

Technische Universität München
Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

**Einfluss von antithrombozytären Wirkstoffen auf
die plättcheneigene Thrombingeneration**

Oliver Meier

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E.J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. St. Massberg
2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 19.12.2012 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26.02.2014 angenommen.

*Für meine Mutter
und
Für Sandra und Noah*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Bedeutung der Thrombozyten.....	1
1.1.1	Thrombozytenmorphologie.....	2
1.1.2	Funktionsstadien der Plättchenaktivierung.....	3
1.2	Die Adhäsion.....	4
1.3	Die Aggregation.....	6
1.4	Thrombozytäre Integrine.....	7
1.5	ADP-Rezeptoren.....	9
1.6	Antithrombozytäre Substanzen.....	11
1.6.1	Cyclooxygenasehemmer.....	12
1.6.2	Thienopyridine.....	13
1.6.3	GPIIb-IIIa-Antagonisten.....	15
1.7	Therapie des akuten Koronarsyndroms.....	17
1.8	Aggregations-Reagenzien.....	20
1.8.1	Thrombin.....	20
1.8.2	Tissue Factor.....	21
1.9	Zielsetzung.....	23
2	Methodik.....	24
2.1	Probengewinnung:.....	24
2.1.1	Probenweiterverarbeitung:.....	24
2.1.2	Bestimmung der plättchenabhängigen Thrombingeneration.....	27
2.1.3	Statistische Auswertung.....	31
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Aggregation und Thrombingeneration.....	32
3.1.1	Plättchenaggregation.....	32
3.1.2	ATP- Freisetzung unter ADP und TRAP Stimulierung.....	36
3.1.3	Plättchenabhängige Thrombingeneration.....	39
3.1.4	Gesamt Thrombinfreisetzung.....	55
4	Diskussion.....	57
4.1	Plättchenaggregation und ATP Release.....	58
4.2	Degranulation.....	58
4.3	Thrombin stimulierte Thrombingeneration.....	59
4.4	Tissue-factor stimulierte Thrombingeneration.....	59
4.5	Direkter Vergleich der Fibrinogenrezeptorantagonisten.....	60
4.6	Therapeutische Aussichten.....	61
5	Zusammenfassung.....	63
	Abbildungsverzeichnis.....	65
	Tabellenverzeichnis.....	67
	Literaturverzeichnis.....	68
	Danksagung.....	92
	Anhang.....	93
	Thrombin-Messung mit S-2238.....	95

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der Thrombozyten

Die Erkrankungen des Kreislaufsystems stellen in Deutschland, sowie in anderen Wirtschaftsstaaten die häufigste Todesursache dar. Vorallem die lebensnotwendigen Organe wie Herz und Gehirn werden durch kardiale und cerebrale Ischämie bedroht. In der Genese dieser Erkrankungen spielen viele Risikofaktoren eine entscheidende Rolle, deren Therapie die vorderste Maßnahme zur Sekundärprophylaxe darstellt. Vorallem die antithrombozytäre Therapie ist eine der wichtigsten Grundstrategien in diesem Behandlungskonzept (Boden 1998, TIMI IIIB-Investigator 1994). Der Vorgang der Hämostase ist dabei durch ein enges Zusammenspiel von vaskulären, zellulären und plasmatischen Vorgängen gekennzeichnet. Jedes System für sich weist sowohl pro- als auch antithrombotische Mechanismen auf, die sich im physiologischen Zustand im Gleichgewicht befinden und somit ein unkontrolliertes Thrombuswachstum verhindern.

Verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten eines prothrombotischen Zustands, entsteht eine Thromboseneigung (thrombophile Diathese). Überwiegen die antithrombotischen und fibrinolytischen Mechanismen, werden Blutungen begünstigt (hämorrhagische Diathese).

Zentraler Bestandteil der zellulären Komponente sind Thrombozyten, die aufgrund vielfacher Interaktionen in der Lage sind, auch auf die vaskuläre und plasmatische Blutstillung einzuwirken (Schrör 1994, Colman 1994). Eine gestörte Funktion der Blutplättchen oder eine zu geringe Anzahl bergen die Gefahr schwerer bis hin zu unstillbaren Blutungen. Thrombozyten spielen ebenso eine große Rolle bei der Atherogenese, der Entwicklung von akuten arteriellen Thrombosen und ischämischen Komplikationen bei atherosklerotischen Krankheitsbildern (Ross 1993, Fuster 1992, Willerson 1989).

Unter physiologischen Bedingungen interagieren die Blutplättchen nicht oder nur sehr eingeschränkt mit der Gefäßwand. Verletzungen der Gefäßinnenwand jedoch stören die antithrombotischen Eigenschaften des Endothels und setzen das Blut den adhäsiven Molekülen des Subendothels aus. Die Plättchenadhäsion an die beschädigte Gefäßwand ist der erste Schritt der Hämostase und Thrombose (Sixma 1994). Nach der Adhäsion kommt es zur Formveränderung der Blutplättchen und zur Aktivierung, welches zur Freisetzung intrazellulärer Granula und zur Aggregation führt (Nurden 1994, Siess 1989).

1.1.1 Thrombozytenmorphologie

Thrombozyten sind kernlose, korpuskuläre Blutbestandteile und entstehen im Knochenmark aus Megakaryozyten, die pulmonalen Gefäße scheinen ebenfalls ein weiterer Bildungsort darzustellen (Cramer 2001, George 2001, Hershock 2001). Sie zirkulieren mit einer durchschnittlichen Anzahl von 150.000 bis 300.000 pro μl für neun bis zehn Tage im peripheren Blut (Mackie 1988). Im ruhenden Zustand haben sie eine diskoide Form, einen Durchmesser von 2-4 μm und ein durchschnittliches Volumen von 9,5 μm^3 . Thrombozyten zeigen einen komplexen inneren Aufbau, den man nach morphologischen Kriterien in vier unterschiedliche Bereiche einteilen kann (Mackie 1988):



Abb. 1: Diskoide Form nicht-aktivierter Thrombozyten

Quelle: Das Blutplättchen; M.Gawaz; Georg Thieme Verlag 1999

Periphere Zone: Dieser Bereich besteht aus der trilaminären Zellmembran, die reich an Glykoproteinen, Proteinen und Mukopolysacchariden ist. Die Glykoproteine, die sich elektrophoretisch trennen lassen, übernehmen als Oberflächenrezeptoren spezifische Funktionen (Mackie 1988).

Strukturelle Zone: Sie enthält das Zytoplasma und das Zytoskelett, das sich aus Mikrofilamenten, Mikrotubuli und submembranös gelagerten Aktinfilamenten zusammensetzen. Die Verankerung dieses fibrillären, kontraktilen Systems mit der Zellmembran ermöglicht dem stimulierten Thrombozyten aktive Formveränderungen und die Ausbildung von Pseudopodien (Mackie 1988).

Zone der Zellorganellen: In diesem Bereich befinden sich vor allem Mitochondrien, Golgi-Apparate, Ribosomen und eine hohe Anzahl an plättchenspezifischen Granula. Bei den Granula werden Lysosomen, α -Granula und Dichte-Granula, welche elektronenmikroskopisch als dicht erscheinen, unterschieden. Alle Arten von Granula verschmelzen nach Aktivierung der Thrombozyten mit der Zellmembran und setzen zahlreiche hämostaserelevante Substanzen frei (Mackie 1988).

Membransysteme: Es wurden bisher zwei verschiedene Membransysteme beschrieben, welche sich in Aufbau und Funktion unterscheiden. Das offene kanalikuläre System („Surface Connected System“, SCS) bewirkt eine starke Vergrößerung der Zelloberfläche, während im dichten tubulären System („Dense Tubular System“, DTS) der Arachidonsäure-Metabolismus des Blutplättchens stattfindet (Mackie 1988). Das kanalikuläre System bildet transzelluläre Membranstapel, welche mit der Plättchenoberfläche und mit dem Zellinneren verbunden sind und so dem Stoffaustausch dienen können. Die Membranstapel können nach Aktivierung des Thrombozyten mit der Zellmembran verschmelzen, wodurch Glykoproteine, die als Membranrezeptoren fungieren können, an die Zelloberfläche gelangen. Das kanalikuläre System stellt somit ein Reservepotential an Glykoproteinen dar (Charo 1994).

1.1.2 Funktionsstadien der Plättchenaktivierung

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen zwei Funktionsstadien der Plättchenaktivierung, der initialen Adhäsion und der Aggregation.

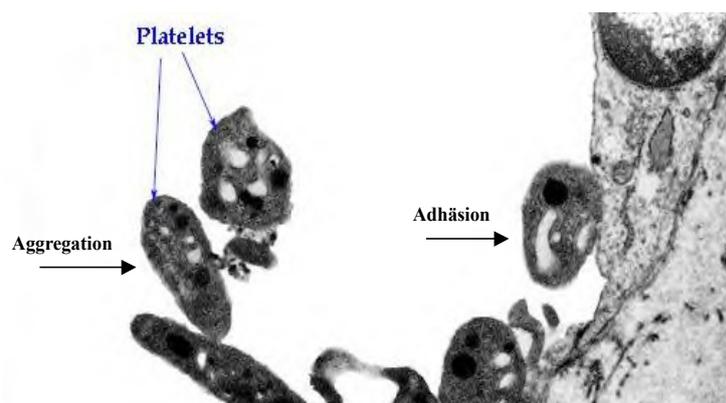


Abb. 2: Aggregation und Adhäsion

Quelle: Das Blutplättchen; M.Gawaz; Georg Thieme Verlag 1999

1.2 Die Adhäsion

Die Adhäsion von noch ruhenden Blutplättchen an die verletzte Gefäßwand ist der erste Schritt der primären Hämostase und wird primäre Adhäsion genannt. Die Anlagerung von schon aktivierten Thrombozyten an Strukturen des Subendothels wird als sekundäre Adhäsion bezeichnet (Andrews 1997, DeGroot 1990, Ruggeri 1994).

Der Adhäsionsvorgang wird durch thrombozytäre Membranglykoproteine gesteuert. Durch den ersten Kontakt zirkulierender Blutplättchen mit der subendothelialen Oberfläche im Bereich einer Gefäßwandläsion bindet der Glykoprotein(GP)-Ib/V/IX-Komplex mit kollagenimmobilisiertem von-Willebrand-Faktor. Dadurch kommt es zur Haftung des Blutplättchens an der Gefäßwand (**Kontaktphase**) (Sixma 1994, Nurden 1994). Über weitere membranständige Adhäsionsrezeptoren (Kollagen-, Fibronektin- und Lamininrezeptoren) erfolgt eine Stabilisierung der Plättchenadhäsion (**Phase der Stabilisierung**) (Nurden 1994).

Der Kollagen-Rezeptor $\alpha_2\beta_1$ ist ein bedeutender sekundärer Rezeptor für die Plättchen-Adhäsion. Die Interaktion zwischen $\alpha_2\beta_1$ und Kollagen führt zur Aktivierung des Blutplättchens und zu dessen Formveränderung. Während dieses Prozesses wird auch der Fibrinogen-Rezeptor GPIIb-IIIa aktiviert und stellt den engen Kontakt des Blutplättchens mit der Oberfläche sicher (**Phase der Aktivierung**) (Nurden 1994). Während der Formveränderung kommt es zur Bildung von Pseudopodien und zur Ausbreitung des Thrombozyten, was eine effektive Abdichtung der Gefäßwandläsion begünstigt (**Phase des Ausbreitens**) (Nurden 1994). Der adhärenente und aktivierte Thrombozyt bildet aus freigesetzter Arachidonsäure (AA) Thromboxan A₂ (TxA₂), welches nach Abgabe in den Extrazellulärraum über Bindung an einen spezifischen Thromboxanrezeptor den Aktivierungsvorgang verstärkt. Des Weiteren werden während der Adhäsion Granulainhaltsstoffe freigesetzt (Sekretion), welche sowohl autokrin den Aktivierungsvorgang verstärken als auch durch Stimulation noch ruhender Thrombozyten (parakrin) diese aus der Zirkulation rekrutieren und zur Aggregation mit schon adhärenenten Plättchen anregen (Siess 1989). Die Interaktion von noch zirkulierenden Blutplättchen mit schon adhärenenten Thrombozyten erfolgt über aktivierte GPIIb-IIIa-Rezeptoren. Das Endstadium der Adhäsion ist erreicht, wenn der Thrombozyt vollkommen über dem Subendothel ausgespreizt ist und die Endothelläsion gegenüber dem Blutstrom abgedichtet ist (Nurden 1994) (Abbildung 3).

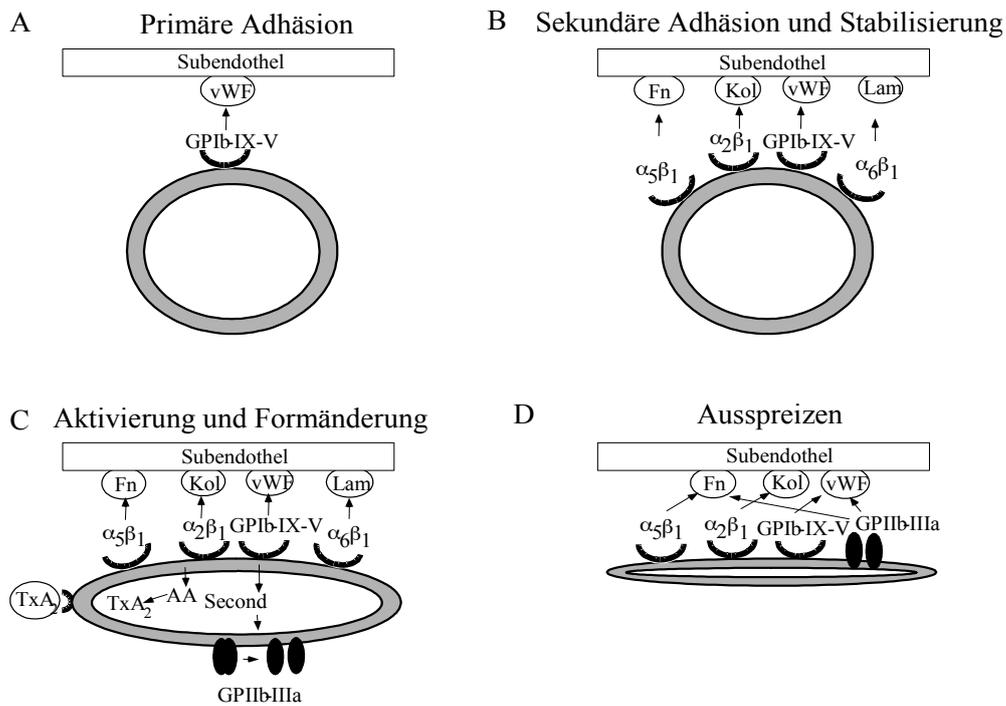


Abb. 3: Schematische Darstellung der Thrombozytenadhäsion : Zu Beginn erfolgt die Bindung von GP Ib-IX-V an den von-Willebrand-Faktor der Endothelzellen (A). Dieser Kontakt löst eine weitere Aktivierung von Membranglykoproteinen aus und bewirkt damit die Stabilisierung der Bindung (B). Es kommt zur Aktivierung und Formveränderung des Thrombozyten mit Aktivierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors und der Freisetzung von Granulainhaltsstoffen (C). Schließlich kommt es zur Bildung von Pseudopodien und zur Ausbreitung des Thrombozyten (D).

Fn: Fibronectin; Kol: Kollagen; Lam: Laminin; vWF: von Willebrandt-Faktor; Tx A_2 : Thromboxan A_2 ; AA: Arachidonsäure.

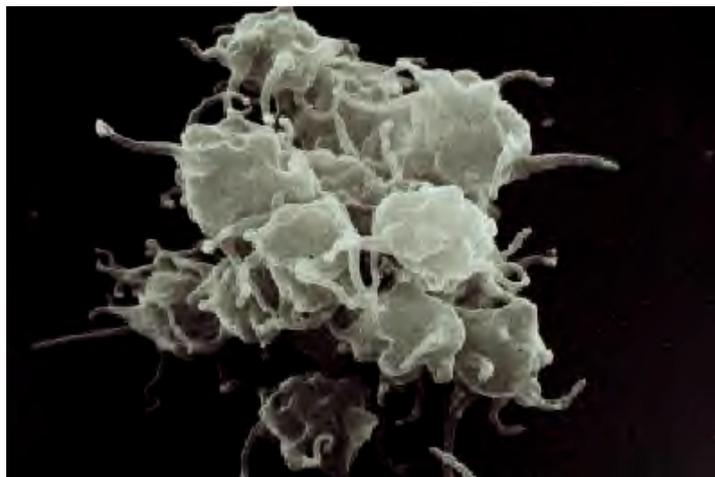


Abb.4 : Thrombozyten in der Aggregation mit Pseudopodienausbildung

Quelle: Das Blutplättchen; M.Gawaz; Georg Thieme Verlag 1999

1.3 Die Aggregation

Aggregation nennt man den Vorgang der Koadhäsion zwischen zwei Thrombozyten. Ein bedeutender Rezeptor für die Aggregation der Blutplättchen ist der Fibrinogen-Rezeptor GPIIb-IIIa. Die Aggregation erfordert eine Konformationsänderung des GPIIb-IIIa, die durch verschiedene Stimulatoren, wie z.B. ADP, Thrombin oder Adrenalin, bewirkt wird.

Diese Konformationsänderung ermöglicht die Bindung von löslichem Fibrinogen an den GPIIb-IIIa-Rezeptor und damit an die Plättchenmembran (Gawaz 1999). Im weiteren Verlauf bewirken Fibrinogenbrücken die Ausbildung von Plättchen-Aggregaten (Siess 1989, Ginsberg 1995, Gawaz 1991, Plow 1992) (Abbildung 5).

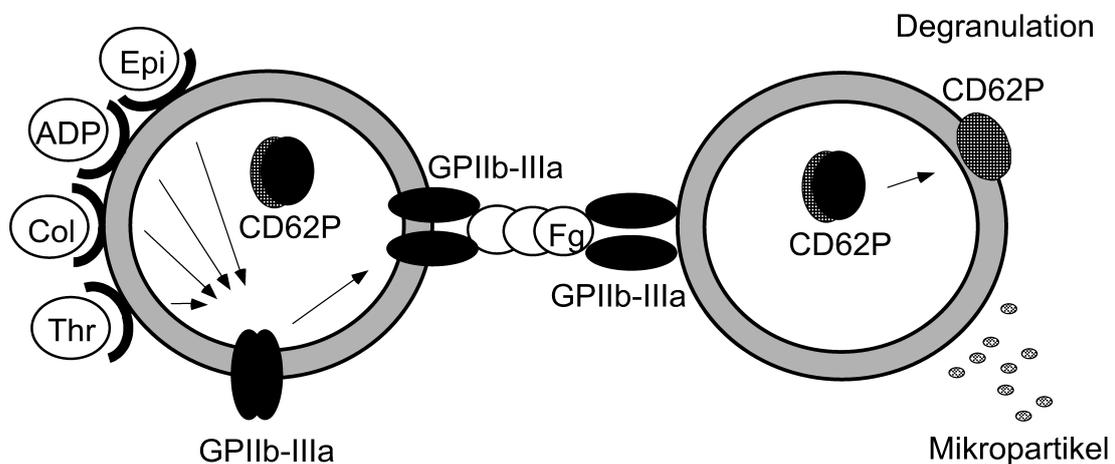


Abb. 5: Schematische Darstellung der Thrombozytenaggregation: Die Stimulierung des Thrombozyten bewirkt eine Konformationsänderung des GPIIb-IIIa. Dies ermöglicht die Bindung von löslichem Fibrinogen an den GPIIb-IIIa und die Bildung von Plättchenaggregaten über Fibrinogenbrücken. Außerdem kommt es durch die Aktivierung des Thrombozyten zur Freisetzung von Granulainhaltsstoffen. Epi: Epinephrin; Col: Kollagen; Thr: Thrombin; ADP: Adenosintriphosphat; Fg: Fibrinogen.

