 |
| ΔSSS (mit Lysepatienten) | 7,4 ± 10,6 | 7,1±9,8 | 6,0 ± 7,0 | 7,4 ± 9,2 ^{n.s.} | 33,0 |
| ΔSSS (ohne Lysepatienten) | 5,5 ± 9,5 | 5,7±8,8 | 6,5 ± 6,5 | 8,1 ± 9,1 ^{n.s.} | 33,0 |
| Schlaganfalltyp: | (n = 54) | (n = 72) | (n = 18) | (n = 19) | (n = 1) |
| Atherothrombotisch (n = 16) | 13 | 16 | 3 | 3 | 0 |
| Kardioembolisch (n = 20) | 16 | 19 | 3 | 4 | 1 |
| Mikrovaskulär (n = 13) | 8 | 13 | 5 | 5 | 0 |
| Sonstige Genese (n = 4) | 3 | 4 | 1 | 1 | 0 |
| Unbestimmbar (n = 20) | 14 | 20 | 6 | 6 | 0 |
| Zerebrovaskuläres Erstereignis (n = 51) | 35 | 51 | 16 | 16 | 0 |
| Zerebrovaskuläres Rezidivereignis (n = 22) | 19 | 21 | 2 | 3 | 1 |

Tabelle 15: Polymorphismus GPIIIa 196 T/C 73 Patienten. Anzahl der Patienten und Geschlechtsverhältnis (männlich/weiblich), Altersdurchschnitt ± Standardabweichung (± SD), Scandinavian Stroke Score (SSS) bei Aufnahme ± SD, Anzahl der Patienten mit Lysetherapie, Differenz des SSS bei Aufnahme und Entlassung (ΔSSS) für die Patienten mit Lysetherapie und ohne Lysetherapie ± SD, Patientenanzahl für die Schlaganfalltypen, Patientenanzahl mit zerebrovaskulärem Rezidivereignis. Jede Gruppe wurden nach dem Genotyp weiter in die T-Homozygoten, T-Allel-Träger, die Heterozygoten, C-Allel-Träger und die C-Homozygoten unterteilt. Die T-Homozygoten und die C-Allel-Träger wurden in den Parametern Altersdurchschnitt, SSS bei der Aufnahme, ΔSSS mit Lysetherapie, ΔSSS ohne Lysetherapie durch den U-Test nach Mann und Whitney verglichen. In der Geschlechtsverteilung wurden die zwei Gruppen durch den Chi-square Test verglichen. Jede Genotypgruppe wurde nach der Schlaganfallgenese unterteilt. Die T-Homozygoten und die C-Allel-Träger wurden in der Verteilung der Patientenzahl mit der Gesamtgruppe durch den Chi-square Test verglichen. Die Genverteilung der Patienten mit zerebrovaskulärem Rezidivereignis wurde berechnet und die Patientenverteilung der T-Homozygoten und der C-Allel-Träger wurden mit der der Gesamtgruppe durch den Chi-square Test verglichen. n.s. = nicht signifikant (p > 0,05)

3.3.4.2 Es gibt keine Häufung des C-Allels in Abhängigkeit eines Schlaganfalltyps in der gesamten Schlaganfallgruppe

Die Allelzahl und die Allelfrequenz des Polymorphismus GPIIIa 196 T/C wurden für jede Schlaganfallgenese nach den TOAST-Kriterien berechnet und tabellarisch dargestellt (Tabelle 16). Bei den 73 untersuchten Patienten war die Allelzahl 127 für das T-

Allel und 19 für das C-Allel, die Allelfrequenz für das C-Allel war 0,13. Die Allelzahl des T-Allels und C-Allels waren 29 und 3 bei den Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer Ursache, 35 und 5 bei den Patienten mit einem Schlaganfall kardioembolischer Ursache, 21 und 5 bei den Patienten mit einem Schlaganfall mikrovaskulärer Ursache und 7 und 1 bei den Patienten mit einem Schlaganfall sonstiger Ursache. Die C-Allelfrequenz war 0,09 bei den Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer Ursache, 0,13 bei den Patienten mit einem Schlaganfall kardioembolischer Ursache, 0,19 bei den Patienten mit einem Schlaganfall mikrovaskulärer Ursache und 0,13 bei den Patienten mit einem Schlaganfall sonstiger Ursachen.

Von den 73 Patienten hatten 20 Patienten einen Schlaganfall unbestimmbarer Ursache. Hier war die Allelhäufigkeit 35 T-Allele und 51 C-Allele, die C-Allelfrequenz war 0,14. Durch CCT-Befunde konnte diese Patientengruppe in bildmorphologisch makroangiopathische und in bildmorphologisch mikroangiopathische Schlaganfälle unterteilt werden. Von den 20 Patienten hatten 12 Patienten einen bildmorphologisch makroangiopathischen Schlaganfall, 8 Patienten hatten einen bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall. Die Allelzahl des T-Allels und des C-Allels waren 21 und 3 bei den Patienten mit einem bildmorphologisch makroangiopathischen Schlaganfall, 14 und 2 bei den Patienten mit einem bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall. Die G-Allelfrequenz war 0,13 bei den Patienten mit einem bildmorphologisch makroangiopathischen Schlaganfall, 0,13 bei den Patienten mit einem bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall (Tabelle 16).

Die Allelzahl für die Gruppe mit der Schlaganfallgenese „atherothrombotisch“, „kardioembolisch“ und „mikrovaskulär“ wurden durch den Chi-square Test miteinander verglichen. Die Vergleich zwischen „atherothrombotisch“ und „kardioembolisch“ ($p = 0,68$), „atherothrombotisch“ und „mikrovaskulär“ ($p = 0,28$), „kardioembolisch“ und „mikrovaskulär“ ($p = 0,46$) zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied (Tabelle 16).

Ergebnisse

| | GPIIIa 196 T/C | | | |
|-----------------------------|--------------------------------------|---------------|------------|------------|
| | Allelanzahl T/C (Allelfrequenz C) | Atherothromb. | Kardioemb. | Mikrovask. |
| Allelanzahl (73x2) | 127/19 (0,13) | | | |
| Schlaganfalltyp | | | | |
| • Atherothrombotisch (16x2) | 29/3 (0,09) | - | n.s. | n.s. |
| • Kardioembolisch (20x2) | 35/5 (0,13) | n.s. | - | n.s. |
| • Mikrovaskulär (13x2) | 21/5 (0,19) | n.s. | n.s. | - |
| • Sonstige Genese (4x2) | 7/1 (0,13) | | - | |
| • Unbestimmbar (20x2) | 35/5 (0,14) | | | |
| - Makroangiopathisch (12x2) | 21/3 (0,13) | | - | |
| - Mikroangiopathisch (8x2) | 14/2 (0,13) | | | |

Tabelle 16: Polymorphismus GPIIIa 196 T/C. Allelhäufigkeit und Allelfrequenz für jeden Schlaganfalltyp. Die 73 Patienten wurden in Schlaganfalltypen nach dem TOAST-Kriterien eingeteilt und die Allelanzahl und C-Allelhäufigkeit wurden tabellarisch dargestellt. Die Allelhäufigkeit für die Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer Genese, kardioembolischer Genese und mikrovaskulärer Genese wurden durch den Chi-square Test verglichen. Die Patienten mit einem Schlaganfall sonstiger Genese wurden wegen ihrer heterogenen Pathophysiologie und geringeren Anzahl der Patienten nicht in den Vergleich einbezogen. Die Patienten mit einem Schlaganfall unbestimmbarer Genese wurden nach den CCT-Befunden weiter in die bildmorphologisch mikroangiopathische und in die bildmorphologisch makroangiopathische Gruppe geteilt. n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.3.4.3 Zwischen den Schlaganfallgruppen „Erstereignis“ und „Rezidivereignis“ zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Allelverteilung des Polymorphismus GPIIIa 196 T/C

Die untersuchten 73 Patienten wurden im weiteren in eine Gruppe mit einem oder mehreren zerebrovaskulären Rezidivereignissen und in eine Gruppe mit Erstereignis unterteilt. 22 Patienten hatten ein oder mehrere zerebrovaskulären Rezidivereignisse, 51 Patienten hatten ihr erstes zerebrovaskuläres Ereignis. In der Patientengruppe mit Rezidivschlaganfall hatten 8 Patienten einen Schlaganfall atherothrombotischer Genese, 4 Patienten einen Schlaganfall kardioembolischer Genese, 3 Patienten einen Schlaganfall mikroangiopathischer Genese, kein Patient hatte einen Schlaganfall sonstiger Genese. Aus den 7 Patienten, die einen Schlaganfall unbestimmbarer Genese hatten, hatten 3 Patienten einen bildmorphologisch makroangiopathischen Schlaganfall und 4 Patienten einen bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall (Tabelle 17).