Es wird die primäre von der sekundären Aggregation unterschieden. Während der primären Phase werden Thrombozyten über Fibrinogenbrücken locker miteinander verbunden. Dieser Vorgang ist reversibel. Die irreversible, sekundäre Aggregation tritt nach Aggregati-

onsbeginn verzögert auf und beginnt sobald der Thrombozyt Granulainhaltsstoffe freisetzt (Ruggeri 1994).

Die Adhäsion und die Aggregation lösen intrazelluläre Signalwirkungen aus, welche zahlreiche Reaktionen zur Folge haben, wie z.B. die Bildung und Sekretion von Thromboxan- A_2 (TXA₂), Serotonin und ADP. Diese Substanzen bewirken wiederum die Aktivierung von weiteren Blutplättchen, eine Verengung der Blutgefäße und eine Verlangsamung des Blutflusses. Dadurch steigt einerseits die Interaktion zwischen den Blutplättchen untereinander und andererseits zwischen den Plättchen und der Gefäßwand an (Willerson 1989, Siess 1989).

1.4 Thrombozytäre Integrine

Integrine sind Transmembranrezeptoren, sie verbinden das Zytoskelett der Zelle mit dem Extrazellulärraum. Das bedeutendste dieser Membranglykoproteine ist der Fibrinogenrezeptor GPIIb-IIIa (siehe Abbildung 6). Hierbei handelt es sich um ein heterodimeres Glycoprotein mit je einer nicht-kovalent verbundenen α - (GPIIb) und β -Untereinheit (GPIIIa; Plow 1992). Es befinden sich zwischen 60.000 und 100.000 dieser Rezeptoren auf einem Blutplättchen (Ginsberg 1995). 70 % des GPIIb-IIIa sind im Ruhezustand auf der Plättchenoberfläche exprimiert, die restlichen 30 % befinden sich im „surface connecting system“ (SCS) und in den intrazellulären α -Granula (Nurden 1994, Morgenstern 1997). Bei Aktivierung der Blutplättchen gelangen die Rezeptoren, welche sich in den internen Speichern befinden, an die Zelloberfläche (Woods 1986). Bestimmte Aminosäuresequenzen, wie Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) oder Dodeca (KQAGDV), die z.B. Bestandteil des Fibrinogenmoleküls sind, binden an spezifische Regionen des GPIIb-IIIa-Komplexes. RGD und KQAGDV enthaltende Peptide konkurrieren dabei mit Fibrinogen um eine gemeinsame Bindungsstelle (Plow 1992, Lefkovitz 1995)

Angeborene Defekte des GPIIb-IIIa, wie bei der Thrombasthenie Glanzmann (Morbus Glanzmann), führen zu einer fehlerhaften Plättchenaggregation und zu verlängerten Blutungszeiten (Nurden 1994).

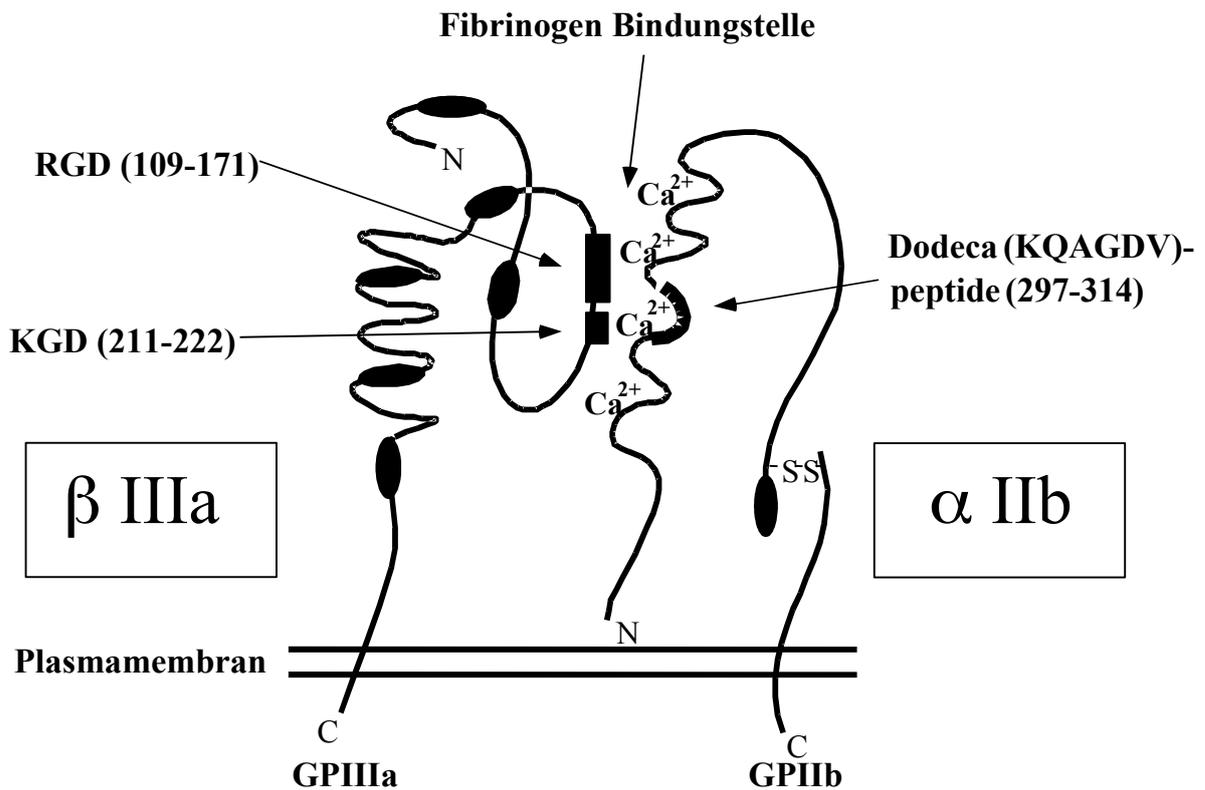


Abb. 6: Struktur des GP IIb-IIIa-Rezeptor

Der GPIIb-IIIa-Rezeptor besteht aus einer α -Untereinheit (GPIIb) und einer β -Untereinheit (GPIIIa) (nach Gawaz 2001).

Nach Zellaktivierung kommt es zur Aktivierung des Fibrinogenrezeptors, d.h. zur Heterodimerbildung und zum Übergang in einen hochaffinen Zustand (Shattil 1995). In diesem hochaffinen Zustand kann gelöstes Fibrinogen gebunden, und somit eine Plättchen-Plättchen-Interaktion durch Fibrinogenbrücken induziert werden (Du 1997). Bindung von Fibrinogen an den aktivierten Fibrinogenrezeptor induziert eine Konformationsänderung des Moleküls mit Freilegung von Liganden induzierenden Bindungsstellen (LIBS), dadurch werden intrazelluläre Mechanismen reguliert, die die irreversible Fibrinogenbindung und ein Rezeptor Clustering bewirken. Deswegen stellt der GPIIb-IIIa-Rezeptor einen dominierenden Angriffspunkt der antithrombozytären Therapie dar, z.B. während eines interventionellen Eingriffes am Herzkranzgefäß (Coller 1997).

Ein weiteres Membranglykoprotein der Thrombozyten ist das Leucin-reiche Glykoprotein Ib/IX/V, das als thrombozytärer Rezeptor für von-Willebrand-Faktor fungiert und somit eine zentrale Rolle in der primären Hämostase spielt (Clemetson 1997).

Ein angeborener Defekt des GP Ib/IX/V im Bernard-Soulier-Syndrom führt zu einem funktionellen Defekt der Plättchenadhäsion und zu einer erhöhten Blutungsneigung (Nurden 1999).

1.5 ADP-Rezeptoren

Die Thrombozytenoberfläche weist eine Reihe von ADP-Bildungsstellen auf, von denen bisher im Wesentlichen drei purinerge Rezeptoren, P2X₁, P2Y₁ und P2Y₁₂ näher charakterisiert wurden (Kunapuli 1998).

Der ionotrope Purinorezeptor P2X₁ steuert den ADP-induzierten Calcium-Einstrom und den „Shape-change“ der Plättchen (siehe Abbildung 4). Dieser Aktivierungsvorgang wird anscheinend nicht von den Substanzen der Thienopyridin-Klasse beeinflusst. Dies könnte eine Ursache dafür sein, dass trotz Behandlung mit Ticlopidin oder Clopidogrel ein intrazellulärer Calciumanstieg sowie eine Formveränderung der Plättchen nicht zu verhindern sind (Gachet 1997).

Der zweite purinerge Rezeptor, P2Y₁, besitzt sieben transmembranöse Domänen und ist an inhibitorische G-Proteine gekoppelt. P2Y₁ vermittelt durch die Freisetzung von Inositoltriphosphat (IP₃) als „second-messenger“ die ADP-induzierte Ausschüttung von intrazellulärem Calcium, die Aktivierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors und nachfolgend die Plättchenaggregation (Nicholas 1996). Jedoch scheint die alleinige Aktivierung von P2Y₁-Rezeptoren nicht ausreichend für eine vollständige Thrombozytenaggregation zu sein. Eine vollständige ADP-induzierte Plättchenaggregation erfordert die Koaktivierung der beiden Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂ (Gachet 2001).

Ähnlich wie P2Y₁ vermittelt auch P2Y₁₂ die ADP-induzierte Freisetzung von intrazellulär gespeichertem Calcium, wenngleich über einen unterschiedlichen Signaltransduktionsweg (Inhibierung der Adenylatcyclase). Versuche mit radioaktiv-markiertem ADP lassen es sehr wahrscheinlich erscheinen, dass dieser Rezeptor der Hauptangriffspunkt der Thienopyridine ist (Hollopeter 2001).

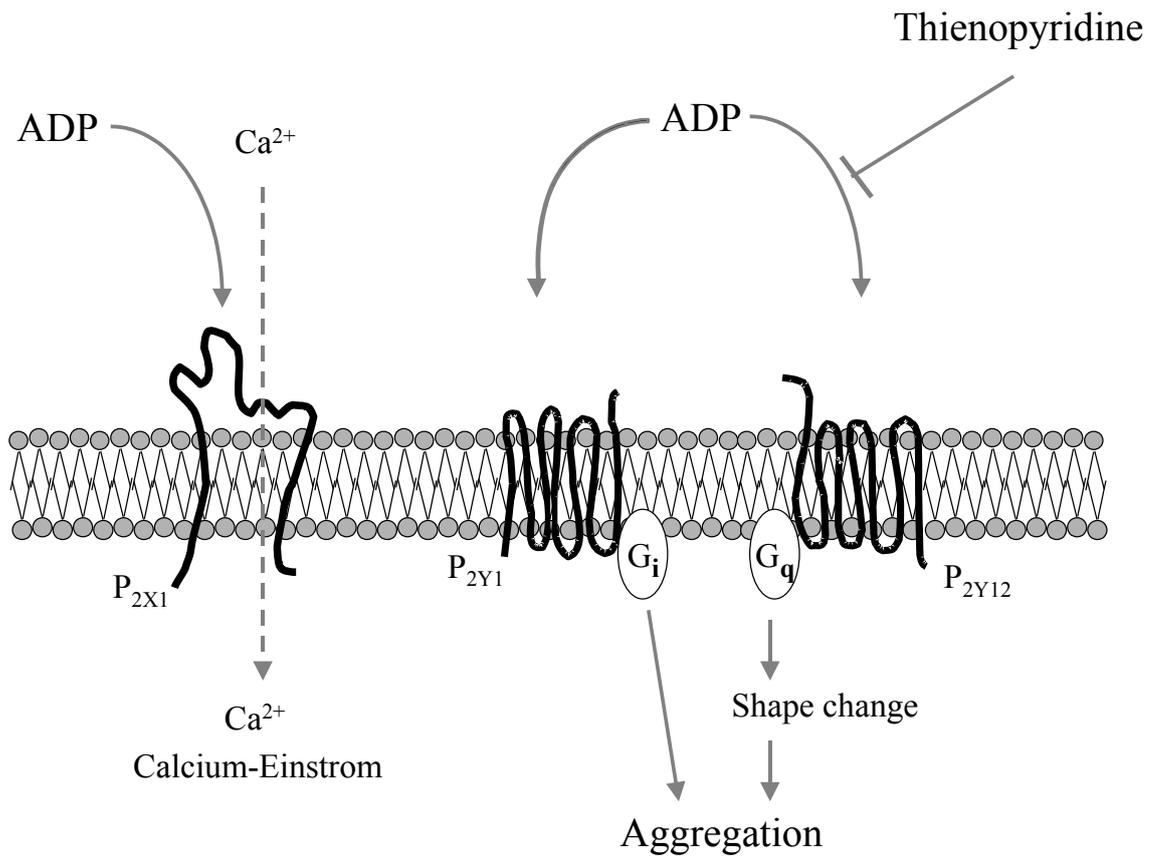


Abb. 7 : ADP-Rezeptoren

ADP führt durch Bindung an den P_{2X1}-Rezeptor mittels Calciumeinstrom direkt und über die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren P_{2Y1} und P_{2Y12} mittels Freisetzung von intrazellulärem Calcium indirekt, zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration an Calciumionen und damit zur Formveränderung und Aggregation des Thrombozyten. Die ADP-Wirkung am P_{2Y12} wird unter dem Einfluss der Thienopyridine blockiert (nach Gawaz 2001).

1.6 Antithrombozytäre Substanzen

In Abbildung 8 sind die verschiedenen Wirkorte der untersuchten antithrombozytären Substanzen dargestellt. Ein weiterer Schritt zur Vermeidung der arteriellen Thrombose ist die Antikoagulation durch Gabe von unfraktioniertem Heparin (Neumann 2002).

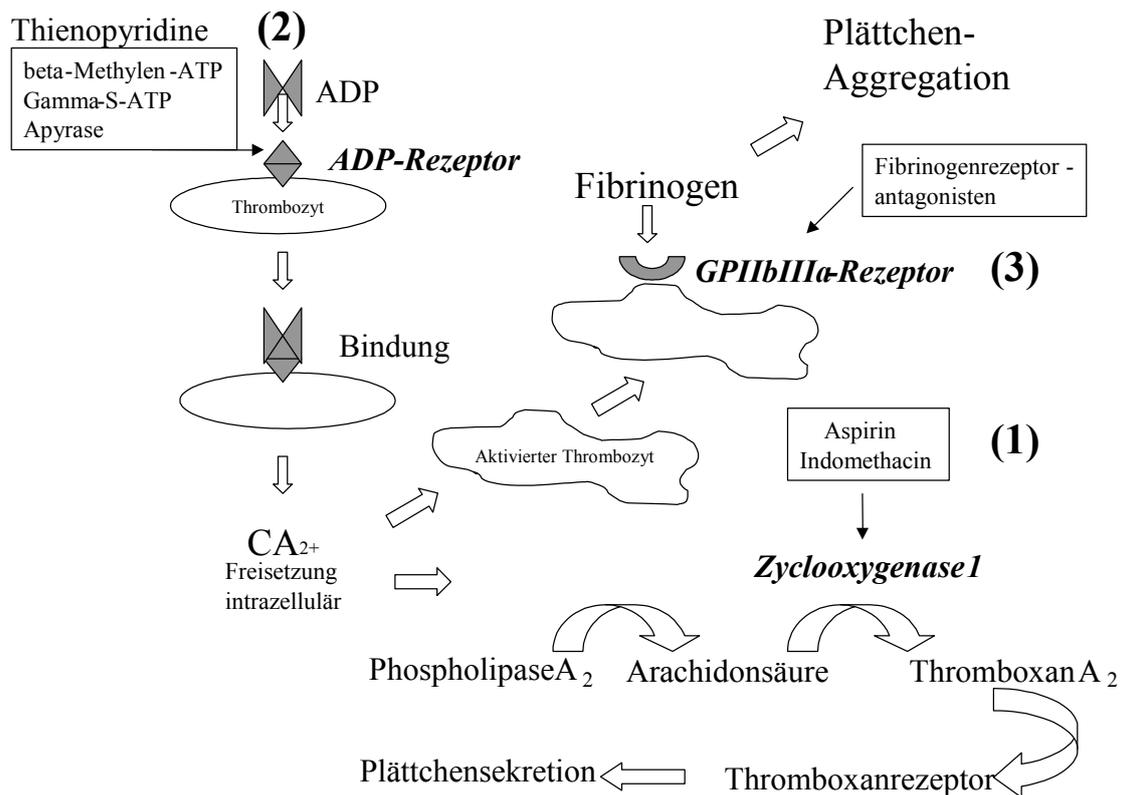


Abb. 8: Wirkorte von Antithrombozytären Substanzen

(1) ASS hemmt die Bildung von Thromboxan ($TX A_2$) und dessen Wirkung auf den Thromboxanrezeptor (TP-R). (2) Thienopyridine blockieren den $P2Y_{12}$ -ADP-Rezeptor und hemmen darüber ADP-induzierte Aktivierungsmechanismen. Beide Substanzklassen wirken damit intrathrombozytär inhibitorisch auf die Signaltransduktion. (3) Dagegen ist der Wirkort von GPIIb-IIIa-Blockern extrathrombozytär (nach Schrör 2002).

Zwar ist der Synergismus dieser drei unterschiedlich am Plättchen angreifenden Medikamente bisher hinsichtlich des klinischen Outcomes untersucht worden, jedoch fehlt bislang eine detaillierte Untersuchung der Effekte dieser kombinierten Therapie auf die Plättchenfunktion.

1.6.1 Cyclooxygenasehemmer

1.6.1.1 Acetylsalicylsäure

Acetylsalicylsäure (ASS) wirkt antithrombotisch, indem es das Cyclooxygenase – 1 Enzymsystem irreversibel durch Acetylierung der 530-Serineinheit blockiert (Roth 1975). Dieses Enzymsystem findet sich charakteristisch in Thrombozyten und Endothelzellen und ist verantwortlich für die Umwandlung der Arachidonsäure in Endoperoxide, die Vorläufer der Prostacyclin- und Thromboxansynthese. In Endothelzellen ist das Hauptprodukt dieses Syntheseweges das Prostacyclin – ein potenter Vasodilatator und Inhibitor der Thrombozytenaggregation. In Thrombozyten dagegen führt dieser Prozeß zum Thromboxan A2 (TXA2), einem Vasokonstriktor und Auslöser der Plättchenaggregation. Eine Hemmung des Thromboxan führt zur Hemmung der Thrombozytenfunktion. Da Thrombozyten kernlos sind, ist diese Hemmung irreversibel und das Enzym bleibt während der gesamten Lebensspanne (8 bis 10 Tage) des Plättchen inaktiviert.

ASS wird nach oraler Gabe rasch und vollständig absorbiert; die Absorptionszeit beträgt 5-16 Minuten. Nach oraler Gabe gelangt der größte Teil der ASS (>80 %) unverändert in den Dünndarm und nach Passage durch die Darmwand über das Pfortaderblut in die Leber. Nach Einnahme von 100 bzw. 300 mg ASS stellen sich maximale ASS-Plasmaspiegel nach ca. 30 Minuten ein. Die Halbwertszeit von ASS wurde im Blut mit 15-20 Minuten bestimmt, die Bindung an die Thrombozyten ist jedoch irreversibel, so dass die Wirkung ca. sieben Tage anhält (Küttler 1996). Mit steigender Tagesdosis nimmt die Komplikationsrate in Form von gastrointestinalen Nebenwirkungen deutlich zu. Aus diesem Grunde empfiehlt die American Heart Association den Einsatz von Tagesdosen im Bereich von 75-325 mg (Mozt 1994, Hennekens 1997). Das Risiko, eine schwerwiegende intrazerebrale Blutung unter ASS-Dauertherapie zu erleiden, liegt bei etwa < 0,5 % (Schrör 1997).

1.6.1.2 Indomethacin

Wie Acetylsalicylsäure so hemmt auch Indomethacin die Cyclooxygenase. Es besteht eine Präferenz für die Cyclooxygenase-1, jedoch wird auch nicht selektiv die Cox-2 inhibiert. Die pharmakologische Halbwertszeit beträgt 3 bis 11 Stunden. Hauptsächlich erfolgt die Metabolisierung über die Leber. 10-20% werden unverändert renal ausgeschieden, der Rest

wird nach Metabolisierung per Urin und Gallenflüssigkeit (enterohepatischen Kreislauf) eliminiert.

Indomethacin ist ein potentes nicht steroidales Antiphlogistika welches vorallem Anwendung bei rheumatischen Erkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis, Morbus Bechterew, u.a.) und bei akuten Gichtanfällen findet.

An typischen Nebenwirkungen sind vorallem Kopfschmerzen und gastrointestinale Beschwerden zu nennen, die meist dosisabhängig auftreten.

1.6.2 Thienopyridine

Experimentelle und klinische Studien belegen die Bedeutung der ADP-induzierten Thrombozytenaktivierung für die arterielle Thrombose, besonders unter hohen Strömungsbedingungen und bei gestörter Endothelfunktion. Seit mehr als 15 Jahren ist bekannt, dass Thienopyridine, zu denen die Substanzen Ticlopidin und Clopidogrel zählen, durch ihren Einfluss auf die ADP-induzierte Thrombozytenaktivierung wirkungsvoll arterielle Thrombosen unterdrücken (Coukell 1997, Harker 1993, Herbert 1993).

Nach ihrer Umwandlung in der Leber zu einem aktiven Metaboliten inhibieren Thienopyridine die ADP-induzierte Thrombozytenaktivierung, indem sie selektiv und irreversibel die Antwort am P2Y₁₂-Rezeptor verhindern (Herbert 1993, Savi 1994, Schrör 2000). Über Beeinflussung dieses ADP-Rezeptors bewirken Thienopyridine eine Hemmung der ADP-induzierten Senkung des thrombozytären cAMP-Spiegels und somit der intrazellulären Calciumfreisetzung und ADP-induzierten Sekretion der Alpha-Granula (Harker 1993, Nurden 1995) und somit eine verminderte Anzahl funktionierender ADP-Rezeptoren (Mills 1992). Diese Tatsache bewirkt weiterhin eine reduzierte Aktivierbarkeit der Endstrecke der Thrombozytenaktivierung mittels des GPIIb-IIIa-Rezeptors, eine direkte Modifizierung des Fibrinogenrezeptors besteht aber nicht.(Gachet 1990)

Die Inhibierung dieser intrazellulären Signalkaskade bewirkt auch eine Blockierung der Plättchenadhäsion an das Subendothel. Desweiteren reduzieren beide Thienopyridin-Präparate (Ticlopidin und Clopidogrel) die Scherkraft-induzierte Plättchenaggregation und-sekretion (Jarvis 2000). Thienopyridine wirken synergistisch zu ASS. Entsprechend ist eine kombinierte Therapie mit ASS und Thienopyridinen effektiver in der Hemmung der Thrombozytenaktivierung und -aggregation als das jeweilige Pharmakon alleine (Herrman 1998). Die heute bevorzugt eingesetzte Substanz dieser Gruppe ist das Clopidogrel. Die Vorteile von Clopidogrel gegenüber Ticlopidin sind ein schneller Wirkungseintritt, sowie eine Reduktion

der Rate an Nebenwirkungen wie Blutungen, Diarrhoe und der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (Bennett 1999, Mishkel 1999, Bennett 2000, Michel 2000, Müller 2000, Gawaz 2001, Müller 2001, Pache 2002). Bei der sekundären Prävention ischämischer Ereignisse konnte die Wirksamkeit von Clopidogrel – im Vergleich zu dem bisherigen „Goldstandard“ ASS – bewiesen werden. . Das CAPRIE Steering Committee konnte sogar in der Prävention des kombinierten Risikos ischämischer Ereignisse (Myokardinfarkt, Schlaganfall, peripherer Gefäßverschluss) eine Überlegenheit gegenüber ASS demonstrieren (The CAPRIE Steering Committee 1996).

1.6.2.1 Eingesetzte funktionelle ADP-Rezeptorblockierungen

Apyrase

Apyrase ist ein Enzym mit Adenosin 5 Triphosphatase und Adenosin 5 Diphosphatase Aktivität. Gewonnen wird dieses Enzym aus *Solanum tuberosum*. Es gibt zwei Isoenzyme, die sich vor allem in ihrer ATPase/ADPase – Aktivität unterscheiden und ein Molekulargewicht von 49 kDa (in der Gel Filtration) besitzen. Das eingesetzte Isoenzym besitzt eine ATPase/ADPase Ratio von ca. 10. Der zu erzielende Effekt dieser Substanz innerhalb der Testreihen ist es das Substrat des ADP-Rezeptors bis hin zu seinem Monophosphat abzubauen und somit zu inaktivieren.

Adenosin 5' γ -thio Triphosphat Tetralithium Salz (ATP- γ -S)

ATP- γ -S ist ein ATP Analoga, es ist für ATPasen nicht hydrolysierbar. Die Hydrolyse-Rate beträgt 1/200 von natürlichem ATP. Es kann durch mitochondriale Translokasen transportiert werden und hemmt dann den ATP gekoppelten reversen Elektronen Transport. Das Molekulargewicht beträgt 547 kDa. Dieses ATP Analogon dient zur irreversiblen Blockierung des ADP-Rezeptors durch ATP, welches für die ATPasen nicht zu spalten ist und somit eine negative Rückkopplung zur Folge hat. ATP ist ein kompetitiver Antagonist von ADP am ADP-Rezeptor und wirkt dadurch antiaggregatorisch.

β - γ - Methyleneadenosine 5' Triphosphat Disodium Salz (ATP-PCP)

ATP-PCP ist ein selektiver P_{2X}-Purinorezeptor Agonist, der über diese Bindung die Plättchenaggregation blockiert (Soslau 1993). Dieses geschieht durch den fehlenden ADP getriggerten Calcium Einstrom in das Blutplättchen und somit kann es nicht zur Formänderung kommen. Das Molekulargewicht beträgt 549,2 kDa.

1.6.3 GPIIb-IIIa-Antagonisten

Durch die Blockierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors steht uns die potenteste Thrombozytenaggregationshemmung zur Verfügung. Die Blockade der Fibrinogenbindungsstelle durch GPIIb-IIIa-Antagonisten führt, unabhängig von der Art der Aktivierung, zur effektiven Hemmung der Fibrinogenbindung am GPIIb-IIIa-Rezeptor und dadurch zur Aggregationshemmung. Nach Koronarintervention senken diese Antagonisten zusätzlich zur Standardtherapie mit ASS und Heparin i.v. das Risiko ischämischer Komplikationen, vorallem bei Hochrisiko-Patienten hat sich dieses Therapie-Regime bewährt. Ebenfalls in der Therapie von Koronar-Syndromen und non-Q- wave Myokardinfarkten zeigte sich in Bezug auf Verminderung der Sterblichkeit und Re-Infarkt eine signifikante Verbesserung der statistischen Ergebnisse durch die additive Antagonisten-Therapie. Während das Wirkprinzip aller derzeit verfügbaren GPIIb-IIIa-Antagonisten identisch ist, unterscheiden sich die strukturellen, pharmakologischen Eigenschaften und die Spezifität der einzelnen Antagonisten erheblich (Coller 1995, Mousa 1996, Madan 1998). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende klinisch relevanten GPIIb-IIIa-Antagonisten untersucht (Tabelle 1).

Tab 1: Untersuchte GPIIb-IIIa-Antagonisten

Substanz	chemische Gruppe	Applikationsform
Abciximab	chimärer Mab-Fab	i.v.
Integrelin	zyklisches KGD-Peptid	i.v.
Lamifiban	RGD-Peptidomimetikum	i.v.
Tirofiban	RGD-Peptidomimetikum	i.v.
YM 337	Humanisierter Mab-Fab	i.v.
EMD 122347	Peptidomimetisches prodrug	oral

- c7E3 (ReoPro, Abciximab) von Beiersdorf-Lilly (Hamburg, Deutschland)
- Integrelin (Intigrilin, Eptifibatide) von Cor Therapeutics (San Francisco, USA)
- Lamifiban von Hoffman LaRouche (Basel, Schweiz)
- Tirofiban (MK 383, Aggrastat) von Merck&Co (West Point, USA).
- EMD 122347 von Merck (Darmstadt, Deutschland)
- YM 337 von Yamanouchi (Leiderdorp, Niederlande)

Abciximab ist ein chimäres Derivat des monoklonalen Antikörpers 7E3, welcher gegen den GPIIb-IIIa-Komplex gerichtet ist. Das Fc-Fragment wurde vom kompletten Antikörper abgespalten, so dass Abciximab nur den Fab-Anteil aufweist. Zusätzlich wurde der größte Teil des unspezifischen murinen Fab-Anteils durch einen menschlichen Fab-Anteil ersetzt. Studienergebnisse belegen eine bessere Langzeitwirkung von Abciximab für die Reduktion des kombinierten Risikos ischämischer Ereignisse (The TARGET Investigators 2001, SoRelle 2002) und gerade bei Patienten der Hochrisikogruppe hat Abciximab den größten Effekt gezeigt (The EPISTENT Investigators 1998).

Integrelin ist ein über Disulfidbrücken verbundenes zyklisches Peptid mit einem Molekulargewicht von 832 kD mit sieben Aminosäuren (Heptapeptid). Integrelin bindet im Bereich der KGD-Bindungsregion des GPIIb-IIIa-Rezeptors. In der PURSUIT-Studie zeigte sich eine signifikante Abnahme der primären Endpunkte (Tod; akuter Myokardinfarkt) gegenüber der Placebotestgruppe, dieser Effekt war auch noch nach 6 Monaten nachweisbar.

Lamifiban und Tirofiban (MK383) sind nicht peptische Moleküle. Im Gegensatz zu Integrelin, welches durch seine RGD-ähnliche Molekülstruktur mit der Fibrinogenbindungsstelle konkuriert, imitieren die nicht-peptischen Antagonisten die geometrischen, stereotaktischen und Oberflächenladungseigenschaften der RGD-Sequenz und hemmen dadurch die Fibrinogenbindung (Coller 1995, Mousa 1996). Beide haben eine kurze Halbwertszeit und Wirkdauer.

EMD 122347 ist ein Prodrug eines oralen GPIIbIIIa Antagonisten. Auch EMD ist ein peptidomimetisches Prodrug an der RGD-Bindungsregion und zeigte eine gute intestinale Aufnahmefähigkeit mit einer Halbwertszeit von ca. 70 Stunden. (Kamm 1999).

YM337 ist ein Fab-Fragment eines humanisierten monoklonalen Antikörpers gegen den GPIIbIIIa-Rezeptor, der eine ähnliche pharmako-kinetische Aktivität wie Abciximab aufweist. Auch mögliche unerwünschte Reaktionen, wie z.B. Bildung von Antikörpern, Thrombozytopenie scheinen in der gleichen Häufigkeit vorzukommen wie bei einer Therapie mit Abciximab. Aktuell sind die Wirkung, Nebenwirkungen, etc. aber noch nicht in klinischen Großstudien untersucht. (Harder 1999)

Die Strukturformeln von einigen GPIIbIIIa Antagonisten, wie z.B. Integrelin, Lamifiban und Tirofiban, sowie die Struktur von Abciximab sind in Abbildung 9 dargestellt.

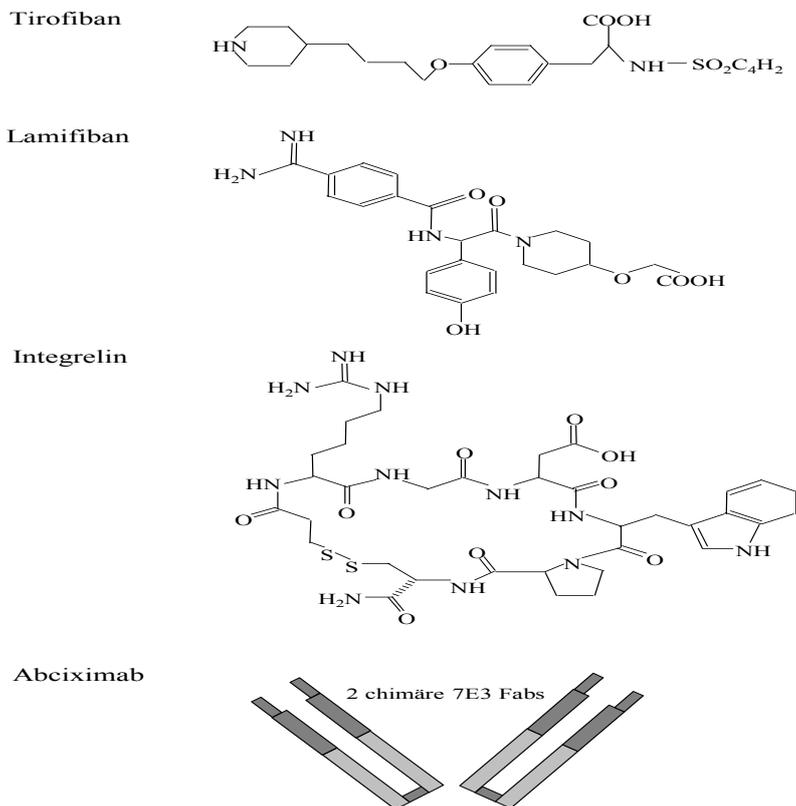


Abb. 9: Struktur von Fibrinogenrezeptorantagonisten

1.7 Therapie des akuten Koronarsyndroms

ASS hat seine antithrombotische Wirksamkeit bei der Prophylaxe und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen in einer Vielzahl klinischer Studien unter Einschluss von insgesamt mehr als 30 000 Patienten unter Beweis gestellt („British Doctor’s Trial“: Peto 1988, „Montreal Heart Study“: Theroux 1988, Steering Committee of the Physician’s Health Study 1989, The RISC-Group 1990, Antiplatelet Trialists Collaboration 1994). Die Ergebnisse zeigen, dass die frühzeitige Gabe von ASS die Letalität und Reinfarkthäufigkeit bei akutem Koronarsyndrom signifikant vermindert.

Zur Revaskularisation stenosierter und okkludierter Gefäße hat sich zunehmend die der Lyse-Therapie überlegene koronare Intervention (PTCA und Stent-Implantation) durchgesetzt („STOP-AMI Studie“: Schömig 2000). Die durch den Eingriff bedingte erhöhte Plättchenaktivierung und intravaskuläre Plättchenaggregation limitieren jedoch den Erfolg von koronaren Interventionen, indem sie kurzzeitige ischämische Episoden initiieren und zur Gefäßrestenose beitragen (Lincoff 1992). Dieser Effekt machte die weitere Inhibition der Plättchenaggregation notwendig, da die bisherige ASS-Therapie – auch in Kombination mit Heparin - die Inzidenz der sich häufig entwickelnden Restenosen nur inadäquat senken konnte (Lincoff 1992, Le Breton 1996, White 1998).

Studien belegen, dass der synergistische Einsatz von ASS und Ticlopidin der ASS-Monotherapie und Antikoagulation in der Reduktion der postinterventionellen ischämischen Komplikationen nach Implantation koronarer Gefäßstützen deutlich überlegen ist („ISAR-Studie“: Schömig 1996, „FANTASTIC Studie“: Bertrand 1998, „STARS-Studie“: Leon 1998, „MATTIS-Studie“: Urban 1998).

Auch haben die Ergebnisse der internationalen Studie zu „Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events“ (CURE) die Überlegenheit einer Kombinationstherapie von Clopidogrel und ASS im Vergleich zu einer ASS-Monotherapie hoch signifikant bewiesen. So kommt es bei Patienten, die mit dem neuen Thienopyridin-Derivat Clopidogrel therapiert werden, signifikant seltener (9,3 %) zum Tod durch kardiovaskuläre Ursachen, nicht tödlichem Myokardinfarkt oder Schlaganfall kam als bei Patienten der Placebogruppe (11,4 %; The CURE Committee 2000).

In Anwesenheit hoher Konzentrationen starker Agonisten der Thrombozytenaktivierung können Thienopyridine – auch in Kombination mit ASS – die Thrombozytenaggregation nicht ausreichend verhindern (Neumann 2002). Die Behandlung akuter Koronarsyndrome konnte jedoch durch die Entwicklung potenter Aggregationshemmer in Form der GPIIb-IIIa-Antagonisten verbessert werden.

In klinischen Studien der Phase III konnte für die GPIIb-IIIa-Antagonisten Abciximab und Tirofiban gezeigt werden, dass die Substanzen gut verträglich sind und bei Patienten mit instabiler Angina pectoris oder Myokardinfarkt zu einer erheblichen Verbesserung der Überlebensrate nach koronarer Intervention führen.