In der Patientengruppe mit erstem Schlaganfall hatten 8 Patienten einen Schlaganfall atherothrombotischer, 16 Patienten einen kardioembolischer, 10 Patienten einen mikrovasculärer, 4 Patienten einen sonstiger Genesen. 13 Patienten, die einen Schlaganfall einer unbestimmbarer Genese hatten, hatten 9 Patienten einen bildmorphologisch makroangiopathischen Schlaganfall und 4 Patienten einen bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall (Tabelle 17).

In der Patientengruppe mit Rezidivschlaganfall waren die Allelzahl des T-Allels und C-Allels 41 und 3 (C-Allelfrequenz 0,09), 15 und 1 für die atherothrombotische Schlaganfallgenese (C-Allelfrequenz 0,06), 6 und 2 für die kardioembolische Genese (C-Allelfrequenz 0,25), 6 und 0 für die mikrovasculäre Genese (C-Allelfrequenz 0), 6 und 0 für die bildmorphologisch makroangiopathisch unbestimmbare Genese (C-Allelfrequenz 0) und 8 und 0 für die bildmorphologisch mikroangiopathisch unbestimmbare Genese (C-Allelfrequenz 0) (Tabelle 17).

In der Patientengruppe mit erstem Schlaganfall war die Allelzahl des T-Allels und C-Allels 86 und 16 (C-Allelfrequenz 0,16), 14 und 2 für die atherothrombotische Genese (C-Allelfrequenz 0,13), 29 und 3 für die kardioembolische Genese (C-Allelfrequenz 0,09), 15 und 5 für die mikrovasculäre Genese (C-Allelfrequenz 0,25), 7 und 1 für die sonstige Genese (C-Allelfrequenz 0,13), 15 und 3 für die bild-morphologisch makroangiopathisch unbestimmbare Genese (C-Allelfrequenz 0,17) und 6 und 2 für die bildmorphologisch mikroangiopathisch unbestimmbare Genese (C-Allelfrequenz 0,25) (Tabelle 17).

Die Allelhäufigkeit für jede Schlaganfallgenese der beiden Gruppen wurde durch den Chi-square Test verglichen. Es zeigten sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05 = \text{n.s.}$) (Tabelle 17)

| | GPIIIa 196 T/C | | | | | | |
|---|------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------|------------------------|-----------------------|
| | Allelzahl T/C (Allelfrequenz C) | A | K | M | S | U | |
| | | | | | | Makro | Mikro |
| Zerebrovaskuläres Rezidivereignis (22x2) | 41/3 (0,09) | 15/1 (0,06) | 6/2 (0,25) | 6/0 (0) | 0/0 - | 6/0 (0) | 8/0 (0) |
| Zerebrovaskuläres Erstereignis(51x2) | 86/16 (0,16) n.s. | 14/2 (0,13) n.s. | 29/3 (0,09) n.s. | 15/5 (0,25) n.s. | 7/1 (0,13) - | 15/3 (0,17) n.s. | 6/2 (0,25) n.s. |

Tabelle 17: Polymorphismus GPIIIa 196 T/C Unterteilung in zerebrovaskuläres Rezidivereignis und zerebrovaskuläres Erstereignis 73 Patienten. Allelhäufigkeit und Allelfrequenz für jede Schlaganfallgenese wurden tabellarisch dargestellt (A = atherothrombotisch, K = kardioembolisch, M = mikrovaskulär, S = sonstige Genese, U = unbestimmbare Genese). Die Patientengruppe mit einem Schlaganfall unbestimmbarer Genese wurde nach den CCT-Befunden weiter in die bildmorphologisch mikroangiopathische und bildmorphologisch makroangiopathische Gruppe geteilt. Die Verteilung der Allelhäufigkeit der Gruppe, mit zerebrovaskulärem Rezidivereignis und mit zerebrovaskulärem Erstereignis wurde für jede Schlaganfallgenese durch den Chi-square Test miteinander verglichen. n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.3.4.4 Es gibt keine Häufung des C-Allels in Abhängigkeit eines Schlaganfalltyps unter den 51 Patienten mit einem zerebrovaskulären Erstereignis

Um festzustellen, ob in der Patientengruppe mit zerebrovaskulärem Erstereignis eine erhöhte Allelhäufigkeit für das C-Allel des Polymorphismus GPIIIa 196 T/C unter einer bestimmten Schlaganfallgenese vorkommt, wurde diese Fragestellung bei den 51 Patienten mit zerebrovaskulärem Erstereignis geprüft.

Bei den 51 untersuchten Patienten mit zerebrovaskulärem Erstereignis war die Allelzahl 86 für das T-Allel und 16 für das C-Allel, die Allelfrequenz für das C-Allel war 0,16. Von ihnen hatten 8 Patienten einen Schlaganfall atherothrombotischer Ursache, 16 Patienten einen kardioembolischer, 10 Patienten einen mikrovaskulärer und 4 Patienten einen Schlaganfall sonstiger Ursachen. Die Allelzahl des T-Allels und C-Allels waren 14 und 2 bei den Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer, 29 und 3 bei den Patienten mit einem kardioembolischer, 15 und 5 bei den Patienten mit einem mikrovaskulärer und 7 und 1 bei den Patienten mit einem sonstiger Ursachen. Die Allelfrequenz war 0,13 bei den Patienten mit einem Schlaganfall atherothrombotischer,

0,09 bei den Patienten mit einem kardioembolischer, 0,25 bei den Patienten mit einem mikrovaskulärer und 0,13 bei den Patienten mit einem sonstiger Ursachen.

Von den 51 Patienten hatten 13 Patienten einen Schlaganfall, den man nicht eindeutig in eine der oben genannten Gruppe einteilen konnte. Von den 13 Patienten waren die Allelhäufigkeit 21 T-Allele und 5 C-Allele, die C-Allelfrequenz war 0,19. Durch CCT-Befunde konnten diese Patienten in eine Gruppe mit einem bildmorphologisch makroangiopathischen Schlaganfall und in eine Gruppe mit einem bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall unterteilt werden. Von den 13 Patienten hatten 9 Patienten einen bildmorphologisch makroangiopathischen, 4 Patienten hatten einen bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall. Die Allelzahl des T-Allels und des C-Allels waren 15 und 3 für die Patienten mit einem bildmorphologisch makroangiopathischen, 6 und 2 für die Patienten mit einem bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall. Die C-Allelfrequenz war 0,17 für die Patienten mit einem bildmorphologisch makroangiopathischen, 0,25 für die Patienten mit einem bildmorphologisch mikroangiopathischen Schlaganfall (Tabelle 18).

Die Allelzahl der Gruppen mit der Schlaganfallgenese „atherothrombotisch“, „kardioembolisch“ und „mikrovaskulär“ wurden durch den Chi-square Test miteinander verglichen. Der Vergleich zwischen „atherothrombotisch“ und „kardioembolisch“ ($p = 0,74$), „atherothrombotisch“ und „mikrovaskulär“ ($p = 0,35$), „kardioembolisch“ und „mikrovaskulär“ ($p = 0,13$) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied (Tabelle 18). Die Patientengruppe mit einem Schlaganfall sonstiger Schlaganfallgenese wurde aufgrund ihrer heterogenen Pathophysiologie (Vertebraldissektionen und Vaskulitis) und ihrer geringen Anzahl nicht zum statistischen Vergleich herangezogen.

Ergebnisse

| | GPIIIa 196 T/C | | | |
|----------------------------|------------------------------------|---------------|------------|------------|
| | Allelzahl T/C (Allelfrequenz C) | Atherothromb. | Kardioemb. | Mikrovask. |
| Allelzahl (51x2) | 86/16 (0,16) | | | |
| Schlaganfalltyp | | | | |
| • Atherothrombotisch (8x2) | 14/2 (0,13) | - | n.s. | n.s. |
| • Kardioembolisch (16x2) | 29/3 (0,09) | n.s. | - | n.s. |
| • Mikrovaskulär (10x2) | 15/5 (0,25) | n.s. | n.s. | - |
| • Sonstige Genese (4x2) | 7/1 (0,13) | | - | |
| • Unbestimmbar (13x2) | 21/5 (0,19) | | - | |
| - Makroangiopathisch (9x2) | 15/3 (0,17) | | | |
| - Mikroangiopathisch (4x2) | 6/2 (0,25) | | | |

Tabelle 18: Polymorphismus GPIIIa 196 T/C. Allelhäufigkeit und Allelfrequenz für jeden Schlaganfalltyp bei 51 Patienten mit zerebrovaskuläres Erstereignis. Die 51 Patienten mit zerebrovaskulärem Erstereignis wurden nach Schlaganfallgenese gemäß der TOAST-Kriterien eingeteilt und die Allelzahl und C-Allelhäufigkeit tabellarisch dargestellt. Die Allelhäufigkeit für die Patienten mit Schlaganfällen atherothrombotischer Genese, kardioembolischer Genese und mikrovaskulärer Genese wurde durch den Chi-square Test miteinander verglichen. Die Patienten mit Schlaganfällen sonstiger Genese wurden wegen der heterogenen Pathophysiologie und geringeren Anzahl der Patienten nicht in den Vergleich einbezogen. Die Patientengruppe mit unbestimmbarer Genese wurde nach den CCT-Befunden weiter in die bildmorphologisch mikroangiopathische und bildmorphologisch makroangiopathische Gruppe unterteilt. n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.3.5 Polymorphismus Fibrinogen -854 G/A

3.3.5.1 Genotypisierung des Polymorphismus Fibrinogen -854 G/A und Mismatch-PCR

Bei der Diagnosestellung des Polymorphismus Fibrinogen -854 G/A bereitete die PCR eine große Schwierigkeit. Die Mismatch-PCR funktionierte nicht, wie ich es mir gewünscht hatte.