Aus den Studien mit Tirofiban ergibt sich, dass durch zusätzliche Gabe des GPIIb-IIIa-Antagonisten zur Standardtherapie - bestehend aus ASS und Heparin - unabhängig von der

weiteren Therapie das Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko von Patienten mit akutem Koronarsyndrom günstig beeinflusst werden kann (The RESTORE Investigators 1997, The PRISM-PLUS Investigators 1998). In der EPILOG, CAPTURE und RAPPORT-Studie wurde die Wirksamkeit von Abciximab bei Patienten mit instabiler Angina pectoris oder Myokardinfarkt untersucht. Auch hier zeigte sich eine signifikante Verbesserung gegenüber der bisherigen medikamentösen Standardtherapie (The EPILOG Investigators 1994, The CAPTURE Investigators 1997, The RAPPORT Investigators 1998).

Die EPISTENT-Studie hatte die bisherige adjuvante Therapie bestehend aus ASS noch um Ticlopidin erweitert. Hier wurde erstmals der synergistische Effekt aller drei untersuchten Substanzklassen mit der ASS plus Heparin Therapie verglichen. Fazit der Studie war, dass in der Abciximab-Gruppe die Ereignisse bezüglich des primären Endpunktes (Tod, Myokardinfarkt und dringliche Revaskularisation) um 43 % gegenüber der Heparin-Gruppe gesenkt werden konnten ($p < 0,005$; The EPISTENT Investigators 1998).

Hinsichtlich des direkten klinischen Vergleichs von GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten – mit adjuvanter Therapie bestehend aus ASS und Clopidogrel - gibt es bislang nur eine multizentrische klinische Studie. Die TARGET-Studie untersuchte den Einfluss von Abciximab und Tirofiban auf die Verminderung des Auftretens von Tod, Myokardinfarkt und dringlicher Revaskularisation bei Patienten mit stabiler Angina pectoris und Patienten mit akutem Koronarsyndrom nach 30 Tagen und sechs Monaten. In der Gruppe mit akutem Koronarsyndrom erlitten die mit Abciximab therapierten Patienten nach 30 Tagen und sechs Monaten signifikant weniger Myokardinfarkte und mussten sich auch signifikant seltener einer Re-Intervention unterziehen. Die Todesrate war jedoch in beiden Behandlungsarmen gleich (The TARGET Investigators 2001).

Der Einsatz von intravenösen GPIIb-IIIa-Rezeptorblockern, kombiniert mit einer oralen antithrombozytären Therapie bestehend aus ASS und Clopidogrel, hat zwar die klinische Prognose von Patienten nach koronarer Stentimplantation signifikant verbessert (Neumann 1998, Lincoff 2000, Bertrand 2000). Doch obgleich sich der Einsatz dieser antithrombozytären Kombination zu einer Standardtherapie bei der intrakoronaren Intervention entwickelt hat, sind die synergistischen Effekte auf die Thrombozytenfunktion und die plättcheninduzierte Aktivierung des Endothels noch nicht im Detail untersucht worden.

Auch ist bis heute unklar, ob die pharmakologischen Unterschiede zwischen den beiden GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten Abciximab und Tirofiban, etc. von Relevanz für den klini-

schen Gebrauch sind, denn seit Zulassung der ADP-Rezeptor Antagonisten Prasugrel und Ticagrelor stehen potente Alternativmedikamente für die Akuttherapie des Herzinfarkt zur Verfügung. Ticagrelor liegt als aktive Form mit reversibler Hemmung des ADP-Rezeptor vor und ist gut steuerbar. In der PLATO-Studie zeigte sich im Vergleich zur dualen Hemmung mit ASS und Clopidogrel eine signifikante Reduktion der Endpunkte (kardiovaskulärer Tod, Myokardinfarkt, ischämischer Schlaganfall) nach 12 Monaten bei den mit Ticagrelor therapierten Patienten.

Prasugrel, ein Thienopyridin der 3. Generation, ist ein irreversibler Inhibitor des ADP-Rezeptor mit hoher Bioverfügbarkeit. In der TRITON-TIMI-38-Studie zeigte diese Medikation eine signifikant stärkere Hemmung der Blutplättchen als Clopidogrel 300mg mit dem Resultat einer deutlichen Abnahme der klinischen Endpunkte (kardiovaskulärer Tod, Myokardinfarkt und ischämischer Schlaganfall) und wurde somit fester Bestandteil der ESC-Leitlinien bei interventionellen Behandlungen des akuten Koronarsyndrom.

Ticagrelor und Prasugrel führten aber auch zu einem signifikant erhöhtem Blutungsrisiko, wodurch Therapieeinschränkungen bestehen.

Aktuell sind daher die Fibrinogenrezeptor-Antagonisten vor allem den bail-out Situationen in den Koronar-Interventionen vorbehalten und nicht mehr erste Wahl in der Vorbereitung des Patienten vor einer PTCA bzw. Stentimplantation.

1.8 Aggregations-Reagenzien

1.8.1 Thrombin

Thrombin ist das zentrale Enzym des plasmatischen Gerinnungssystems. Die Arginin-spezifische Serinprotease zirkuliert im Plasma als Zymogen (Prothrombin, Faktor II) und wird durch den Prothrombinase-Komplex (FaktorXa, Faktor Va, Phospholipide und Calcium-Ionen) aktiviert. Die gerinnungsfördernde Wirkung des Thrombins beruht auf der Spaltung des Fibrinogens in seine Fibrinmonomere, die in der Folge unter Mitwirkung des durch Thrombin aktivierten FaktorXIII zum unlöslichen Fibringerinnsel polymerisieren. Annähernd gleichzeitig entfaltet Thrombin auch seine gerinnungshemmende Funktion. Im Komplex mit Thrombomodulin aktiviert Thrombin das Protein C, welches die gerinnungsfördernden Faktoren Va und VIIIa durch Spaltung inaktiviert.

Das menschliche α - Thrombin (Molekulargewicht:33 kDa) besteht aus einer A-und B-Kette, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Unter Aminosäurenabspaltung entsteht die Anionenbindungsregion, welche zur Bindestelle für Fibrinogen und dem klonierten Thrombinrezeptor wird.

Blutplättchen haben im Wesentlichen zwei Bindungsstellen für Thrombin:

- Eine hoch-affine im Bereich des Glykoproteins Ib
- Eine mäßig-affine mit G-Protein gekoppelten Rezeptor mit 7 transmembranösen Domänen

Thrombin interagiert hauptsächlich mit letzterem Rezeptor über zwei Bindungsstellen. Weiterhin moduliert Thrombin die Chemotaxis von Monozyten und die mitogenen Eigenschaften von Lymphozyten und mesenchymalen Zellen, wie glatte Muskelzellen und Fibroblasten.

1.8.2 Tissue Factor

Der Tissue Factor (Gewebethromboplastin ; CD 142) ist überwiegend Teil des extrinsischen System der Gerinnung und im Gewebe hauptsächlich in der Gefäßwand und in den Organkapseln lokalisiert ist (Drake 1989), um im Falle einer Gefäßverletzung das verletzte Organ und somit den Körper vor Blutverlusten zu schützen. Der TF ist ein Polypeptid, das aus 295 Aminosäuren synthetisiert wird und aufgrund seiner Tertiärstruktur der Familie der Cytokinrezeptoren zugeordnet wird (Bazan 1990).Eine strenge Einordnung des Tissue Factor in das intrinsische (Kontaktaktivierungssystem) und extrinsische Blutgerinnungssystem nach der Wasserfall-Theorie (Davie /Ratnoff 1964, Mac Farlane 1964) ist jedoch nach heutiger Erkenntnis nicht möglich, da z.B. der Gerinnungsfaktor IX des intrinsischen Systems durch den Tissue Factor/Faktor VIIa Komplex aktiviert wird (Osterud/Rappaport 1977). In seiner Funktion ist der Tissue Factor gleichzeitig ein Rezeptor und ein Kofaktor (Bach 1988, Rapaport 1991) für den Faktor VII oder dessen bereits aktivierte Form im Blut (Faktor VIIa). Dieser Komplex von TF und Faktor VIIa starten die Gerinnung durch Aktivierung der Zymogene Faktor IX und X, dadurch entstehen geringe Mengen an Thrombin, welches wiederum die Blutplättchen aktiviert.

Der Faktor Xa bildet mit dem Kofaktor Va und Prothrombin den sogenannten Prothrombinase-Komplex (Nemerson/Bach 1982, Kalafatis 1994), der zu einer 25-fachen Verstärkung der Thrombinbildung und schließlich zur Bildung eines stabilen Fibringerinnsels führt. (siehe Abbildung 10)

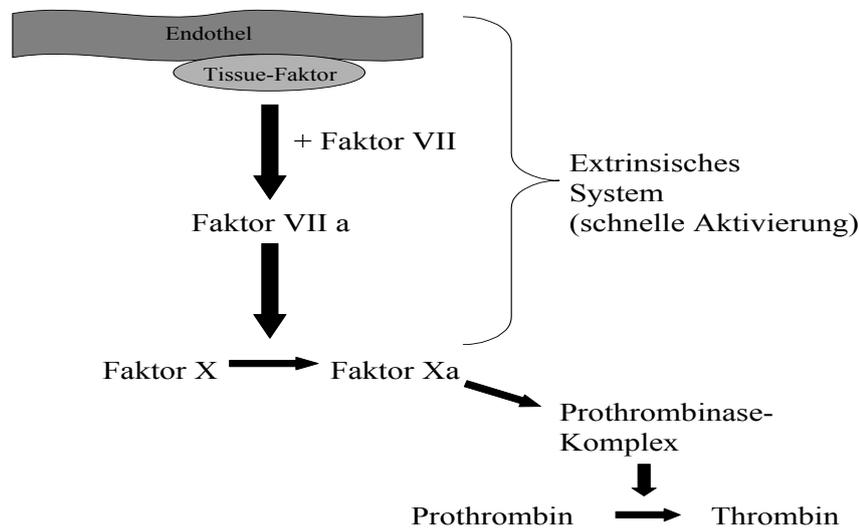


Abb.10: Gerinnungsaktivierung durch den Tissue Factor

Der Tissue Factor spielt auch bei weiteren pathologischen Prozessen eine entscheidene Rolle, z.B. in der disseminierten intravaskulären Gerinnung (DIC) bei Sepsis (Rivers 1992), sowie bei postoperativen Thrombosen und in der Atherosklerose (Landers 1994, Libby 2000).

Weiterhin ist auch eine Mitbeteiligung an der embryonalen Angiogenese (Carmeliet 1996) und auch bei der Tumorangio-genese (Shoji 1997) zu nennen.

1.9 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, in einer experimentellen Studie den Einfluss unterschiedlicher antithrombozytärer Substanzen (Cyclooxygenase- und ADP-Rezeptorinhibitoren und GPIIb-IIIa-Rezeptorblocker) auf die Plättchenfunktion zu untersuchen. Dabei soll im zeitlichen Verlauf die plättchen-eigene Autoaktivierung mittels der Thrombinbildung gemessen werden. Hierzu werden die folgenden Thrombozytenfunktionen überprüft:

- a) Plättchenaggregation
- b) Thrombozytäre Thrombingeneration

2 Methodik

2.1 Probengewinnung:

Für die aggregometrische Untersuchung wurde mit 2,8% Zitrat antikoaguliertes Blut verwendet. Dazu nahm man gesunden Probanden Blut in eine mit Zitrat gefüllte 10 ml Spritze ab. Die Abnahme erfolgte aus einer mäßig gestauten Oberarmvene durch Punktion mit einer 19 Gauche-Kanüle. Wie in früheren Studien belegt wurde, führt diese Abnahmetechnik zu keiner messbaren in vitro Aktivierung der Thrombozyten (Frelinger 1991). Danach wurden die Proben sofort, wie im Folgenden beschrieben, weiterverarbeitet.

2.1.1 Probenweiterverarbeitung:

Die Proben wurden mit den Antagonisten inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. Zusätzlich wurde ein Ausgangswert ohne Zusatz eines Antagonisten durchgeführt.

Tab 2: Endkonzentrationen der Antagonisten

Antagonist	Endkonzentration
C7E3	50 µg/ml
Integrelin	2000 ng/ml
EMD122347	3600 ng/ml
Lamifiban	500 ng/ml
Tirofiban	125 ng/ml
YM337	60 µg/ml
Indomethacin	100 µM
Apyrase	2 U/ml
Gamma-S-ATP	1 mM
PCP-ATP	10 mM

Für die Inkubation wurde je 445 µl PRP, 5 µl GPIIb-IIIa-Antagonist in verschiedenen Konzentrationen und 50 µl Chrono-Lume (Luciferase Luciferin Reagent) verwendet. Danach wurden 500 µl vorinkubiertes und mit Chrono-Lume versetztes PRP in eine silikonisierte Glasküvette (Test Tubes 7,25x55mm, Fa. Bio/Data, Horsham, USA) gegeben. Als Referenzwert diente eine zweite Glasküvette, die mit 500 µl PPP gefüllt wurde.

2.1.1.1 Die Messung der Aggregation:

Die Bestimmung der Aggregation erfolgte gemäß der turbidimetrischen Methode nach Born (Born 1962, Born 1963). Hierbei wird eine mit PRP gefüllte silikonisierte Glasküvette (Fa. BioData, Horsham, USA) unter Verwendung eines Rührstäbchens (konstant 1000 Umdrehungen pro Minute) mittels Magnetrührer kontinuierlich durchmischt und bei 37° C inkubiert. Durch ein photometrisches Verfahren wird die plättchenbedingte Trübung der Suspension anhand einer Referenzküvette, die 500 µl PPP enthält, bestimmt. Durch Zugabe von 5 µl eines Plättchenstimulus (Endkonzentration: ADP 5 µM, ADP 20 µM oder TRAP 25 µM) in die mit 470 µl PRP sowie 25 µl Chrono-Lume-Reagenz gefüllte Küvette kommt es zur Plättchenaktivierung und konsekutiv zur Aggregatbildung. Diese ist abhängig von Calcium, welches im Citratblut und Plasma in ausreichender Konzentration vorliegt.

Da die Einzelplättchen eine höhere Lichtstreuung als die von ihnen gebildeten Agglomerate erzeugen, führt die Aggregation zu einer Zunahme der Licht-Transmission. Deren Änderung über die Zeit (bis ca. fünf Minuten nach Stimuluszugabe) wird als Aggregationskurve aufgezeichnet.

Parallel zur Messung der Aggregation war am verwendeten Zwei-Kanal-Chronolog-Aggregometer (Fa. Nobis, Endingen, Deutschland) auch eine Bestimmung des freigesetzten ATP aus den dichten Granula der Thrombozyten möglich. Dazu wurde dem PRP (470 µl) eine Menge von 25 µl Chrono-Lume-Reagenz (Luziferin-Luziferase-Extrakt; Fa. Nobis, Endingen, Deutschland) hinzugesetzt, das in Gegenwart von ATP luminesziert. Die bei der ATP-Freisetzung entstehende Lumineszenz wurde von einem Photomultiplier erfasst und mittels Schreiber aufgezeichnet. Zur quantitativen Bestimmung des ATPs wurde zum Anfang jeder Einzelmessung statt der 5 µl Aggregationsstimulus (ADP 5 µM, 20 µM oder TRAP 25 µM) 5 µl ATP-Standard (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) hinzugegeben, welches einer Stoffmenge von 2 nmol entspricht (Feinmann 1977).

Die Plättchenaggregation sowie die ATP-Freisetzung wurden bei 37°C gemessen. Die Meßsensitivität für die Aggregation war konstant auf 0,1 Volt eingestellt und ebenso wie die Messsensitivität für die ATP-Freisetzung ebenfalls auf 0,1 Volt. Der Papiervorschub war auf 2 cm pro Minute festgelegt.

2.1.1.2 Abgeleitete Werte aus der Aggregationsmessung

Wie in Abbildung 11 dargestellt, konnten auf diese Weise sowohl die größte Amplitude (maximale Aggregation) und die größte Steigung („Slope“) der Aggregationskurve, als auch die ATP-Freisetzung (im Vergleich zum ATP-Standard) bestimmt werden.

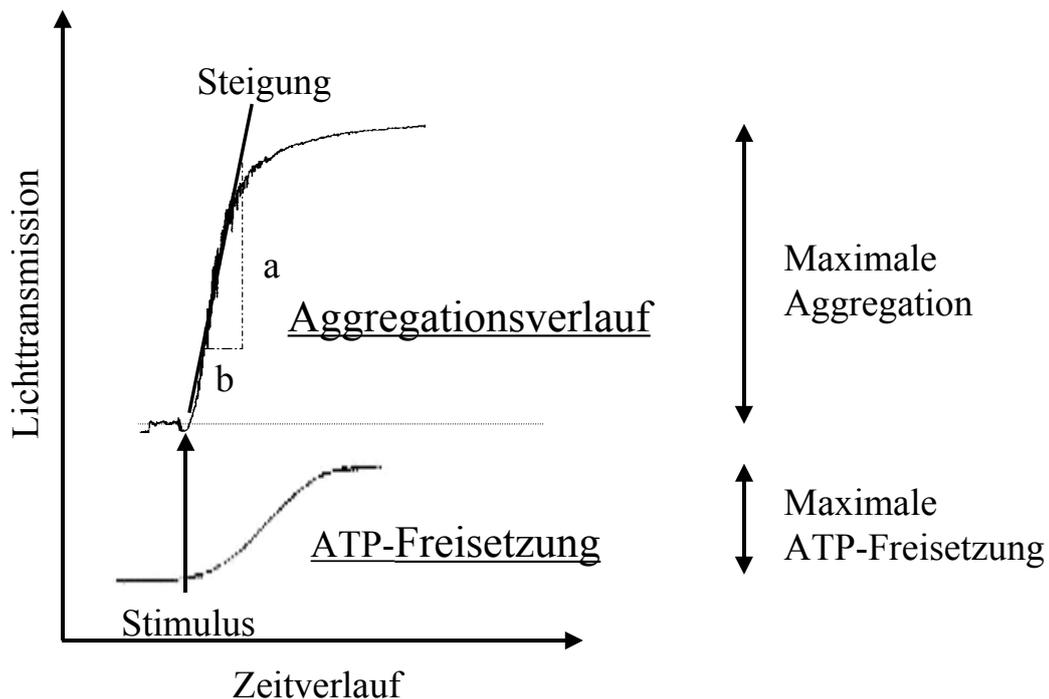


Abb. 11 : Auswertung der Lichtaggregometrie und Luminometrie

Anhand der Aggregationsverlaufskurve wurde sowohl die maximale mögliche Aggregation (in Relation zu der Eichungszacke als stärksten Zeigerausschlag), als auch die Steigung der Kurve durch Berechnung des Quotienten aus a/b bestimmt. Diese Steigung zeigt an, mit welcher Geschwindigkeit die Aggregation abläuft. Zur Bestimmung der Freisetzung von ATP aus den dichten Granula wurde ebenfalls der maximale Ausschlag gemessen und ins Verhältnis zu dem ATP-Standard mit einer konstanten Menge von 2 nM gesetzt.

2.1.1.3 Methodikbeschränkung

Die Untersuchung von Thrombozytenfunktionen wird immer von dem potentiellen Risiko einer artifiziellen Thrombozytenaktivierung in vitro, bei der Gewinnung oder Verarbeitung der Proben, beeinträchtigt. Um fehlerhafte Ergebnisse zu vermeiden, wurden deshalb sämtliche methodischen Variablen innerhalb der untersuchten Patienten konstant gehalten und außerdem alle Proben innerhalb kürzest möglicher Zeit verarbeitet

2.1.2 Bestimmung der plättchenabhängigen Thrombingeneration

2.1.2.1 Probengewinnung:

Die Probengewinnung erfolgte wie in 2.1. beschrieben.

2.1.2.2 Probenweiterverarbeitung

Das aus dem CPDA-Blut gewonnene und auf 300 000 Plättchen/ μ l verdünnte PRP wird zu je 300 μ l in ein mit einer Stahlkugel bestücktes Küvetten (beides Fa. Strathmann, Berg, Deutschland) im Kugel-Koagulometer KC 4A (Fa. Amelung, Lemgo, Deutschland) pipettiert. Für die Negativ-Kontrolle wurde zusätzlich 200 μ l Tyrodes Puffer (pH 7,4) hinzugegeben, für die Positiv-Kontrollen 140 μ l Tyrodes Puffer (pH 7,4) und bei Hinzugabe eines Antagonisten (50 μ l) wurde das Volumen vom Tyrodes Puffer (pH 7,4) um 50 μ l reduziert, sowie 60 μ l Thrombin (0,120 U/ml Endkonzentration) (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) oder Tissue-Faktor (Fa. American diagnostica, Pfungstadt, Deutschland). Die endgültige Konzentration von Tissue-Faktor betrug ein Zehntel der Menge, welche nötig ist, um PPP in ungefähr 80 Sekunden zu clotten (Reverter 1996). Im Anschluss wurden in Dreifach-Bestimmungen jeweils 10 μ l der Positiv- und Negativ-Kontrollen und des Ausgangswertes in die entsprechend markierten Wells der mit 90 μ l einer 3,8 prozentigen Natriumcitrat-Lösung (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) pro Well vorbereiteten 96-Well-Mikrotiterplatte (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) für den Ausgangswert pipettiert (siehe Pipettierschema). Nach Abnahme des Ausgangswertes wurden je 20 μ l CaCl_2 [1Mol] zur Initiierung des Clottens in die drei Teströhrchen pipettiert. Gleichzeitig mit dieser Startreaktion wurde das Koagulometer gestartet, d.h. das Kreisen der Stahlkugel und der Start der Stoppuhr zur Messung der Clottzeit. Zu 5 weiteren Zeitpunkten, (20, 30, 40, 50 und 60 Minu-

ten nach Starten der Clotreaktion) wurden wie beim Ausgangswert in Dreifach-Bestimmungen jeweils 10 µl der einzelnen Kontrollen in die jeweiligen Näpfe der 96-Napf-Platte pipettiert. Zur quantitativen Bestimmung und Qualitätssicherung wurde eine Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve angesetzt und zu je 10 µl (Dreifach-Bestimmung) in die entsprechenden Näpfe der 96-Well-Platte hinzugegeben (siehe Pipettierschema).

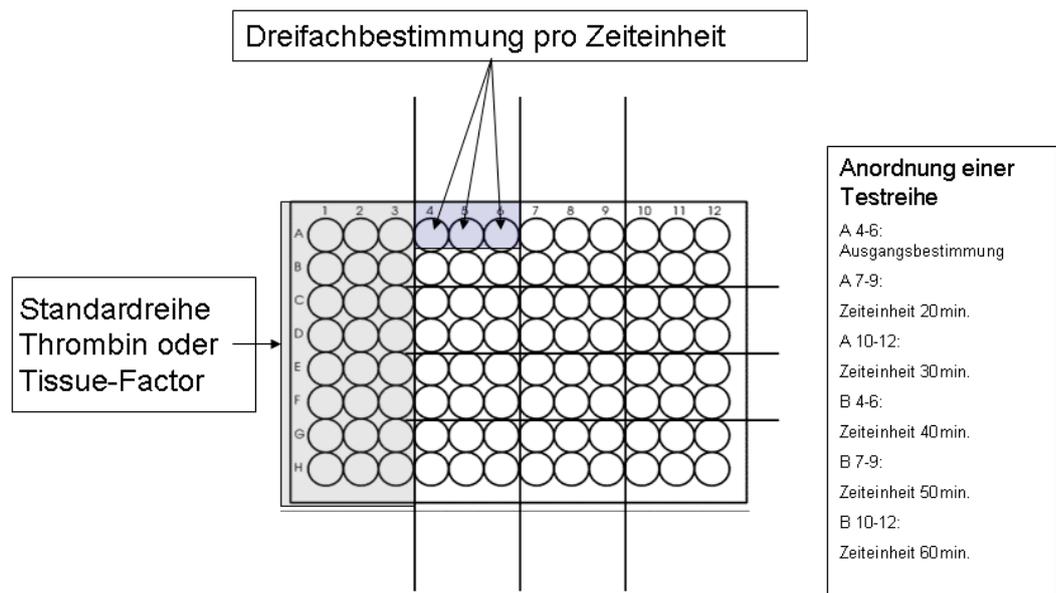


Abb. 12 : Pipettierschema

Nach der Pipettierung der Standardreihe wurde mit Hilfe einer Multichannel-Pipette 50µl von dem Thrombin Substrat S-2238 (Fa. Chromogenix, Mailand, Italien; Anfertigung siehe Anhang, Seite 89) in alle Wells gegeben und der nun folgende Farbumschlag in dem ELISA-Reader Dynatech MR 5000 (Fa. Dynatech, Denkendorf, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenz Wellenlänge von 630 nm kinetisch bestimmt (Dickfeld 2001; Geräte-Einstellung siehe Anhang, Seite 90) Hierbei wurde die Entstehung von Thrombin aus Prothrombin an dem vom aktivierten Thrombozyten bereitgestellten Prothrombinasekomplex gemessen.

Es wurde zu insgesamt 6 Zeitpunkten vor und nach der Gerinnungsreaktion die Bildung von Thrombin im PRP mittels eines Substrates detektiert, welches bei Vorhandensein von Thrombin in einen gelben Farbkomplex umgewandelt wird. Die Intensität dieses Komplexes wird absorptionsphotometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem ELISA-Reader gemessen. Die Geschwindigkeit der Substratbildung ist proportional zur enzymatischen Aktivität (Aronson 1992). Der Thrombingehalt in U/ml wird mittels einer Standardreihe berechnet. Die durch die Standardkurve mit Thrombin kalibrierte Auswertung [m.O.D.; O.D.: optische Dichte] wurde vom angeschlossenen Drucker ausgegeben. Alle Messungen wurden bei 37° C durchgeführt.

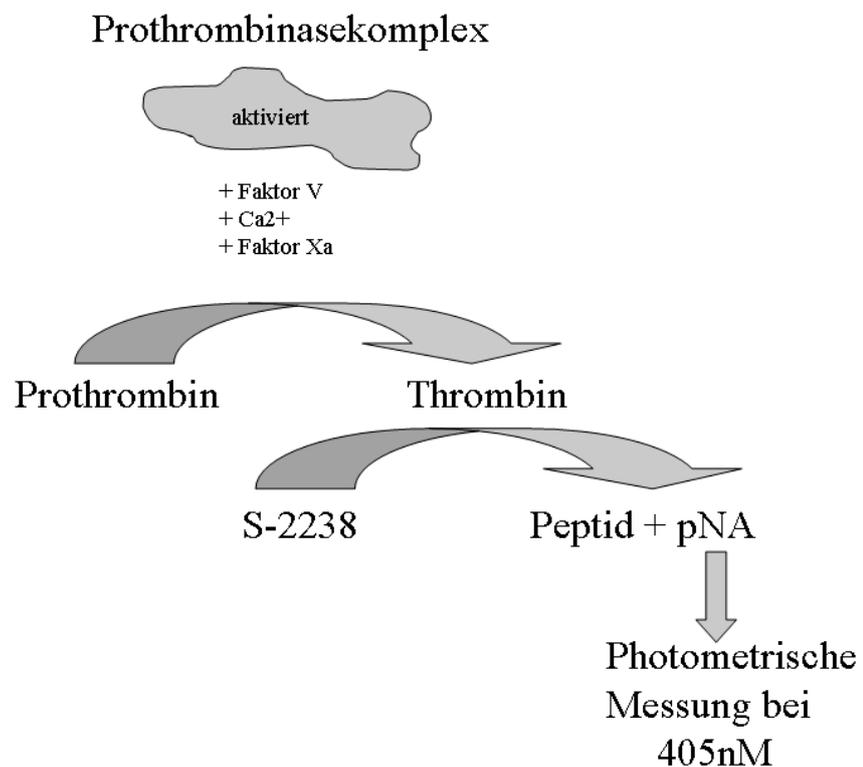


Abb. 13 : Prinzip der technischen Messung der Thrombingeneration

2.1.2.3 Methodikbeschränkung

Aufgrund einer möglichen mechanischen Voraktivierung der Thrombozyten in der Präparationsphase kann es zu vermehrten Thrombingeneration kommen, daher wurden alle Proben zur selben Zeit, und nach definierten Zeitpunkten und unter konstanten Temperaturen bearbeitet. Weiterhin wurden für alle Proben Dreifach-Bestimmungen zu jedem Zeitpunkt entnommen.

2.1.3 Statistische Auswertung

Die Datenanalyse wurde mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests für nicht normalverteilte Ergebnisse durchgeführt. Es wurden nicht parametrische Testverfahren angewandt:

- Friedman- und Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben
- Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben.

p-Werte von $< 0,05$ galten als signifikant, von $< 0,01$ als hochsignifikant.

Die statistische Auswertung erfolgte durch das Programm „SPSS 10.0 for Windows“.

3 Ergebnisse

3.1 Aggregation und Thrombingeneration

In der experimentellen Anordnung unserer Studie wollten wir den Einfluss antithrombozytärer Medikamente auf die plättchen-eigene Thrombingeneration messen. Daher führten wir zur Bestimmung der Endkonzentrationen der Antagonisten, die notwendig sind um eine maximale Aggregationshemmung herbeizuführen die aggregometrische Messung durch. Nach dieser Bestimmung begann die Messung der Plättchen bedingten Thrombinfreisetzung unter Fibrinogenrezeptor-Antagonisten, Cyclooxygenaseinhibition und ADP-Rezeptorblockade.

3.1.1 Plättchenaggregation

Im Rahmen der Untersuchung der Thrombozytenaggregation wurde die maximale Aggregation bestimmt.

3.1.1.1 Maximale Aggregation nach 5 Minuten

Die Aggregation wurde mittels Lichttransmissions-Aggregometrie nach Stimulation mit ADP 5 μM , ADP 20 μM beziehungsweise TRAP 25 μM bestimmt. Die Thrombozytenaggregation bei schwacher Stimulation (ADP 5 μM) oder mittlerer Stimulation (ADP 20 μM) konnte um mehr als 90 % inhibiert werden, bei starker Stimulation (TRAP 25 μM) um 80%.

Die verwandten Endkonzentrationen der Antagonisten sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

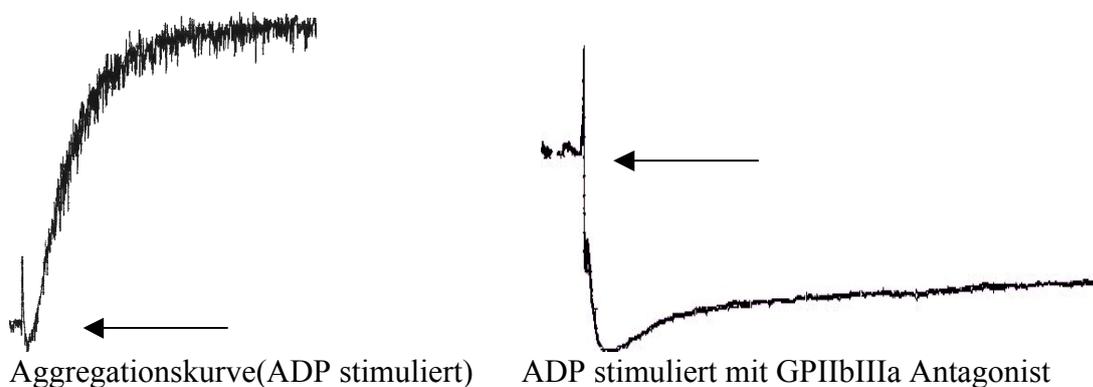


Abb.14: Aggregationskurvenverlauf unter Inhibition

3.1.1.2 ADP induzierte Aggregation mit 5µM-Stimulationsstärke:

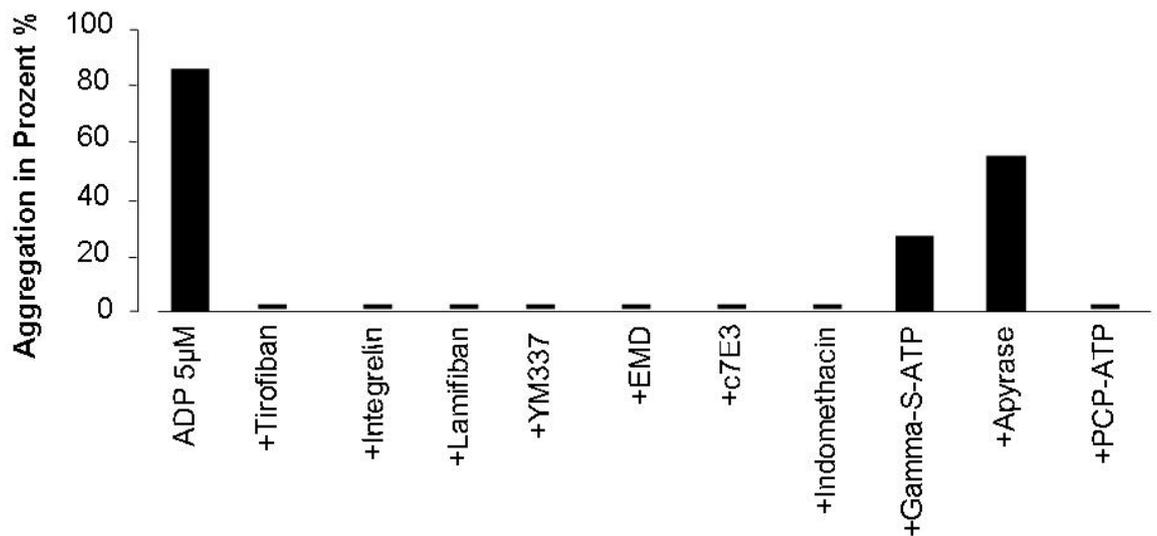


Abb.15: Maximale Aggregation in Prozent (%) unter Stimulation mit 5µM ADP

Die GPIIb-IIIa Antagonisten konnten die Aggregationsinduktion mit 5µM ADP komplett hemmen. Die Cyclooxygenase Hemmung mit Indomethacin erbrachte ebenfalls eine vollständige Aggregationshemmung. PCP-ATP konnte gleichermaßen die ADP induzierte Aggregation verhindern. Die weiteren Antagonisten des ADP-Rezeptor konnten keine vollständige Hemmung der Aggregation bewirken. Gamma S-ATP führte zu einer Reduktion der ADP – induzierten Aggregation um > 50% und Apyrase zeigte eine Hemmung > 30%. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf eine Testung gegen die Ausgangswert Stimulierung mit ADP 5µM (p < 0,05).

3.1.1.3 ADP induzierte Aggregation mit 20 μ M-Stimulationsstärke:

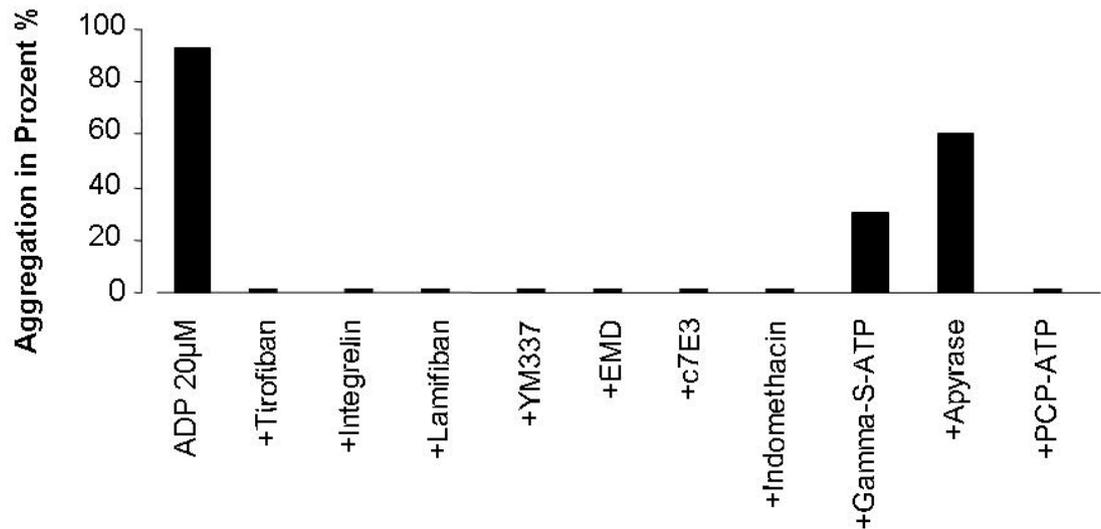


Abb.16: Maximale Aggregation in Prozent (%) unter Stimulation mit 20 μ M ADP

Die GPIIb/IIIa Antagonisten erreichten auch bei stärkerer Stimulierung mit 20 μ M ADP eine vollständige Hemmung der Aggregation. Die Cyclooxygenase Hemmung mit Indomethacin erbrachte eine komplette Hemmung der Aggregation. PCP-ATP verhinderte auch unter der stärkeren ADP Konzentration von 20 μ M eine Aggregation.

Die Hemmung von Gamma S-ATP betrug > 60% und die von Apyrase betrug > 30%. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf eine Testung gegen die Ausgangswert Stimulation mit ADP 20 μ M ($p < 0,05$).

3.1.1.4 TRAP induzierte Aggregation mit 25µM-Stimulationsstärke:

Unter der direkten Stimulierung des Thrombinrezeptors des Thrombozyten mit TRAP (Thrombin-receptor-activating-peptide) zeigten alle GPIIb/IIIa Antagonisten bis auf YM337 eine ca. 80-90% Reduktion der Aggregation.