Wie oben im Kapitel „Material und Methode“ bereits geschrieben wurde, wurde bei der PCR des Polymorphismus Fibrinogen -854 G/A ein modifizierter Primer benutzt, damit das Produkt eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease EcoR I enthält (Mismatch-PCR).

Die PCR zeigte sich am Anfang problemlos. Es stellte sich jedoch heraus, daß diese PCR sehr anfällig für Kontamination war. Beim Wiederholen dieser PCR kam es zu ständiger Kontamination. Nach ca. einem Jahr Pause konnte man lediglich zwei Mal

Ergebnisse

eine kontaminationsfreie PCR durchführen. Bei einem dritten Mal kam es erneut zu Kontamination dieser PCR.

Vermutlich wurde diese Kontamination durch die sehr kleinen PCR-Produkte von 132 Bp dieser PCR verursacht, die leicht in die Luft flogen und besser amplifizierbar waren als das nicht ganz genau passende genomische DNA-Template.

Letztendlich mußte auf diese PCR verzichtet werden, da durch die Kontamination eine glaubwürdige Diagnosestellung nicht mehr möglich war.

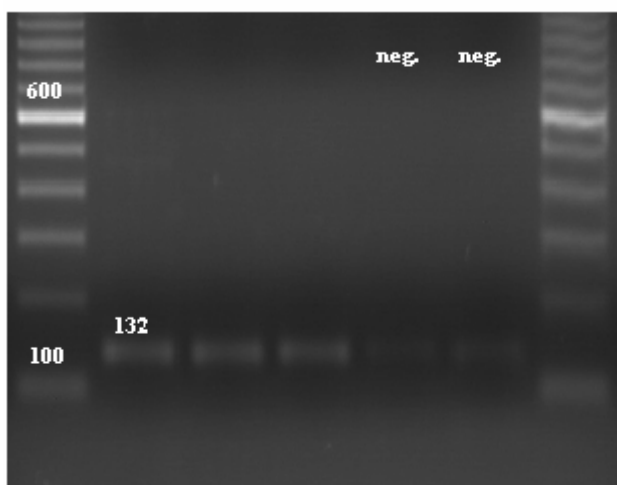


Abbildung 7: PCR-Produkt Fibrinogen -854 G/A Die ersten drei Spuren von links sind mit PatientendNA, die letzten zwei ohne DNA als Negativkontrolle. Man sieht in der Negativkontrolle Banden, die auf eine Kontamination der gesamten PCR hinweist. An beiden Enden sind 100 Bp Leiter zu sehen. Die dicke Bande in der Leiter entspricht den 600 Bp.

4 Diskussion

In Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob bestimmte Polymorphismen im Gerinnungssystem durch Änderungen der Hämodynamik bei der Entstehung eines Schlaganfalls bzw. im Verlauf nach einem Schlaganfall eine Rolle spielen könnten. Angesichts der heutigen noch frustrierenden Therapiemöglichkeiten eines bereits stattgefundenen Schlaganfalls kann man nicht genug betonen, daß das weitere Verständnis über Pathophysiologie bzw. Pathobiochemie des Schlaganfalls und dessen primäre Prophylaxe bzw. Prävention essentiell sind. Die Untersuchung, welche Rolle die genetischen Polymorphismen in der Pathophysiologie und Pathobiochemie eines Schlaganfalls spielen, stellt eine wichtige Ansatzmöglichkeit zu einem besseren Verständnis und damit zu einer eventuell besseren Therapiemöglichkeit in der Zukunft dar.

4.1 Fibrinogen -455 G/A und Fibrinogen -854 G/A

In den letzten Dekaden haben einige epidemiologische Studien gezeigt, daß ein erhöhter Fibrinogen-Plasmaspiegel neben arterieller Hypertonie, Hyperlipoproteinämie und Diabetes mellitus ein unabhängiger Risikofaktor für koronare Herzkrankheit und Schlaganfall darstellt (Ernst and Resch, 1993; Kannel et al., 1987; Meade et al., 1986; Wilhelmssen et al., 1984; Yarnell et al., 1991). Es wäre unwahrscheinlich, daß die anderen, bereits gut bekannten Risikofaktoren des Schlaganfalls wie Rauchen, Infektion oder Trauma nur rein zufällig mit erhöhten Fibrinogen-Plasmaspiegeln im Zusammenhang stehen. So kommt es zu einer zusätzlich erhöhten Plasmaviskosität in Rahmen der Akut-Phase-Reaktion bei einer Infektion, Verletzung oder Trauma (Ferrer-Antunes et al., 1998). Die genaue Rolle des Fibrinogen bei der Entstehung eines Schlaganfalls gilt jedoch heute noch nicht als gesichert (Dyker et al., 1997; Iso et al., 1989; 1995).

Fibrinogen spielt als Faktor II im Gerinnungssystem eine entscheidende Rolle und hat zweifellos eine wichtige Funktion bei der Entstehung eines ischämischen Schlaganfalls. Es beschleunigt sowohl die Thrombozytenaggregation, als auch die Blutgerinnung (Weng et al., 1999). Eben so ist Fibrinogen neben Hämatokrit entscheidend für die Blutviskosität durch seine absolute Menge und asymmetrische Form (Blann et al., 1998) und beeinflußt wesentlich die Hämodynamik im feinen Kapillargebiet. Als Folge dessen kommt es zum erhöhten intravasalen Gerinnungsrisiko in diesen Gebieten (Blann et al., 1998; Ernst et al., 1991; Grotta et al., 1982; Kannel et al., 1987). Aus diesen Gründen

wäre es eine logische Konsequenz, daß eine Erhöhung des Fibrinogen-Plasmaspiegels eher das Risiko für einen Schlaganfall thromboembolischer oder mikroangiopathischer Genese erhöht, als für einen Schlaganfall sonstiger Genese. Bereits mehrere prospektive epidemiologische Studien konnten zeigen, daß eine erhöhte Fibrinogenkonzentration ein unabhängiger Risikofaktor atherosklerotisch bedingter Erkrankungen ist (Ernst and Resch, 1995; Heinrich and Assmann, 1995; Qizilbash, 1995; Thompson et al., 1995; Wilhelmsen et al., 1984).

Die beiden Polymorphismen Fibrinogen -455 G/A und -854 G/A sind in der Promotorregion der Fibrinogen- β -Kette und haben in der Regulation des Fibrinogen-Plasmaspiegels eine wichtige Rolle (Ferrer-Antunes et al., 1998; Gardemann et al., 1997; van 't Hooft et al., 1999). In gesunden Probanden mit dem A-Allel des Polymorphismus -854 G/A oder dem A-Allel des Polymorphismus -455G/A wurde ein signifikant erhöhter Fibrinogenspiegel im Plasma festgestellt (Gardemann et al., 1997; van 't Hooft et al., 1999). Zudem zeigten Träger des A-Allels an der Position -455 einen deutlich verstärkten Fibrinogenanstieg in der Akut-Phase-Reaktion (Ferrer-Antunes et al., 1998; Gardemann et al., 1997).