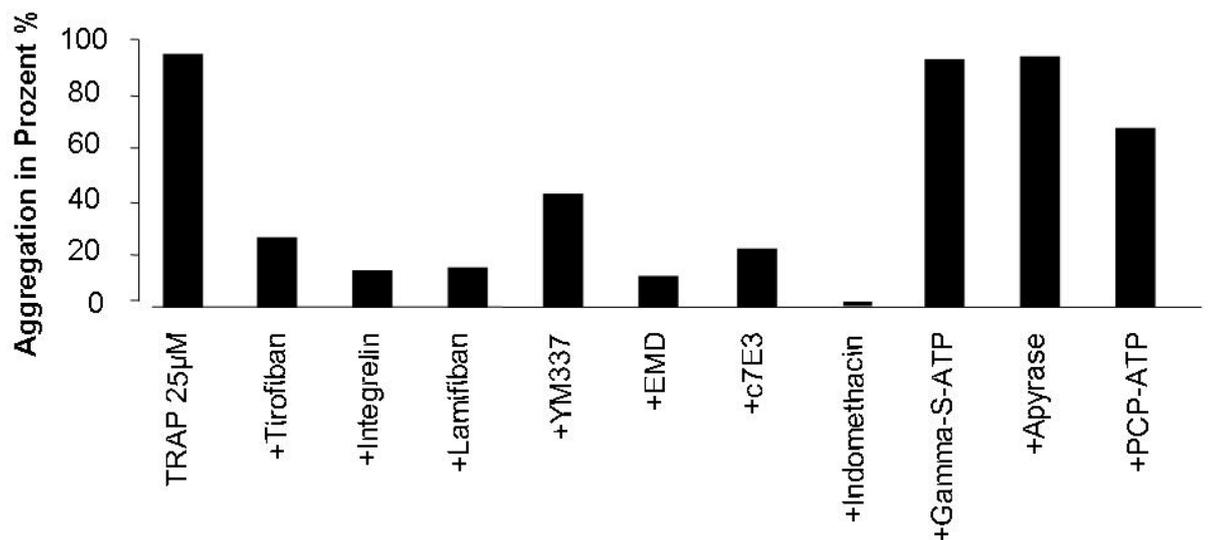


Abb.17: Maximale Aggregation in Prozent (%) unter Stimulation mit 25µM TRAP

Alle Fibrinogenrezeptorantagonisten erreichten unter konstanter Endkonzentration eine nahezu vollständige Inhibition der TRAP-induzierten Aggregation. Nur YM337 konnte die maximale Aggregation nur auf 43% reduzieren. Die Cyclooxygenase Hemmung erreichte auch unter TRAP-Stimulierung eine vollständige Hemmung der Aggregation.

Einzig der ADP Rezeptorantagonist PCP-ATP konnte die Aggregation über 20% hemmen im Vergleich zur isolierten TRAP-Stimulation. Keiner der anderen ADP Rezeptorantagonisten (Apyrase;Gamma-S-ATP) hatten sonst Einfluß auf die TRAP stimulierte Aggregation. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf eine Testung gegen die Ausgangswert Stimulierung mit TRAP 25µM ($p < 0,05$).

3.1.2 ATP- Freisetzung unter ADP und TRAP Stimulierung

Anhand der ATP-Freisetzung ist die Sezernierung der dichten Granula der Thrombozyten gemessen worden. Die ATP Freisetzung wurde mittels Lichttransmissions-Aggregometrie nach Stimulation mit ADP 5 μ M, ADP 20 μ M beziehungsweise TRAP 25 μ M bestimmt.

In dieser Testreihe kann mittels der Lichtaggregometrie/Luminometrie die verwandten ADP-Rezeptorantagonisten technisch bedingt nicht untersucht werden.

Die verwandten Endkonzentrationen der Antagonisten sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

3.1.2.1 ADP induzierte ATP-Freisetzung bei 5 μ M-Stimulationsstärke:

Alle benutzten GPIIb/IIIa Antagonisten führten zu einer signifikanten Hemmung ($p < 0,05$) der ATP Freisetzung, nur unter YM337 und Lamifiban ergab sich keine vollständige Hemmungen, aber eine signifikante Reduktion der plättchen-eigenen ATP-Freisetzung ($p < 0,05$).

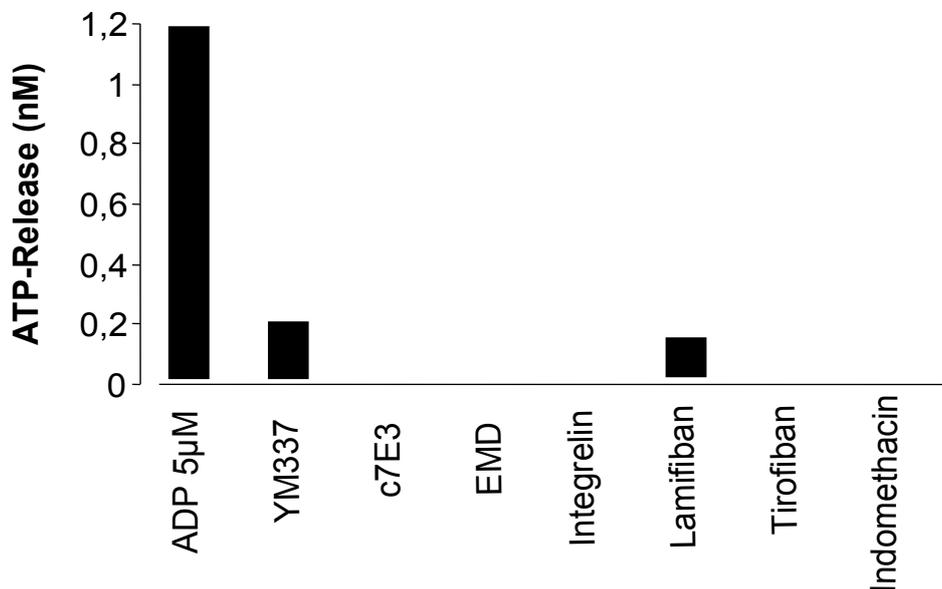


Abb.18: ATP Freisetzung unter ADP 5 μ M Stimulierung

Die Cyclooxygenase Hemmung mittels Indomethacin erbrachte eine komplette Hemmung der Freisetzung von ATP unter ADP 5 μ M Stimulierung ($p < 0,05$).

3.1.2.2 ADP induzierte ATP-Freisetzung bei 20 μ M-Stimulationsstärke:

Unter einer stärkeren Aktivierung der Thrombozyten mit 20 μ M ADP zeigten die Fibrinogenrezeptorantagonisten eine signifikante Hemmung der ATP Freisetzung ($p < 0,05$).

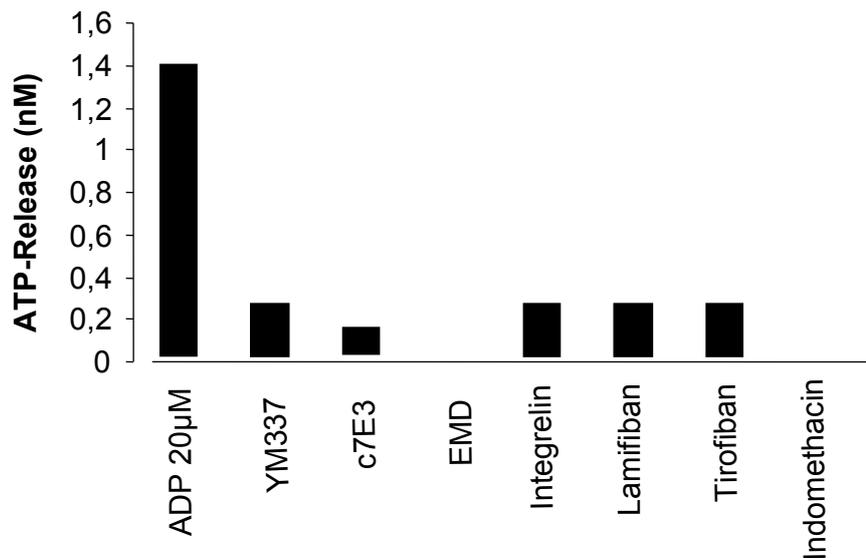


Abb.19: ATP Freisetzung unter ADP 20 μ M Stimulierung

Nur EMD und die Indomethacin Testreihe ergaben eine vollständige Hemmung der ATP Freisetzung ($p < 0,05$). Alle restlichen GPIIb/IIIa Antagonisten erreichten eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der ATP Freisetzung.

3.1.2.3 TRAP induzierte ATP-Freisetzung bei 25 μ M-Stimulationsstärke:

Unter der TRAP Stimulierung zeigte sich bei den GPIIb/IIIa Antagonisten nur EMD eine tendenzielle Reduktion der ATP Freisetzung.

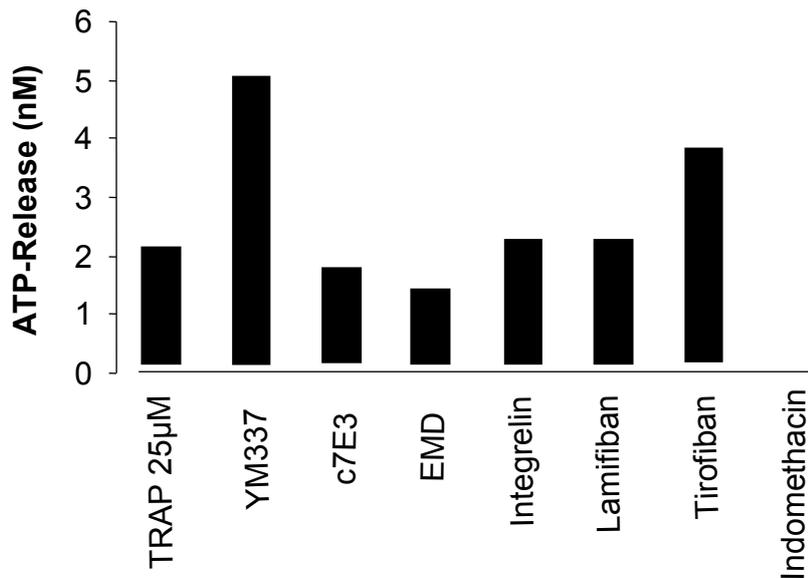


Abb.20: ATP Freisetzung unter 25 μ M TRAP Stimulierung

Die Antagonisten Tirofiban und auch YM337 zeigten einen signifikanten Anstieg der ATP Freisetzung ($p < 0,05$). Indomethacin hemmte auch unter starker Stimulation mit TRAP die ATP Ausschüttung des Thrombozyten ($p < 0,05$). EMD und c7E3 erreichten eine Reduktion der ATP Freisetzung in Bezug auf die isolierte TRAP Stimulationsreihe. Integrelin und Lamifiban hatten keinen Einfluß auf die TRAP stimulierte ATP Freisetzung.

3.1.3 Plättchenabhängige Thrombingeneration

3.1.3.1 Thrombinstimulation

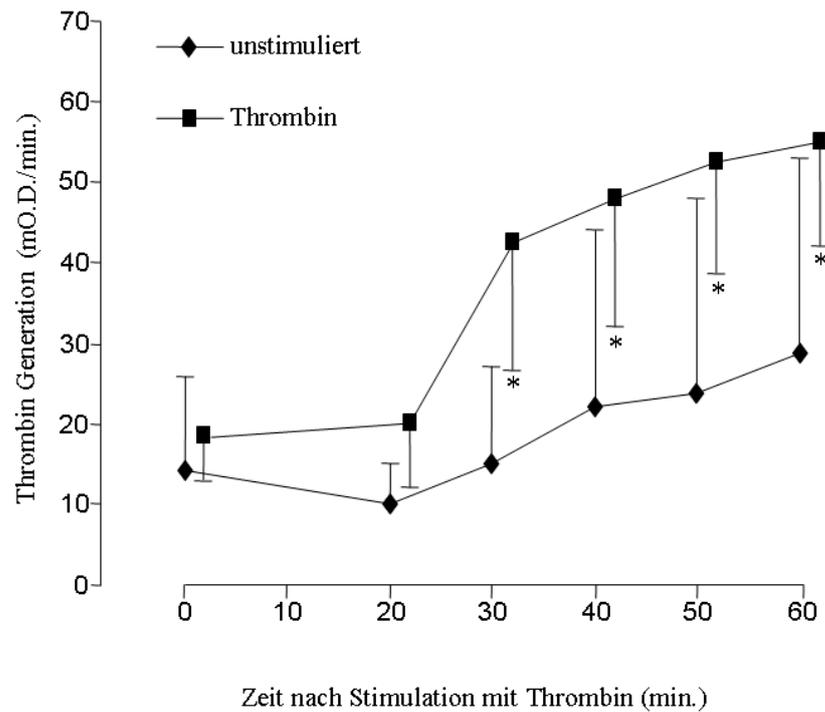


Abb.21:Thrombingeneration unter Thrombinstimulation

Unter Stimulation mit Thrombin wurde die plättchen-eigene Thrombinbildung über einen Zeitverlauf von 60 Minuten unter konstanten Bedingungen gemessen. Im Vergleich zur unstimulierten Testreihe ergab sich eine signifikante Steigerung der Thrombingeneration über den Zeitverlauf ($p < 0,05$).

3.1.3.2 Tissue-Factor-Stimulation

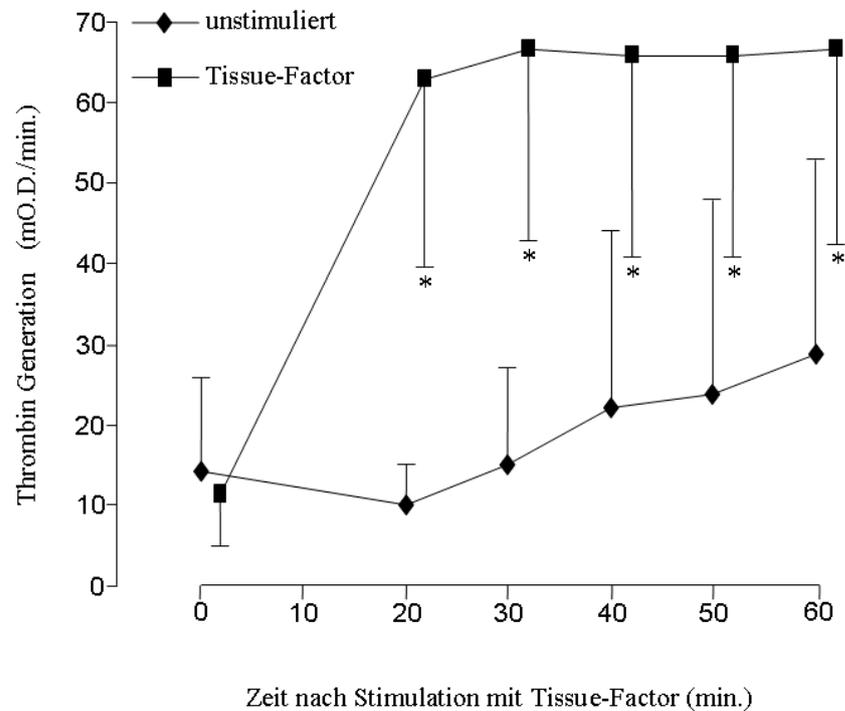


Abb.22: Thrombingeneration unter Tissue-Factor Stimulation

Unter Stimulierung mit dem Tissue-Factor ergab sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung der thrombozytären Thrombinausschüttung über den Zeitverlauf von einer Stunde im Vergleich zur unstimulierten Untersuchungsreihe ($p < 0,05$). Im Vergleich mit der Thrombin stimulierten Versuchsreihe zeigte sich ein steiler Anstieg der Thrombinausschüttung, der ab dem Zeitintervall 20 Minuten nach Stimulationsbeginn in eine stabile Plateau-Phase überging.

3.1.3.3 Fibrinogenrezeptorantagonisten

3.1.3.3.1 c7E3

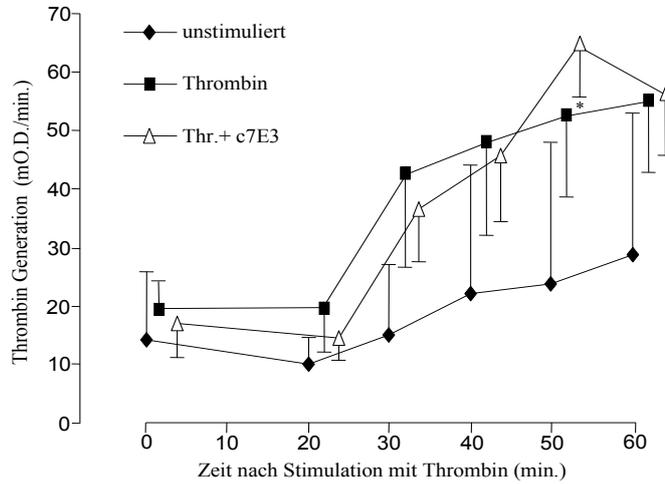


Abb.23:Thrombingeneration unter c7E3-Hemmung (Thr.)

Unter c7E3 zeigte sich nur bei der Messung (50.min.) eine signifikante Erhöhung der Thrombinausschüttung, restlich ergab sich kein Einfluß auf die Thrombin oder Tissue-factor stimulierte Thrombingeneration ($p < 0,05$).

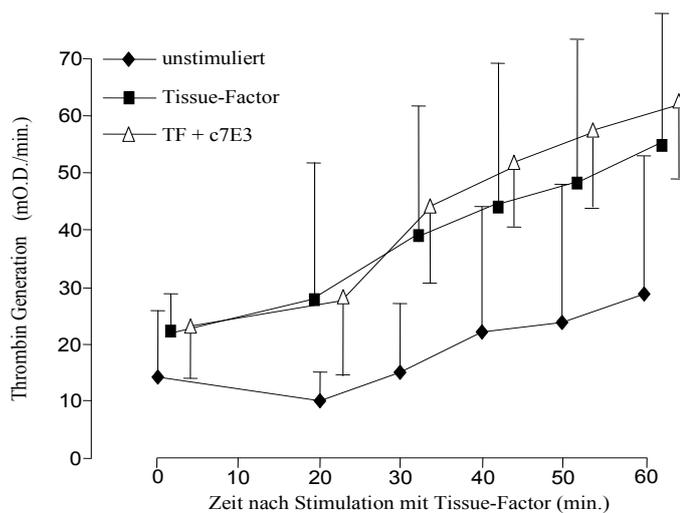


Abb.24 :Thrombingeneration unter c7E3-Hemmung (TF)

3.1.3.3.2 EMD

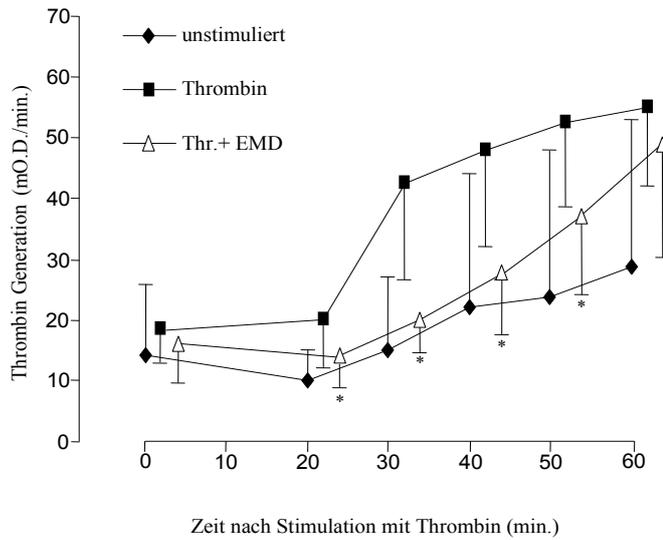


Abb.25 :Thrombingeneration unter EMD-Hemmung (Thr.)