In meiner Arbeit konnte ich feststellen, daß die Allelhäufigkeit für A-Allel des Polymorphismus -455 G/A unter den Schlaganfallpatienten mit atherothrombotischer Schlaganfallgenese in Vergleich zu unter den Schlaganfallpatienten mit kardioembolischer Schlaganfallgenese bei den 73 untersuchten Patienten signifikant erhöht war (Kapitel 3.3.2.3). Bei der gleichen Untersuchung, durchgeführt bei den 51 Patienten mit zerebrovaskulärem Erstereignis, war sie nicht mehr signifikant unterschiedlich. Die Tendenz ist jedoch deutlich vorhanden und könnte durch die geringe Patientenzahl erklärt werden (Kapitel 3.3.2.5). Das Ergebnis bestätigt die Hypothese, die bereits oben geschrieben wurde. Eine prospektiv randomisierte Kontrollstudie könnte eine stärkere Aussage haben und sollte in weiteren Arbeiten zur Validierung der Ergebnisse erfolgen. Interessanterweise wurde das A-Allel des Polymorphismus -455 G/A von Nishimura und Kessler, im Gegensatz zu meinem Ergebnis, vermehrt bei Patienten mit makroangiopathischen Hirninfarkten festgestellt (Kessler et al., 1997). Gleichzeitig beschrieb Nishimura das A-Allel dieses Polymorphismus als unabhängigen Risikofaktor für Hirninfarkte bei hypertensiven Patienten in der japanischen Bevölkerung (Nishiuma et al., 1998). Die beiden Studie waren kontrolliert, die Patientenzahl war bei beiden Studien

ebenfalls relativ gering ($n = 254$ und 452). In der letzt genannten Studie war das Patientenkollektiv ausschließlich japanischer Herkunft, welche eher zu einem Schlaganfall neigen (Nishiuma et al., 1998). Das A-Allel des Polymorphismus -455 G/A scheint zusätzlich mit einer beschleunigten Progression der Koronarsklerose assoziiert zu sein (de Maat et al., 1998).

Ebenfalls konnte in meiner Arbeit festgestellt werden, daß die A-Allel-Träger eine signifikant größere Variabilität des Fibrinogen-Plasmaspiegels in Verlauf des Krankenhausaufenthaltes haben (Kapitel 3.3.2.6), während es bei der Untersuchung des Verlaufes des neurologischen Status nach dem Schlaganfall keinen klinisch signifikanten Unterschied durch SSS-Entlassung/SSS-Aufnahme-Differenz zwischen den G-Homozygoten und A-Allel-Trägern nachweisen ließ.

Aus der klinischen Erfahrung sagen viele Neurologen, daß es einem Patienten nach einem Schlaganfall schlechter gehe, je höher der Fibrinogenspiegel sei. Ob tatsächlich im Verlauf beim akuten Schlaganfall durch Polymorphismen die Fibrinogen-Plasmaspiegel beeinflußt werden, ist bisher in keiner Studie gezeigt. Auch in dieser Arbeit konnte nicht gezeigt werden, daß der klinische Verlauf bei den Patienten mit Risikopolymorphismen ungünstiger ist. In einer Studie wurde gezeigt, daß die Fibrinogenspiegel und die Plasmaviskosität bei TIA (*transient ischaemic attack*)-Patienten signifikant erhöht sind und nicht erst nach der TIA (Ernst et al., 1988). Nach Literaturangabe heißt es, daß es bei Fibrinogenwerten im Plasma über 20 g/l die Gefäßsituation als ungünstig und über 30 g/l als gefährdend im Hinblick auf eine Gefäßokklusion einzustufen ist (Nickolaus, 2000) (Referenzbereich $1,8 - 3,5 \text{ g/l}$) (Wagner and Dati, 2000). Angesichts der Tatsache, daß der Fibrinogenspiegel multifaktoriell reguliert wird, ist eine Möglichkeit, daß bei einem Träger mehrerer fibrinogen-erhöhender Genpolymorphismen das Schlaganfallrisiko tatsächlich erhöht ist oder daß der Verlauf nach einem ischämischen Schlaganfall durch erhöhten Fibrinogen-Plasmaspiegel ungünstig beeinflußt wird.

In dieser Arbeit waren bei dem Polymorphismus Fibrinogen -455 G/A von den 73 untersuchten Patienten 51 G-Homozygote (70%) (25 männlich/26 weiblich), 20 Heterozygote (27%) (13 männlich/7 weiblich) und 2 A-Homozygote (3%) (2 männlich/0 weiblich). Es waren 22 A-Allel-Träger (30%) (15 männlich/7 weiblich). Dieses Ergebnis entspricht einer Allelfrequenz von 0,16 für A-Allel und paßt ungefähr zu der Angabe von Van 't Hooft et al., die eine Allelfrequenz von 0,21 für das A-Allel in der mitteleuropäi-

schen Bevölkerung angegeben haben (van 't Hooft et al., 1999). Unter den A-Allel-Trägern des Polymorphismus Fibrinogen -455 G/A kam bei dieser Untersuchung das männliche Geschlecht signifikant häufiger vor. Das Gen befindet sich im Chromosom 4 und dieses Ergebnis ist vermutlich durch Zufall bedingt und würde wahrscheinlich bei der Untersuchung weiteren Patienten egalieren.

4.2 GPIIb 2622 T/G (Ile 843 Ser) und GPIIIa 196 T/C (Leu 33 Pro)

Der Fibrinogenrezeptor Glykoprotein Iib/IIIa-Komplex auf den Thrombozyten spielt bei der Thrombozytenaggregation eine entscheidende Rolle. Jüngere hämostaseologische Studien zeigen eine hohe Expression von GPIIb/IIIa-Komplex auf den Thrombozyten als prädiktiven Faktor für die Koronarstentthrombose (Neumann et al., 1996). Auch in der Klinik gelten die Glykoprotein Iib/IIIa-Antagonisten zur Zeit als die potenteste Thrombozytenaggregationshemmer und finden als Reservemittel ihr Gebrauch (Hardman, 2001).

In Vergleich zu Fibrinogen ist die Rolle des GP Iib/IIIa-Komplex funktionell weniger systemisch. Als Rezeptor für Fibrinogen und von Willebrand Faktor (vWF) vermittelt es die Aggregation der Thrombozyten, sowohl miteinander als auch an die Gefäßwand. Dieser Rezeptor wird durch thrombophile Substanzen wie Thrombin, Kollagen, Thromboxan A₂ oder ADP aktiviert, so daß die Aggregation stattfinden kann (Plättchenaktivierung) (Hardman, 2001). Fibrinogen vernetzt aktivierte Plättchen über eine Bindung an den GPIIb/IIIa-Komplex. Der nicht aktivierte GP Iib/IIIa-Komplex ist nicht in der Lage, die Aggregation zu vermitteln.

Für den Polymorphismus GPIIb 2622 T/G (Ile 843 Ser) wurde Einfluß auf die Prognose nach einem Schlaganfall berichtet. Das G-Allel des Polymorphismus GPIIb 2622 T/G wurde in einer Studie signifikant mit erhöhter Mortalität nach ischämischem Schlaganfall assoziiert gefunden (Carter et al., 1999). Durch dem Austausch des Isoleucin an der Position 843 durch Serin scheint die Konformation der Fibrinogen-Bindestelle verändert zu werden, was zu einer verstärkten Bindung von Fibrinogen, besonders im Bereich sehr hoher Fibrinogenkonzentration führt (Carter et al., 1999).

Der Polymorphismus GPIIIa 196 T/C (Leu 33 Pro) hat Einfluß auf die Aktivität des GP Iib/IIIa-Komplex. Das Prolin an der Position 33 des GPIIIa erniedrigt die Schwelle für die oben beschriebene Aktivierung der Thrombozyten durch ADP und führt zu einer erhöhten Affinität für Fibrinogen (Michelson et al., 2000). Das C-Allel des Poly-

morphismus GPIIIa 196 T/C konnte ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für den ischämischen Schlaganfall korreliert werden (Wagner et al., 1998). Dabei wird die Aminosäure Leucin (PIA1) an Position 33 des Glykoproteins IIIa durch Prolin (PIA2) ersetzt. Diese sogenannten PIA2-positive Blutplättchen haben eine erniedrigte Schwelle für Plättchen- oder GPIIb/IIIa-Aktivierung und binden leichter Fibrinogen.

In dieser Arbeit wurde eine klinisch statistische Untersuchung des Kurzzeitverlaufs der Schlaganfallpatienten je nach Genotypen durchgeführt. Dabei war die Fragestellung hauptsächlich zu klären; 1. Ob die untersuchten Gene eine prädisponierende Rolle für einen bestimmten Schlaganfalltyp spielen. Eine verstärkte Plättchen-Aktivierung wurde insbesondere bei Individuen mit atherosklerotisch oder hämodynamisch bedingten Infarkten beobachtet (Konstantopoulos et al., 1995). Bei diesen Individuen läßt sich eine erhöhte Inzidenz so genannter Mikroembolie-Signale in der transkraniellen Dopplersonographie nachweisen (Babikian et al., 1997). Ihre Frequenz korreliert mit dem Grad der atherosklerotischen Veränderungen (Babikian et al., 1997; Droste et al., 1999) und dem Risiko eines ischämischen Hirninfarktes (Babikian et al., 1997; Droste et al., 1999; Tong and Albers, 1995). Aus der Tatsache läßt sich vermuten, daß die Patienten mit PIA2-positiven Blutplättchen eher zu einem atherosklerotischen Schlaganfall prädisponiert sind. 2. Haben die untersuchten Gene einen signifikanten Einfluß nach einem stattgefundenen Schlaganfall? Wenn man an die komplexe Interaktion von Fibrinogen und GP IIB/IIIa-Komplex denkt, besonders bei einem erhöhten Plasma-Fibrinogenspiegel, kann man die beiden Faktoren als Teil eines multifaktoriellen Risikos in der Schlaganfallforschung nicht außer acht lassen. Carter et al. berichten, daß die beiden Mutationen, sogenannte HPA-3 und PIA2, zusammen in Bezug auf Mortalität eine signifikante Interaktion mit Fibrinogen zeigen und daß die Patienten mit HPA-3 positiven Blutplättchen eine erhöhte Mortalität nach ischämischem Schlaganfall haben (Carter et al., 1999). 3. Ob die Patienten mit Risikogenen jüngere Durchschnittsalter bei dem Schlaganfall haben. Wenn die Patienten mit den oben genannten Risikogenen für einen Schlaganfall prädisponiert sind, wäre es zu vermuten, daß sie in Vergleich zur Normalbevölkerung in ihrem jüngeren Alter einen Schlaganfall bekommen.

Wie oben bereits im Ergebnisteil geschrieben, konnte keine der gestellten Fragen mit signifikantem Ergebnis beantwortet werden. Bei dem Polymorphismus GPIIIa 196 T/C muß man jedoch sagen, daß die untersuchte Gruppe zu klein war, da beispielsweise für

Prolin-homozygot nur ein Patienten im Kollektiv war. Ob dieses auch für den Polymorphismus GPIIb 2622 T/G zutrifft, muß anhand eines größeren Patientenkollektivs untersucht werden.

In meiner Untersuchung waren bei dem Polymorphismus GPIIb 2622 T/G von den 73 untersuchten Patienten 20 T-homozygot (27,4 %), 34 T/G-heterozygot (46,6 %) und 19 G-homozygot (26,0 %). In den vergangenen Veröffentlichungen geben Unkelbach et al. (Unkelbach et al., 1995) T-homozygot 37,8 %, T/G-heterozygot 48,0 % G-homozygot 14,3 % und Carter et al. (Carter et al., 1999) T-homozygot 44,2 %, T/G-heterozygot 43,3 %, G-homozygot 12,5 % als Häufigkeit dieses Polymorphismus bei Normalbevölkerung in Europa jeweils an. In Vergleich zu den beiden Studien in Normalbevölkerung zeigte sich die Häufigkeit der G-homozygot bei meinen Schlaganfallpatienten mit 26,0 % höher.

Bei dem Polymorphismus GPIIIa 196 T/C waren in meiner Untersuchung von den 73 untersuchten Patienten 54 T-homozygot, 18 T/C-heterozygot und nur 1 C-homozygot, entspricht T-homozygot 74,0 %, T/C-heterozygot 24,7 % und C-homozygot 1,4 %. Dieser entspricht einer Allelfrequenz von 0.86 für T-Allel und 0.14 für C-Allel. Sie ist gut mit der Verteilung aus den vergangenen Studien von Unkelbach et al. (Unkelbach et al., 1995) und der *Framingham Offspring Study* (Feng et al., 1999) vergleichbar. Unkelbach et al. gab die Häufigkeitsverteilung dieses Polymorphismus in Mitteleuropa mit T-homozygot 69,4 %, T/C-heterozygot 28,6 % und C-homozygot 2,0 % an und die *Framingham Offspring Study* (Feng et al., 1999) gab eine Häufigkeit von 71,5 % für T-homozygot, 25,9 % für T/C-heterozygot und 2,5 % für C-homozygot an.

5 Zusammenfassung

Der ischämische Schlaganfall ist die dritthäufigste Todesursache in der Bundesrepublik und wird weiterhin an Bedeutung zunehmen. Trotz rasanter Entwicklung der molekularbiologischen Forschungsmethoden und dadurch erreichtem Einblick in der Pathomechanismus in den letzten Jahren, bleibt der Schlaganfall aufgrund der besonderen biologischen Eigenschaft der Zellen im zentralen Nervensystem weiterhin eine der größten Herausforderung in der klinischen Medizin.

In diesem Gebiet ist es noch unklar, inwiefern genetische Risikofaktoren in der Ätiologie eine Rolle spielen und welches Potential der intraindividuelle genetische Unterschied in die Urteilsfindung zur Wahl des Medikaments, zur Behandlung der Akutphase, sowie zur Sekundär-/Primärprophylaxe hat. Es gibt eine Reihe von Polymorphismen, die entweder direkt die Konzentration von Fibrinogen auf Stimuli erhöhen oder die Interaktion von Fibrinogen mit seiner Bindestelle auf Blutplättchen verändern und somit im hämostatisch-hämorrheologischen System eine wesentliche Rolle spielen.

In Rahmen meiner Promotionsarbeit habe ich untersucht, ob die genetischen Polymorphismen im Gerinnungssystem, Fibrinogen -455 G/A, GPIIb 2622 T/G und GPIIIa 196 T/C bei der Entstehung eines Schlaganfalls bzw. im Verlauf nach einem Schlaganfall eine Rolle spielen. Man konnte dabei feststellen; 1. Die Allelhäufigkeit für A-Allel des Polymorphismus -455 G/A war unter den Schlaganfallpatienten mit atherothrombotischer Schlaganfallgenese in Vergleich zu unter den Schlaganfallpatienten mit kardiembolischer Schlaganfallgenese signifikant erhöht ($P = 0,04$). 2. Die A-Allel-Träger haben signifikant größere Schwankung des Fibrinogen-Plasmaspiegels im klinischen Verlauf nach einem Schlaganfall ($p = 0,031$).

Obwohl Schlaganfall eine komplexe Erkrankung mit multifaktoriellen Entstehungspathomechanismen ist, gibt es zur Zeit keinen Grund zu zweifeln, daß es sich um eine Gefäß- bzw. eine hämostatische Erkrankung handelt, in der das Gerinnungssystem eine zentrale Rolle spielt. Zusammenfassend kann man sagen, daß die Genpolymorphismen durchaus klinisch relevanten Einfluß haben. Um die Bedeutung dieser genetischen Einflüsse deutlicher zu zeigen, sollte eine Untersuchung mit gezielter Fragestellung in großer Patientenzahl und Kontrollgruppe durchgeführt werden.

6 Literaturverzeichnis

Adams, H. P., Jr., Bendixen, B. H., Kappelle, L. J., Biller, J., Love, B. B., Gordon, D. L., and Marsh, E. E. d. (1993). Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 24, 35-41.

Ali, H., Haribabu, B., Richardson, R. M., and Snyderman, R. (1997). Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. *Med Clin North Am* 81, 1-28.

Anderson, G. M., Shaw, A. R., and Shafer, J. A. (1993). Functional characterization of promoter elements involved in regulation of human B beta-fibrinogen expression. Evidence for binding of novel activator and repressor proteins. *J Biol Chem* 268, 22650-22655.

Andre Parent, M. B. C. (1995). *Carpenter's Human Neuroanatomy*, 9th edn, Williams & Wilkins).

Astrup, J. (1982). Energy-requiring cell functions in the ischemic brain. Their critical supply and possible inhibition in protective therapy. *J Neurosurg* 56, 482-497.

Astrup, J., Symon, L., Branston, N. M., and Lassen, N. A. (1977). Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 8, 51-57.

Babikian, V. L., Wijman, C. A., Hyde, C., Cantelmo, N. L., Winter, M. R., Baker, E., and Pochay, V. (1997). Cerebral microembolism and early recurrent cerebral or retinal ischemic events. *Stroke* 28, 1314-1318.

Baron, J. C., Rougemont, D., Soussaline, F., Bustany, P., Crouzel, C., Bousser, M. G., and Comar, D. (1984). Local interrelationships of cerebral oxygen consumption and glucose utilization in normal subjects and in ischemic stroke patients: a positron tomography study. *J Cereb Blood Flow Metab* 4, 140-149.

Baumann, H., and Gauldie, J. (1994). The acute phase response. *Immunol Today* 15, 74-80.

Beamer, N. B., Coull, B. M., Clark, W. M., Briley, D. P., Wynn, M., and Sexton, G. (1998). Persistent inflammatory response in stroke survivors. *Neurology* 50, 1722-1728.

Blann, A., Bignell, A., and McCollum, C. (1998). von Willebrand factor, fibrinogen and other plasma proteins as determinants of plasma viscosity. *Atherosclerosis* 139, 317-322.