Unter EMD ergab sich bereits bei Minute 20 bis 50 eine signifikante Reduktion der Thrombin-stimulierten Thrombingeneration, aber kein Einfluß auf die Tissue-factor stimulierte Thrombinbildung, nur bei Minute 30 zeigte sich eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$).

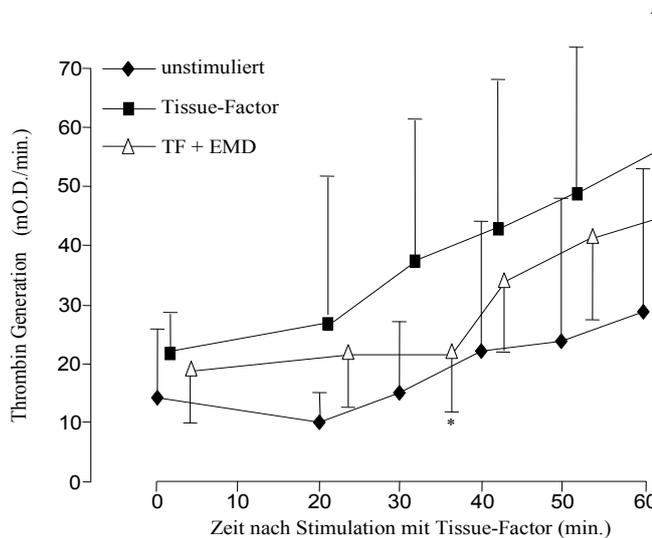


Abb.26 :Thrombingeneration unter EMD-Hemmung (TF)

3.1.3.3.3 Integrelin

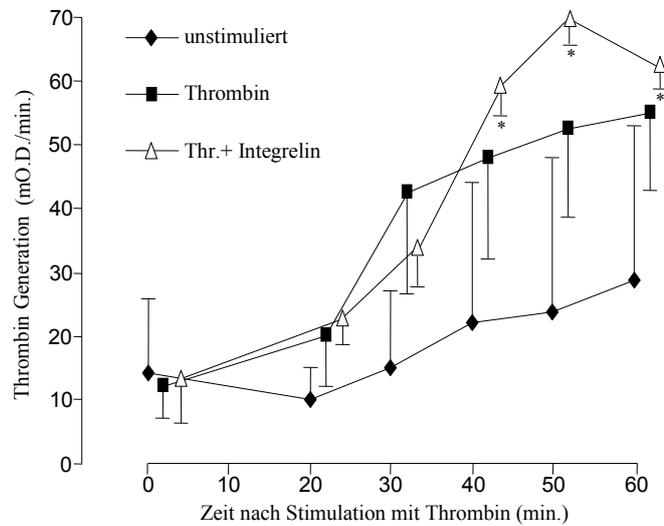


Abb.27 :Thrombingeneration unter Integrelin-Hemmung (Thr.)

Integrelin konnte die Thrombin und Tissue-factor induzierte Thrombingeneration nicht hemmen und führte bei beiden Stimulationswegen zu einer signifikant erhöhten Thrombinausschüttung ab Minute 40 bis 60 ($p < 0,05$).

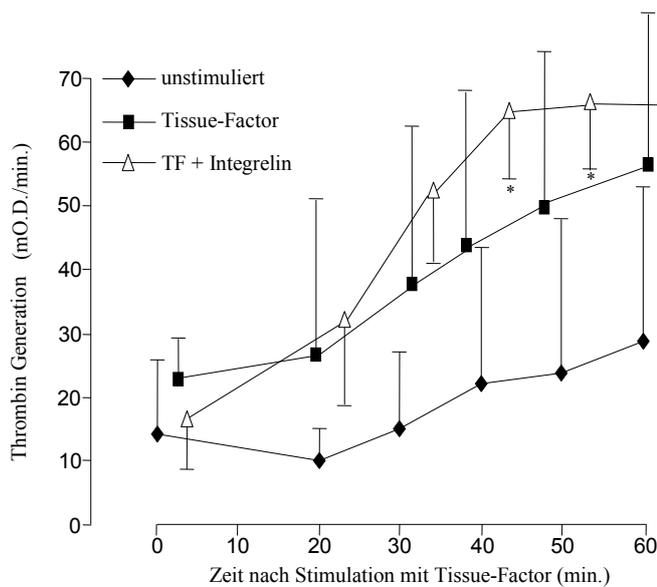


Abb.28 :Thrombingeneration unter Integrelin-Hemmung (TF)

3.1.3.3.4 Lamifiban

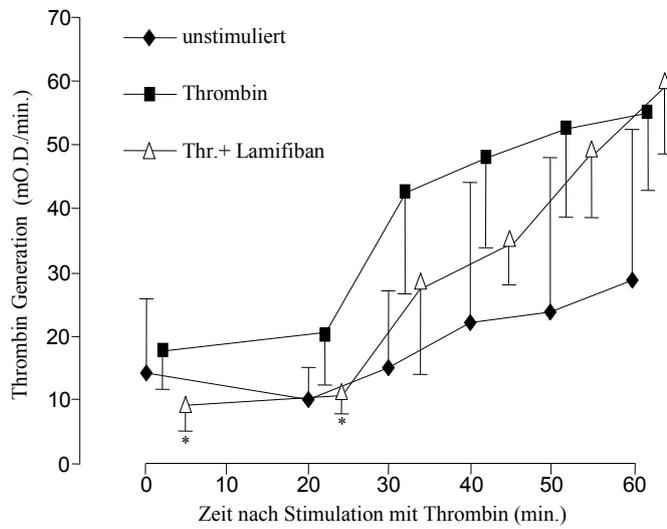


Abb.29 :Thrombingeneration unter Lamifiban-Hemmung (Thr.)

Lamifiban zeigte zu Beginn (Minute 0 bis 10) hemmenden Einfluß auf die Thrombingeneration unter Thrombin Stimulation ($p < 0,05$). Unter der Tissue-factor Stimulation numerischer Anstieg der Thrombinbildung aber ohne Signifikanz.

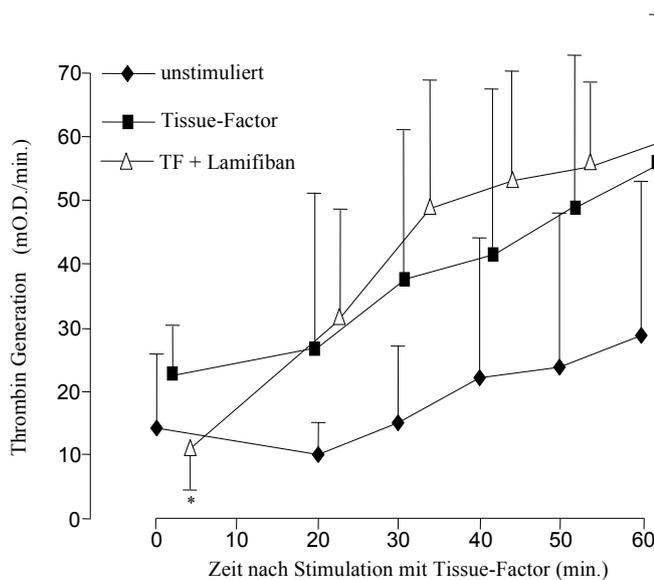


Abb.30 :Thrombingeneration unter Lamifiban-Hemmung (TF)

3.1.3.3.5 Tirofiban

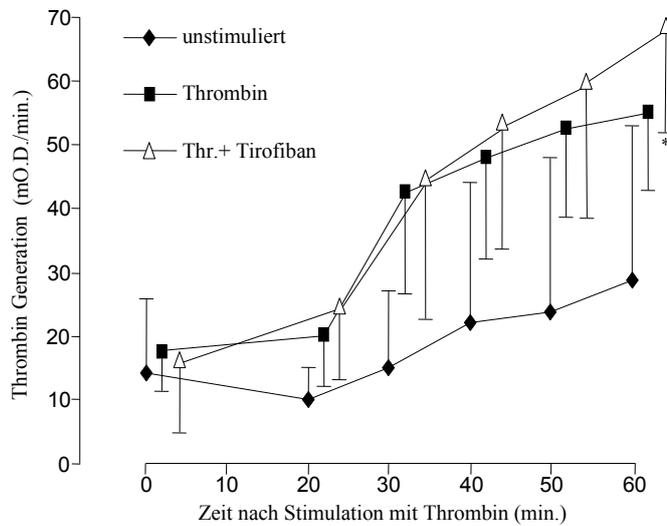


Abb.31 :Thrombingeneration unter Tirofiban-Hemmung (Thr.)

Tirofiban zeigte keinen Einfluß auf die Thrombingeneration unter Thrombin- oder Tissue-factor Aktivierung. Innerhalb des Kurvenverlaufes unter Thrombinstimulation kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Thrombinausschüttung, der bei Minute 60 Signifikanz erreichte ($p < 0,05$).

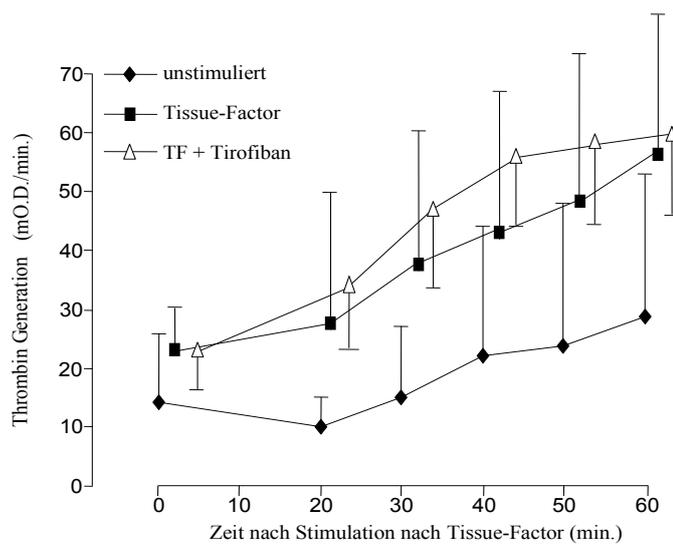


Abb.32 :Thrombingeneration unter Tirofiban-Hemmung (TF)

3.1.3.3.6 YM337

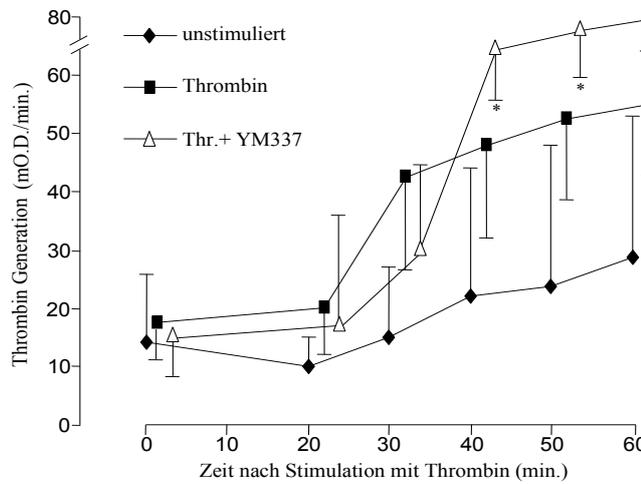


Abb.33 :Thrombingeneration unter YM337-Hemmung (Thr.)

Der Antagonist YM 337 steigerte die Thrombin stimulierte plättchen-eigene Thrombinbildung ab Minute 40 bis 60 signifikant und Minute 40 der Tissue-factor stimulierten Testreihe ($p < 0,05$). Restlich ergab sich kein Einfluß auf die Thrombingeneration.

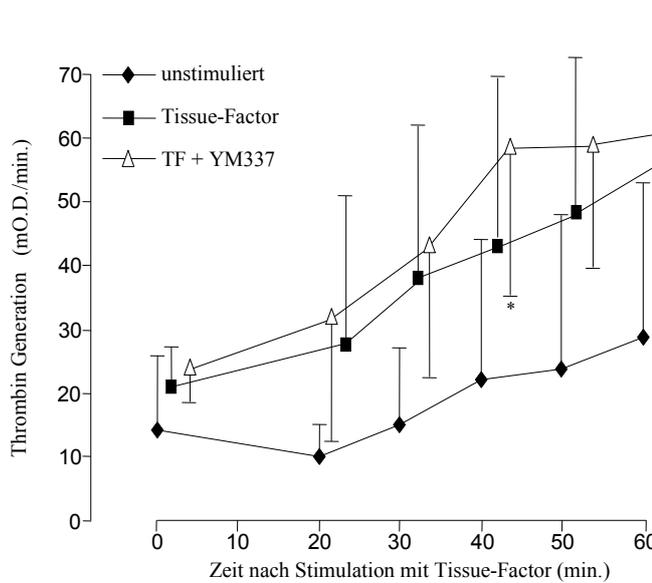


Abb.34 :Thrombingeneration unter YM337-Hemmung (TF)

3.1.3.4 ADP-Rezeptorantagonisten

3.1.3.4.1 PCP-ATP

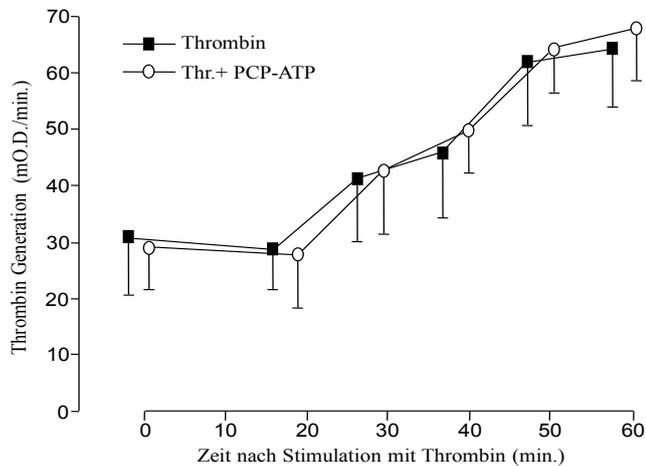


Abb.35 :Thrombingeneration unter PCP-ATP-Hemmung (Thr.)

Der selektive P_{2X} Purino Rezeptorantagonist PCP-ATP zeigte keinen Einfluß auf die Thrombin stimulierte Thrombingeneration. Unter Aktivierung mit Tissue-factor ergab sich eine signifikante Reduktion der Thrombinausschüttung innerhalb des Intervalls von Minute 20 bis 40 ($p < 0,05$).

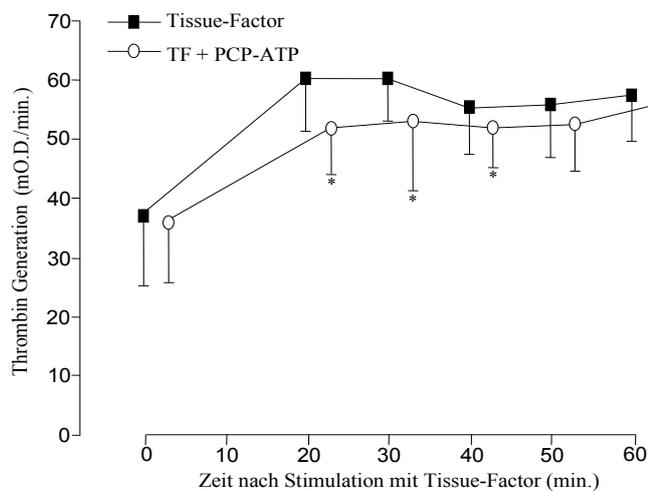


Abb.36 :Thrombingeneration unter PCP-ATP-Hemmung (TF)

3.1.3.4.2 Apyrase

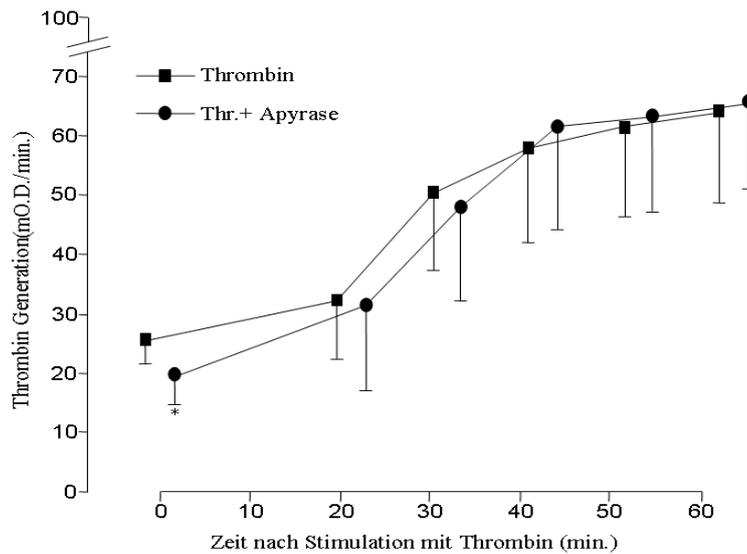


Abb.37 :Thrombingeneration unter Apyrase-Hemmung (Thr.)

Die ADP/-ATPase Apyrase nahm keinen Einfluß auf die Thrombin oder Tissue-factor stimulierte Thrombingeneration. In den Ausgangsbestimmungen beider Stimulationen zeigte sich noch signifikante Reduktion ($p < 0,05$), nur unter Tissue-Factor Stimulation ergab sich im Zeitintervall von 30min. eine signifikante Erniedrigung. Im gesamten Zeitverlauf war aber kein Effekt erkennbar.