- Block, F., Peters, M., and Nolden-Koch, M. (2000). Expression of IL-6 in the ischemic penumbra. *Neuroreport* *11*, 963-967.
- Blomback, B. (1996). Fibrinogen and fibrin--proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thromb Res* *83*, 1-75.
- Born, G. V. (1977). Fluid-mechanical and biochemical interactions in haemostasis. *Br Med Bull* *33*, 193-197.
- Branston, N. M., Symon, L., Crockard, H. A., and Pasztor, E. (1974). Relationship between the cortical evoked potential and local cortical blood flow following acute middle cerebral artery occlusion in the baboon. *Exp Neurol* *45*, 195-208.
- Carter, A. M., Catto, A. J., Bamford, J. M., and Grant, P. J. (1999). Association of the platelet glycoprotein IIb HPA-3 polymorphism with survival after acute ischemic stroke. *Stroke* *30*, 2606-2611.
- Chung, D. W., Harris, J. E., and Davie, E. W. (1990). Nucleotide sequences of the three genes coding for human fibrinogen. *Adv Exp Med Biol* *281*, 39-48.
- de Maat, M. P., Kastelein, J. J., Jukema, J. W., Zwinderman, A. H., Jansen, H., Groenemeier, B., Brusckhe, A. V., and Kluft, C. (1998). -455G/A polymorphism of the beta-fibrinogen gene is associated with the progression of coronary atherosclerosis in symptomatic men: proposed role for an acute-phase reaction pattern of fibrinogen. REGRESS group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *18*, 265-271.
- Di Napoli, M., Papa, F., and Bocola, V. (2001a). C-reactive protein in ischemic stroke: an independent prognostic factor. *Stroke* *32*, 917-924.
- Di Napoli, M., Papa, F., and Bocola, V. (2001b). Periodontal disease, C-reactive protein, and ischemic stroke. *Arch Intern Med* *161*, 1234-1235.
- Di Napoli, M., Papa, F., and Bocola, V. (2001c). Prognostic influence of increased C-reactive protein and fibrinogen levels in ischemic stroke. *Stroke* *32*, 133-138.
- Droste, D. W., Dittrich, R., Kemeny, V., Schulte-Altdorneburg, G., and Ringelstein, E. B. (1999). Prevalence and frequency of microembolic signals in 105 patients with extracranial carotid artery occlusive disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *67*, 525-528.
- Dyker, A. G., Weir, C. J., and Lees, K. R. (1997). Influence of cholesterol on survival after stroke: retrospective study. *Bmj* *314*, 1584-1588.
- Elger, B., Laux, V., and Schwarz, M. (1997). Magnetic resonance imaging studies on the effect of the fibrinogen-lowering agent ancrod on cerebral lesions in two rat models of acute stroke. *Arzneimittelforschung* *47*, 895-899.

Literaturverzeichnis

Ernst, E., Matrai, A., and Marshall, M. (1988). Blood rheology in patients with transient ischemic attacks. *Stroke* 19, 634-636.

Ernst, E., and Resch, K. L. (1993). Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med* 118, 956-963.

Ernst, E., and Resch, K. L. (1995). Therapeutic interventions to lower plasma fibrinogen concentration. *Eur Heart J* 16 *Suppl A*, 47-52; discussion 52-43.

Ernst, E., Resch, K. L., Matrai, A., Buhl, M., Schlosser, P., and Paulsen, H. F. (1991). Impaired blood rheology: a risk factor after stroke? *J Intern Med* 229, 457-462.

Feng, D., Lindpaintner, K., Larson, M. G., Rao, V. S., O'Donnell, C. J., Lipinska, I., Schmitz, C., Sutherland, P. A., Silbershatz, H., D'Agostino, R. B., *et al.* (1999). Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa PLA2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 1142-1147.

Ferrer-Antunes, C., de Maat, M. P., Palmeiro, A., Pimentel, J., and Fernandes, V. (1998). Association between polymorphisms in the fibrinogen alpha- and beta-genes on the post-trauma fibrinogen increase. *Thromb Res* 92, 207-212.

Fishman, D., Faulds, G., Jeffery, R., Mohamed-Ali, V., Yudkin, J. S., Humphries, S., and Woo, P. (1998). The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102, 1369-1376.

Folsom, A. R., Wu, K. K., Davis, C. E., Conlan, M. G., Sorlie, P. D., and Szklo, M. (1991). Population correlates of plasma fibrinogen and factor VII, putative cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* 91, 191-205.

Ford, E. B. (1966). Genetic polymorphism. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 164, 350-361.

Gardemann, A., Schwartz, O., Haberbosch, W., Katz, N., Weiss, T., Tillmanns, H., Hehrlein, F. W., Waas, W., and Eberbach, A. (1997). Positive association of the beta fibrinogen H1/H2 gene variation to basal fibrinogen levels and to the increase in fibrinogen concentration during acute phase reaction but not to coronary artery disease and myocardial infarction. *Thromb Haemost* 77, 1120-1126.

Gartner, T. K., Amrani, D. L., Derrick, J. M., Kirschbaum, N. E., Matsueda, G. R., and Taylor, D. B. (1993). Characterization of adhesion of "resting" and stimulated platelets to fibrinogen and its fragments. *Thromb Res* 71, 47-60.

Gillum, R. F., Mussolino, M. E., and Makuc, D. M. (1995). Erythrocyte sedimentation rate and coronary heart disease: the NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *J Clin Epidemiol* 48, 353-361.

Literaturverzeichnis

- Glader, E. L., Stegmayr, B., Johansson, L., Hulter-Asberg, K., and Wester, P. O. (2001). Differences in long-term outcome between patients treated in stroke units and in general wards: a 2-year follow-up of stroke patients in Sweden. *Stroke* 32, 2124-2130.
- Gordon, D. L., Bendixen, B. H., Adams, H. P., Jr., Clarke, W., Kappelle, L. J., and Woolson, R. F. (1993). Interphysician agreement in the diagnosis of subtypes of acute ischemic stroke: implications for clinical trials. The TOAST Investigators. *Neurology* 43, 1021-1027.
- Grau, A. J., Buggle, F., Becher, H., Zimmermann, E., Spiel, M., Fent, T., Maiwald, M., Werle, E., Zorn, M., Hengel, H., and Hacke, W. (1998). Recent bacterial and viral infection is a risk factor for cerebrovascular ischemia: clinical and biochemical studies. *Neurology* 50, 196-203.
- Grotta, J., Ackerman, R., Correia, J., Fallick, G., and Chang, J. (1982). Whole blood viscosity parameters and cerebral blood flow. *Stroke* 13, 296-301.
- Hardman, J. G., Limbird, L.E. (2001). Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics, Tenth edn, McGraw-Hill).
- Harris, R. J., Symon, L., Branston, N. M., and Bayhan, M. (1981). Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1, 203-209.
- Heinrich, J., and Assmann, G. (1995). Fibrinogen and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Risk* 2, 197-205.
- Heiss, W. D. (1983). Flow thresholds of functional and morphological damage of brain tissue. *Stroke* 14, 329-331.
- Huber, P., Laurent, M., and Dalmon, J. (1990). Human beta-fibrinogen gene expression. Upstream sequences involved in its tissue specific expression and its dexamethasone and interleukin 6 stimulation. *J Biol Chem* 265, 5695-5701.
- Humphries, S. E., Imam, A. M., Robbins, T. P., Cook, M., Carritt, B., Ingle, C., and Williamson, R. (1984). The identification of a DNA polymorphism of the alpha fibrinogen gene, and the regional assignment of the human fibrinogen genes to 4q26-qter. *Hum Genet* 68, 148-153.
- Indredavik, B., Bakke, F., Slordahl, S. A., Rokseth, R., and Haheim, L. L. (1999). Stroke unit treatment. 10-year follow-up. *Stroke* 30, 1524-1527.
- Indredavik, B., Slordahl, S. A., Bakke, F., Rokseth, R., and Haheim, L. L. (1997). Stroke unit treatment. Long-term effects. *Stroke* 28, 1861-1866.

Literaturverzeichnis

- Iso, H., Jacobs, D. R., Jr., Wentworth, D., Neaton, J. D., and Cohen, J. D. (1989). Serum cholesterol levels and six-year mortality from stroke in 350,977 men screened for the multiple risk factor intervention trial. *N Engl J Med* 320, 904-910.
- Izumi, Y., Tsuda, Y., Ichihara, S., Takahashi, T., and Matsuo, H. (1996). Effects of defibrination on hemorheology, cerebral blood flow velocity, and CO₂ reactivity during hypocapnia in normal subjects. *Stroke* 27, 1328-1332.
- Janeway CA, T. P. (1997). *Immunobiology: the immunesystem in health and disease*, 3rd edn (Edinburgh, UK, Churchill-Livingstone).
- Kannel, W. B., Wolf, P. A., Castelli, W. P., and D'Agostino, R. B. (1987). Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study. *Jama* 258, 1183-1186.
- Kant, J. A., Fornace, A. J., Jr., Saxe, D., Simon, M. I., McBride, O. W., and Crabtree, G. R. (1985). Evolution and organization of the fibrinogen locus on chromosome 4: gene duplication accompanied by transposition and inversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 2344-2348.
- Kessler, C., Spitzer, C., Stauske, D., Mende, S., Stadlmuller, J., Walther, R., and Rettig, R. (1997). The apolipoprotein E and beta-fibrinogen G/A-455 gene polymorphisms are associated with ischemic stroke involving large-vessel disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2880-2884.
- Kety SS, S. C. (1948). The nitrous oxide method for quantitative determination of cerebral blood flow in man: theory, procedure and normal values. *J Clin Invest*, 484-492.
- Kim, J. S. (1996). Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases. *J Neurol Sci* 137, 69-78.
- Koenig, W., and Ernst, E. (1992). The possible role of hemorheology in atherothrombogenesis. *Atherosclerosis* 94, 93-107.
- Konstantopoulos, K., Grotta, J. C., Sills, C., Wu, K. K., and Hellums, J. D. (1995). Shear-induced platelet aggregation in normal subjects and stroke patients. *Thromb Haemost* 74, 1329-1334.
- Kuhl, D. E., Phelps, M. E., Kowell, A. P., Metter, E. J., Selin, C., and Winter, J. (1980). Effects of stroke on local cerebral metabolism and perfusion: mapping by emission computed tomography of 18FDG and 13NH₃. *Ann Neurol* 8, 47-60.
- Kushner, I. (1982). The phenomenon of the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci* 389, 39-48.

Kushner, I., Gewurz, H., and Benson, M. D. (1981). C-reactive protein and the acute-phase response. *J Lab Clin Med* 97, 739-749.

Löffler G, P. E. (1997). *Biochemie und Pathobiochemie*, 5th edn (Berlin-Heidelberg, Germany, Springer).

Lowe, G. D., Lee, A. J., Rumley, A., Price, J. F., and Fowkes, F. G. (1997). Blood viscosity and risk of cardiovascular events: the Edinburgh Artery Study. *Br J Haematol* 96, 168-173.

Luft, U. C., and Finkelstein, S. (1968). Hypoxia: a clinical-physiological approach. *Aerosp Med* 39, 105-110.

Marler, J. R., Tilley, B. C., Lu, M., Brott, T. G., Lyden, P. C., Grotta, J. C., Broderick, J. P., Levine, S. R., Frankel, M. P., Horowitz, S. H., *et al.* (2000). Early stroke treatment associated with better outcome: the NINDS rt-PA stroke study. *Neurology* 55, 1649-1655.

Maurice Victor, A. H. R. (2001). *Adams and Victor's Principles of Neurology*, 4th edn, McGraw-Hill Education - Europe).

Meade, T. W., Mellows, S., Brozovic, M., Miller, G. J., Chakrabarti, R. R., North, W. R., Haines, A. P., Stirling, Y., Imeson, J. D., and Thompson, S. G. (1986). Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet* 2, 533-537.

Michelson, A. D., Furman, M. I., Goldschmidt-Clermont, P., Mascelli, M. A., Hendrix, C., Coleman, L., Hamlington, J., Barnard, M. R., Kickler, T., Christie, D. J., *et al.* (2000). Platelet GP IIIa Pl(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation* 101, 1013-1018.

Nedergaard, M. (1988). Mechanisms of brain damage in focal cerebral ischemia. *Acta Neurol Scand* 77, 81-101.

Neumann, F. J., Gawaz, M., Ott, I., May, A., Mossmer, G., and Schomig, A. (1996). Prospective evaluation of hemostatic predictors of subacute stent thrombosis after coronary Palmaz-Schatz stenting. *J Am Coll Cardiol* 27, 15-21.

Nickolaus, B. (2000). Wie die Mikrozirkulation verbessert werden kann. *Deutsches Ärzteblatt Heft 21*, B-1228.

NINDS-rt-PA-Stroke-Study-Group (2000). Effect of intravenous recombinant tissue plasminogen activator on ischemic stroke lesion size measured by computed tomography. NINDS; The National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) rt-PA Stroke Study Group. *Stroke* 31, 2912-2919.

Nishiuma, S., Kario, K., Yakushijin, K., Maeda, M., Murai, R., Matsuo, T., Ikeda, U., Shimada, K., and Matsuo, M. (1998). Genetic variation in the promoter region of the beta-fibrinogen gene is associated with ischemic stroke in a Japanese population. *Blood Coagul Fibrinolysis* 9, 373-379.

No-authors-listed (1995). Cholesterol, diastolic blood pressure, and stroke: 13,000 strokes in 450,000 people in 45 prospective cohorts. Prospective studies collaboration. *Lancet* 346, 1647-1653.

Poeck K, H. W. (2001). *Neurologie*, 11th edn (Berlin-Heidelberg, Germany, Springer).

Qizilbash, N. (1995). Fibrinogen and cerebrovascular disease. *Eur Heart J* 16 *Suppl A*, 42-45; discussion 45-46.

Ridker, P. M., Cushman, M., Stampfer, M. J., Tracy, R. P., and Hennekens, C. H. (1997). Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men [published erratum appears in *N Engl J Med* 1997 Jul 31;337(5):356] [see comments]. *N Engl J Med* 336, 973-979.

Rooney, M. M., Farrell, D. H., van Hemel, B. M., de Groot, P. G., and Lord, S. T. (1998). The contribution of the three hypothesized integrin-binding sites in fibrinogen to platelet-mediated clot retraction. *Blood* 92, 2374-2381.

Roy, S., Overton, O., and Redman, C. (1994). Overexpression of any fibrinogen chain by Hep G2 cells specifically elevates the expression of the other two chains. *J Biol Chem* 269, 691-695.

Rubin E, F. J. (1999). *Pathology*, 3rd edn (Philadelphia, PA, USA, Lippencott-Raven Publisher).

Scandinavian-Stroke-Study-Group (1985). Multicenter trial of hemodilution in ischemic stroke-background and study protocol. Scandinavian Stroke Study Group. *Stroke* 16, 885-890.

Scandinavian-Stroke-Study-Group (1987). Multicenter trial of hemodilution in acute ischemic stroke. I. Results in the total patient population. Scandinavian Stroke Study Group. *Stroke* 18, 691-699.

Scandinavian-Stroke-Study-Group (1988). Multicenter trial of hemodilution in acute ischemic stroke. Results of subgroup analyses. Scandinavian Stroke Study Group. *Stroke* 19, 464-471.

Seino, Y., Ikeda, U., Ikeda, M., Yamamoto, K., Misawa, Y., Hasegawa, T., Kano, S., and Shimada, K. (1994). Interleukin 6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions. *Cytokine* 6, 87-91.

- Sherman, D. (2003). Antithrombotic and hypofibrinogenetic therapy in acute ischemic stroke: what is the next step? *Cerebrovasc Dis*, 138-143.
- Siesjo, B. K. (1988). Historical overview. Calcium, ischemia, and death of brain cells. *Ann N Y Acad Sci* 522, 638-661.
- Smeeth, L., Thomas, S. L., Hall, A. J., Hubbard, R., Farrington, P., and Vallance, P. (2004). Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. *N Engl J Med* 351, 2611-2618.
- Steel, D. M., and Whitehead, A. S. (1994). The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 15, 81-88.
- Stouthard, J. M., Levi, M., Hack, C. E., Veenhof, C. H., Romijn, H. A., Sauerwein, H. P., and van der Poll, T. (1996). Interleukin-6 stimulates coagulation, not fibrinolysis, in humans. *Thromb Haemost* 76, 738-742.
- Strong, A. J., Tomlinson, B. E., Venables, G. S., Gibson, G., and Hardy, J. A. (1983). The cortical ischaemic penumbra associated with occlusion of the middle cerebral artery in the cat: 2. Studies of histopathology, water content, and in vitro neurotransmitter uptake. *J Cereb Blood Flow Metab* 3, 97-108.
- Sugimoto T, O. M. (1999). *Internal Medicine*, 7th edn (Tokyo, Japan, Asakura).
- Syrjanen, J., Valtonen, V. V., Iivanainen, M., Kaste, M., and Huttunen, J. K. (1988). Preceding infection as an important risk factor for ischaemic brain infarction in young and middle aged patients. *Br Med J (Clin Res Ed)* 296, 1156-1160.
- Thompson, S. G., Kienast, J., Pyke, S. D., Haverkate, F., and van de Loo, J. C. (1995). Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med* 332, 635-641.
- Tong, D. C., and Albers, G. W. (1995). Transcranial Doppler-detected microemboli in patients with acute stroke. *Stroke* 26, 1588-1592.
- Unkelbach, K., Kalb, R., Santoso, S., Kroll, H., Mueller-Eckhardt, C., and Kiefel, V. (1995). Genomic RFLP typing of human platelet alloantigens Zw(PIA), Ko, Bak and Br (HPA-1, 2, 3, 5). *Br J Haematol* 89, 169-176.
- Urbano LA, J. B. (2004). Antiplatelet drugs in ischemic stroke prevention: from monotherapy to combined treatment. *Cerebrovasc Dis*, 74-80.

Literaturverzeichnis

- van 't Hooft, F. M., von Bahr, S. J., Silveira, A., Iliadou, A., Eriksson, P., and Hamsten, A. (1999). Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 3063-3070.
- Venti, M., Parnetti, L., and Gallai, V. (2002). Genetics of ischemic stroke. *Clin Exp Hypertens* 24, 531-534.
- Vinken, P. J. (1972). *Handbook of Clinical Neurology : Neurology, Neuroscience*, Vol 53 (Amsterdam, Neitherland, Elsevier Science Ltd).
- Volk, H.-D., Keyßer, G., and Burmester, G. R. (2000). Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. In, L. Thomas, ed. (Frankfurt/Main, Germany, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH), pp. 788.
- Wagner, C., and Dati, F. (2000). Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. In, L. Thomas, ed. (Frankfurt/Main, Germany, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH), pp. 788.
- Wagner, K. R., Giles, W. H., Johnson, C. J., Ou, C. Y., Bray, P. F., Goldschmidt-Clermont, P. J., Croft, J. B., Brown, V. K., Stern, B. J., Feaser, B. R., *et al.* (1998). Platelet glycoprotein receptor IIIa polymorphism P1A2 and ischemic stroke risk: the Stroke Prevention in Young Women Study. *Stroke* 29, 581-585.
- Weng, X., Cloutier, G., and Genest, J., Jr. (1999). Contribution of the -455G/A polymorphism at the beta-fibrinogen gene to erythrocyte aggregation in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost* 82, 1406-1411.
- Wilhelmsen, L., Svardsudd, K., Korsan-Bengtson, K., Larsson, B., Welin, L., and Tibblin, G. (1984). Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *N Engl J Med* 311, 501-505.
- Yarnell, J. W., Baker, I. A., Sweetnam, P. M., Bainton, D., O'Brien, J. R., Whitehead, P. J., and Elwood, P. C. (1991). Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly and Speedwell collaborative heart disease studies. *Circulation* 83, 836-844.
- Yu, S., Sher, B., Kudryk, B., and Redman, C. M. (1983). Intracellular assembly of human fibrinogen. *J Biol Chem* 258, 13407-13410.
- Yu, S., Sher, B., Kudryk, B., and Redman, C. M. (1984). Fibrinogen precursors. Order of assembly of fibrinogen chains. *J Biol Chem* 259, 10574-10581.

7 Abkürzungen

| | |
|------|---|
| APP | Akut-Phase-Proteine |
| APR | Akut-Phase-Reaktion |
| aPTT | aktivierte partielle Thromboplastinzeit |
| ASS | Acetylsalizylsäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Bp | Basepaare |
| C | Cytosin |
| CCT | kranielle Computertomographie |
| CRP | C-Reaktives-Protein |
| CT | Computertomographie |
| dNTP | 2'-Deoxynukleotid 5'-Triphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetylsäure |
| EKG | Elektrokardiographie |
| G | Guanin |
| GP | Glykoprotein |
| HCL | Hydrogenchlorid |
| Hkt | Hämatokrit |
| Il-1 | Interleukin 1 |
| Il-6 | Interleukin 6 |
| Ile | Isoleucin |
| KCL | Kaliumchlorid |
| Leu | Leucin |
| MCA | Arteria cerebri media |
| MgCl | Magnesiumchlorid |
| MRT | Magnet Resonanz Tomographie |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PFO | Persistierendes Foramen Ovale |

Abkürzungen

| | |
|---------------|---|
| PNK | Polynukleotidkinase |
| Pro | Prolin |
| PTZ | Plasma-Thrombinzeit |
| RFLP | Restriktionsfragment Längenpolymorphismus |
| rt-PA | rekombinierter Gewebe-Plasminogen-Aktivator |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Ser | Serin |
| SSC | Natrium/Natriumcitrate |
| SSS | Scandinavian Stroke Score |
| STA | Arteria temporalis superficialis |
| T | Thymin |
| TBE | Tris-Base EDTA Puffer |
| TEE | transösophageale Echokardiographie |
| TIA | transitorische ischämische Attacke |
| TNF- α | Tumor-Nekrose-Faktor α |
| TOAST | <i>The Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment</i> |
| TTE | transthorakale Echokardiographie |
| UKE | Universitätsklinikum Eppendorf-Hamburg |
| vWF | von Willebrand Faktor |
| Δ SSS | Differenz des SSS bei der Entlassung und Aufnahme |

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei

- Meinem Doktorvater **PD. Dr. med. Axel Methner** aus der neurologischen Abteilung des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.
- **Dr. med. Jan Lewerenz** aus der neurologischen Abteilung des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, der immer da war und mir geholfen hat.
- Frau **Prof. Dr. Chica Schaller** für die Benutzung des Labors im ZMNH
- Meinem Hund **Collo**, der beste und schönste Hund der Welt.
- Meiner künftigen Frau, (noch nicht **Dr. med.**) **Jana-Christiane Diercks**.
- Meinen Eltern **Rikiya** und **Asako Koseki**, die mir die Gelegenheit gegeben haben und immer hinter mir standen.
- Meinem Bruder **Tatsuya Koseki**, warum auch immer, vielleicht weil er einfach mein Bruder ist.
- Meinem Freund und Kollege **Dr. med. Lars Suhrbier**
- Dipl. Ing. **Sven Witzenhausen** für die technische Unterstützung.
- Meinen Freunden **Alexandre Vulliamy** aus der Schweiz, **Tommy Andersson** aus Schweden, **Peter Messiaen, M.D.** aus Belgien.
- **Dr. med. Marc Schickel** und **Anette Steiger-Schickel**.
- Herren **Seiichiro Shinzato, M.D.** und **Satoshi Ayuzawa, M.D.** aus Japan
- Herrn **Dr. med. Lutz Steinmüller** aus AK Eilbek, meinem Chef im AK Eilbek.
- Meinen Kollegen aus AK Eilbek **Dres. med. B. Blask, A. Augustin, G. Aschmotat, B. Rauhut, S. Jeremias, K. Dannemann, K. Neubeck**.
- Herrn **Dr. med. Dietrich Braumann** aus AK Altona, meinem großen Vorbild als klinischer Arzt.

9 Lebenslauf

| | |
|-----------------|---|
| 16. August 1972 | geboren in Chigasaki/Japan |
| 09/1978-11/1979 | Grundschule Schul an der Bernerau, Hamburg |
| 12/1979-03/1985 | Teshirogi Minami elementary school, Japan |
| 04/1985-03/1987 | Teshirogi junior-high school, Japan |
| 04/1987-03/1988 | Kureha junior-high school, Japan |
| 04/1988-03/1991 | Mizubishi high school, Japan |
| 04/1991-03/1995 | Sportstudium an der Tsukuba University, Japan |
| 03/1995 | Erwerb „ <i>the Bachelor of Health and Physical Education</i> “ |
| 05/1995-12/1996 | Deutsch-Sprachkurs am Goethe-Institut Berlin |
| 04/1996- | Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg |
| 03/1998 | Physikum |
| 03/1999 | 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung |
| 09/2001 | 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung |
| 10/2001-09/2002 | Das praktische Jahr Rechtsmedizin, Universitätskrankenhauses Eppendorf Pathologie, Allgemeinen Krankenhauses Altona Innere Medizin, Allgemeinen Krankenhauses Altona, Chirurgischen, Allgemeinen Krankenhauses Altona |
| 11/2002 | 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung |
| 12/2002-06/2004 | Arzt im Praktikum in der allgemein-, visceral- und gefäß- chirurgischen Abteilung des Allgemeinen Krankenhauses Eil- bek, Hamburg |
| 07/2004-12/2004 | als Assistenzarzt tätig in der allgemein-, visceral- und gefäß- chirurgischen Abteilung des Allgemeinen Krankenhauses Eil- bek, Hamburg |

10 Erklärung

(nach § 4 der Promotionsordnung)

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Naoya Koseki