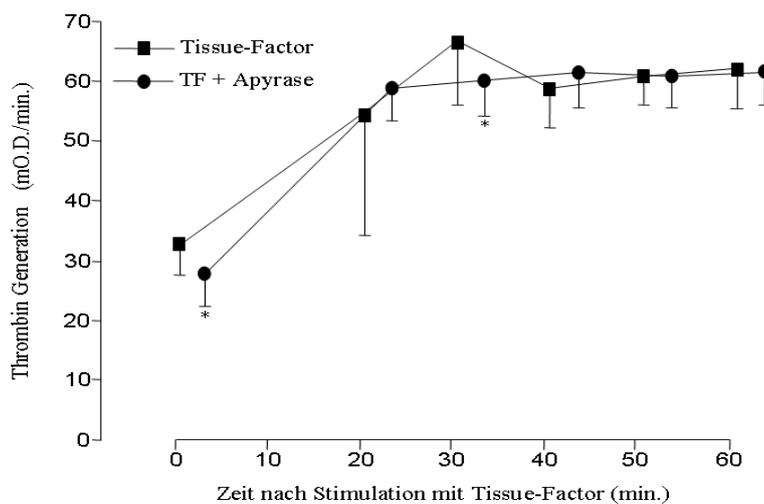


Abb.38 :Thrombingeneration unter Apyrase-Hemmung (TF)

3.1.3.4.3 Gamma (γ)-S-ATP

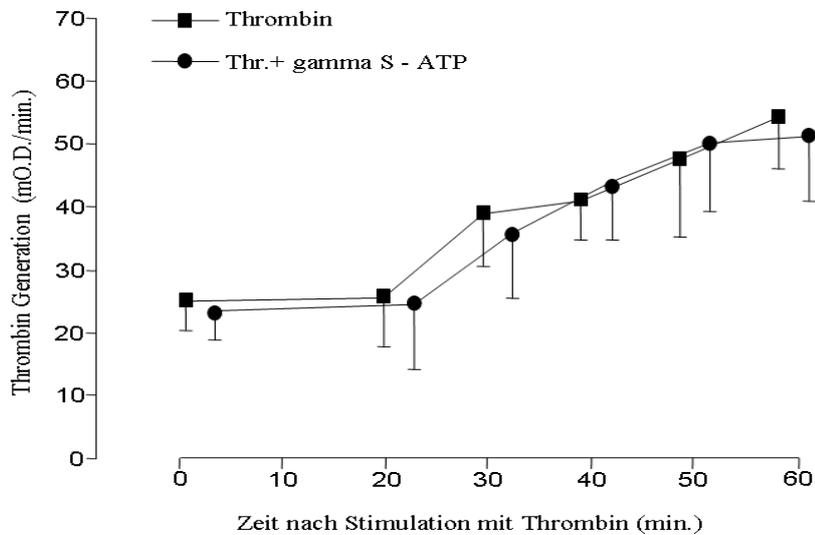


Abb.39 :Thrombingeneration unter Gamma (γ)-S-ATP Hemmung (Thr.)

Der P₂ purinerge Antagonist Gamma-S-ATP zeigte keine Wirkung auf die Thrombin stimulierte Thrombingeneration. In der Tissue-Factor stimulierten Testreihe zeigte sich im Bereich der Messungen ab der 20. bis zur 40 Minute eine signifikante Reduktion der Thrombingeneration ($p < 0,05$)

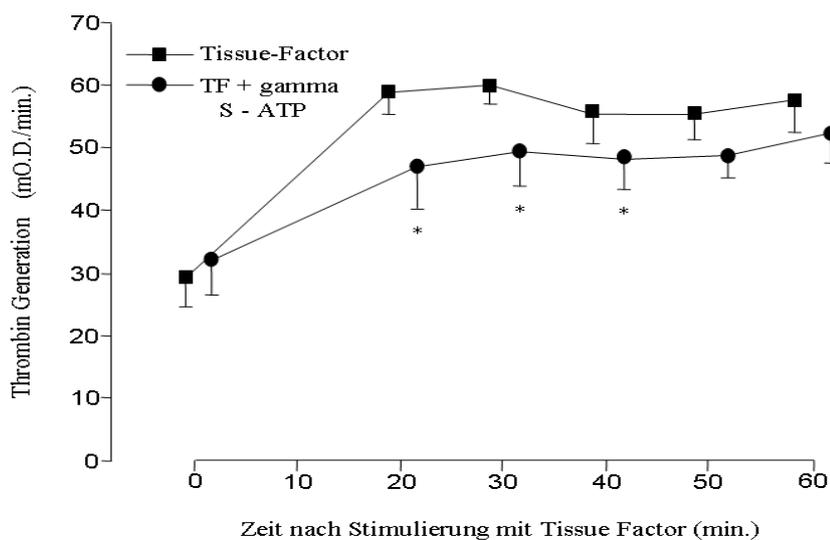


Abb.40 :Thrombingeneration unter Gamma (γ)-S-ATP Hemmung (TF)

3.1.3.5 Cyclooxygenase Hemmer

3.1.3.5.1 Indomethacin

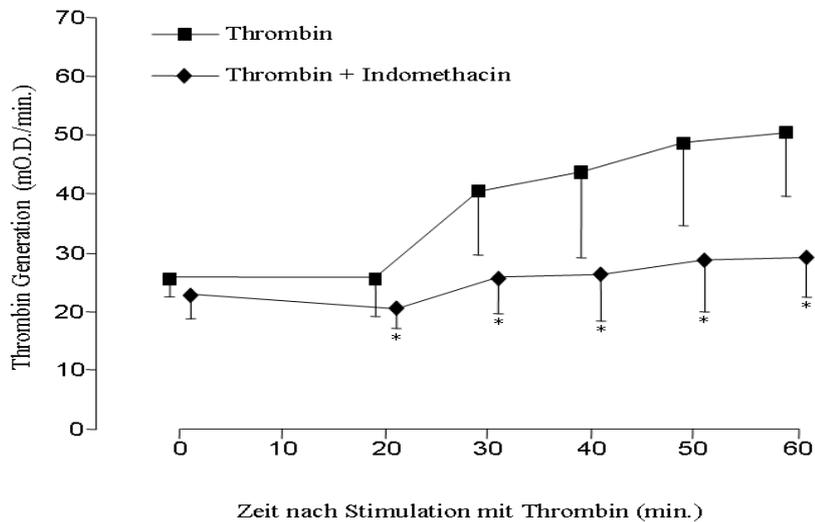


Abb.41 :Thrombingeneration unter Indomethacin Hemmung (Thr.)

Der Cyclooxygenasehemmerstoff Indomethacin zeigte sowohl unter Thrombin als auch unter Tissue-Factor Stimulation eine signifikante Reduktion der Thrombingeneration im Zeitverlauf ($p < 0,05$).

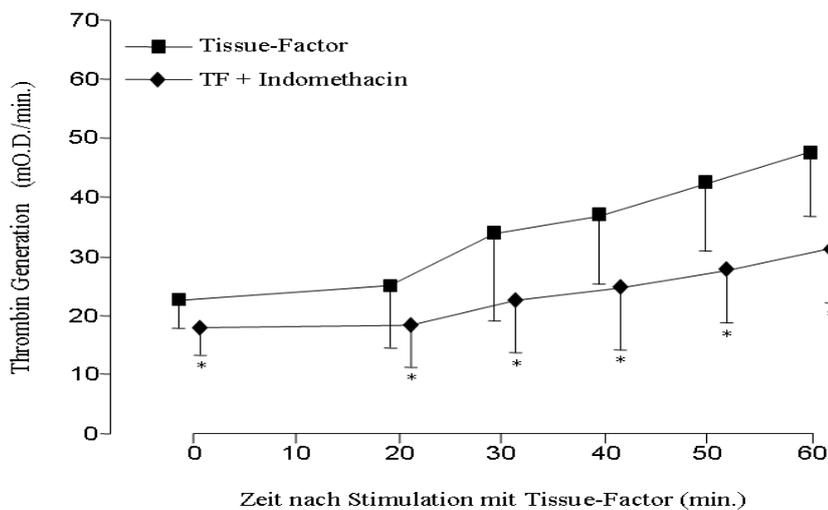


Abb.42 :Thrombingeneration unter Indomethacin Hemmung (TF)

3.1.3.6 Kombinationsversuche

3.1.3.6.1 ADP-Rezeptor – und GPIIb/IIIa Rezeptor Antagonisten

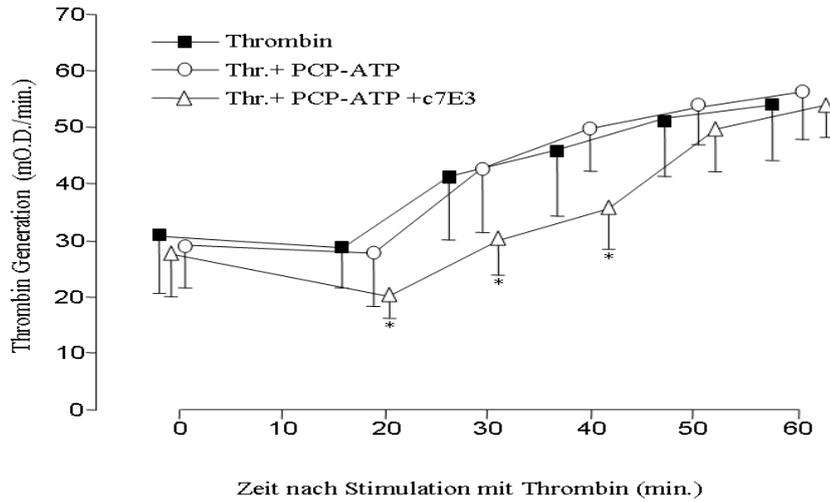


Abb.43 :Thrombingeneration unter PCP-ATP und c7E3 Hemmung (Thr.)

PCP-ATP zeigte vor allem in der Thrombin stimulierten Thrombingeneration in Kombination mit den GPIIb/IIIa Antagonisten c7E3 und EMD eine signifikante Reduktion der Thrombingeneration ($p < 0,05$).

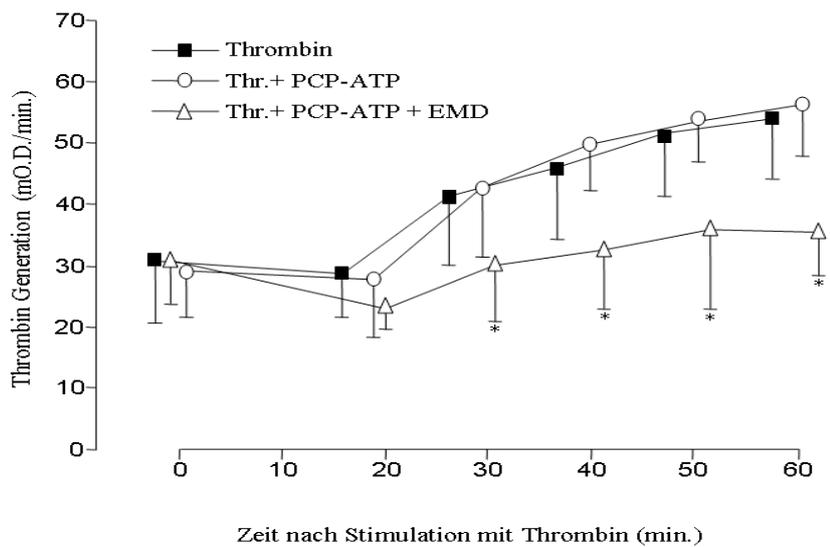


Abb.44 :Thrombingeneration unter PCP-ATP und EMD Hemmung (Thr.)

Die Antagonisten Tirofiban, Lamifiban, YM337 und Integrelin ergaben in Kombination mit PCP-ATP sowohl in der Thrombin als auch in der Tissue-Factor stimulierten Testreihe keine Reduktion der Thrombingeneration im Zeitverlauf über eine Stunde.

Apyrase erbrachte in Kombination mit allen beschriebenen GPIIb/IIIa Antagonisten keine additive Reduktion der plättchen-eigenen Thrombingeneration. In Kombination mit Lamifiban kam es zu einer signifikanten Stimulierung der Tissue Factor stimulierten Versuchreihe ($p < 0,05$).

Auch der purinerge Agonist Gamma S-ATP zeigte keine zusätzliche Einflussnahme in dem Versuch einer dualen Hemmung der Thrombingeneration.

3.1.3.6.2 Cyclooxygenase Hemmer und GPIIb/IIIa Rezeptor Antagonisten

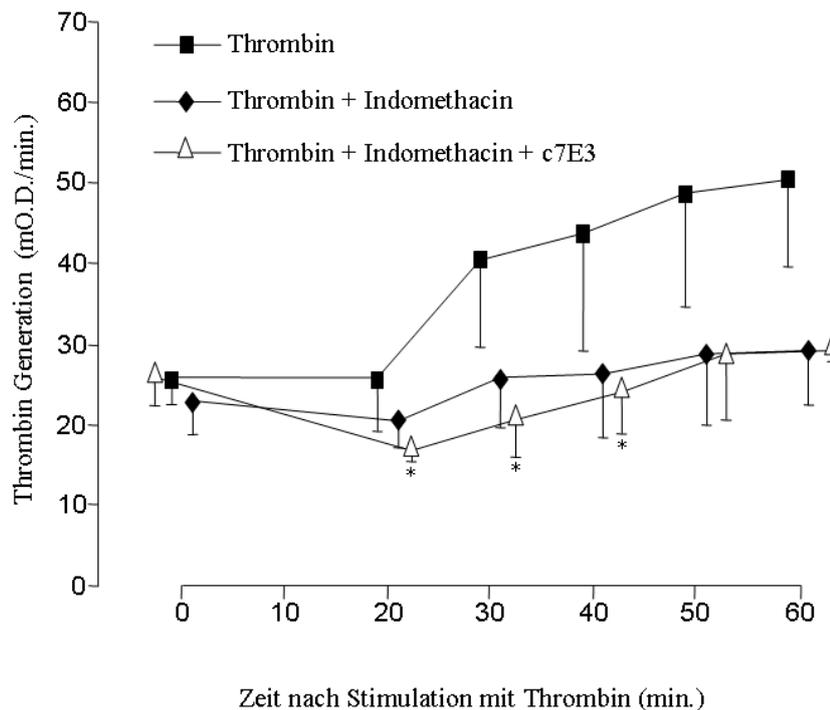


Abb.45 :Thrombingeneration unter Indomethacin und c7E3 Hemmung (Thr.)

Unter Kombination von c7E3 und Indomethacin zeigten sich signifikante Wirkungen auf die Thrombin stimulierte Thrombingeneration ($p < 0,05$).

Nur der Antagonist EMD konnte sowohl bei der Thrombin als auch bei der Tissue-Factor stimulierten Testreihe eine signifikante Hemmung der Thrombingeneration zeigen ($p < 0,05$).

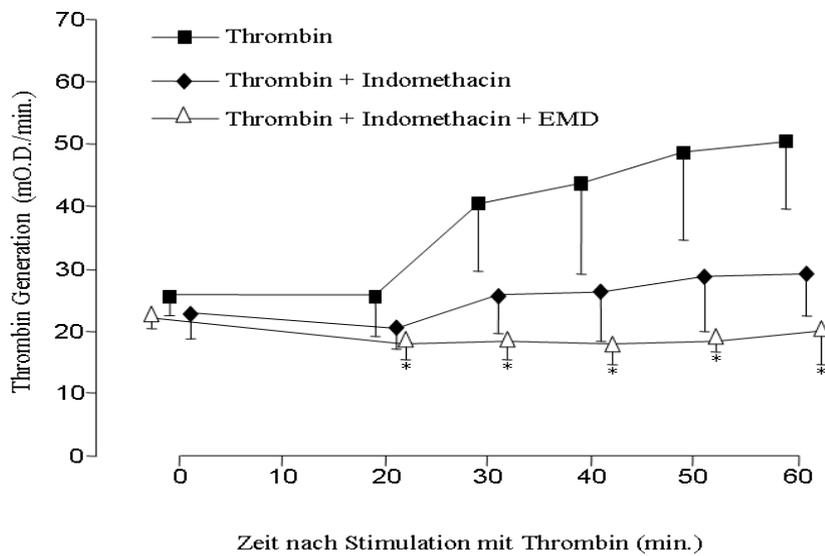


Abb.46 :Thrombingeneration unter Indomethacin und EMD Hemmung (Thr.)

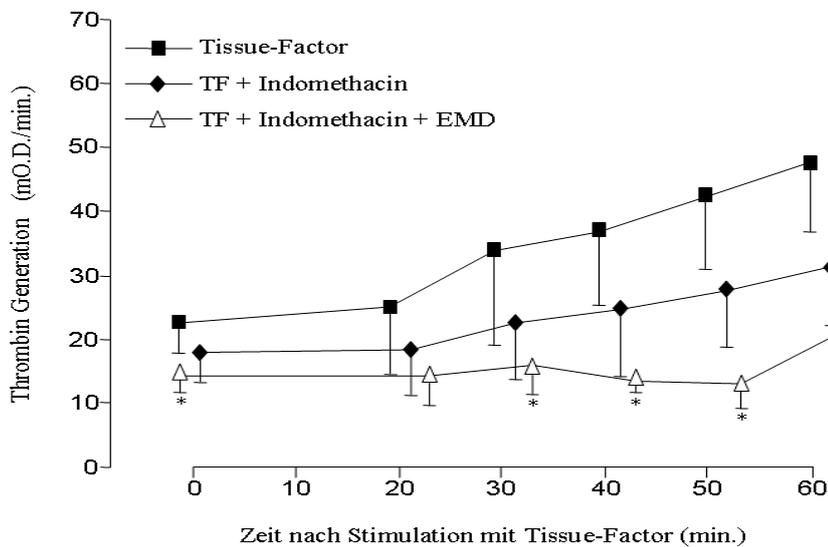


Abb.47 :Thrombingeneration unter Indomethacin und EMD Hemmung (TF)

Alle anderen beschriebenen GPIIb/IIIa Antagonisten zeigten keine zusätzliche Reduktion der Thrombingeneration.

3.1.3.6.3 Cyclooxygenase Hemmer und ADP-Rezeptorantagonist

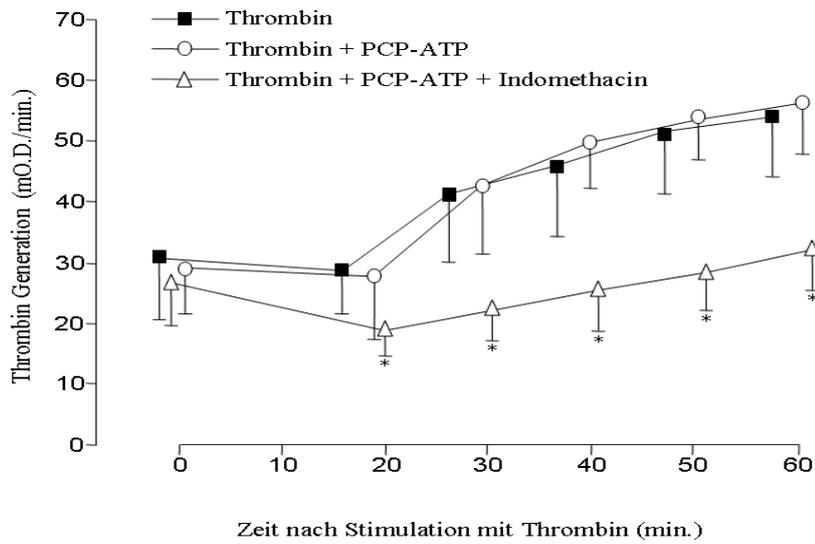


Abb.48 :Thrombingeneration unter Indomethacin und PCP-ATP Hemmung (Thr.)

In der Kombination mit PCP-ATP als ADP Rezeptorblockade und Indomethacin als Cyclooxygenasehemmer ergab sich eine durchgehende signifikante Hemmung der Thrombin als auch der Tissue Factor induzierten Thrombingeneration ($p < 0,05$).

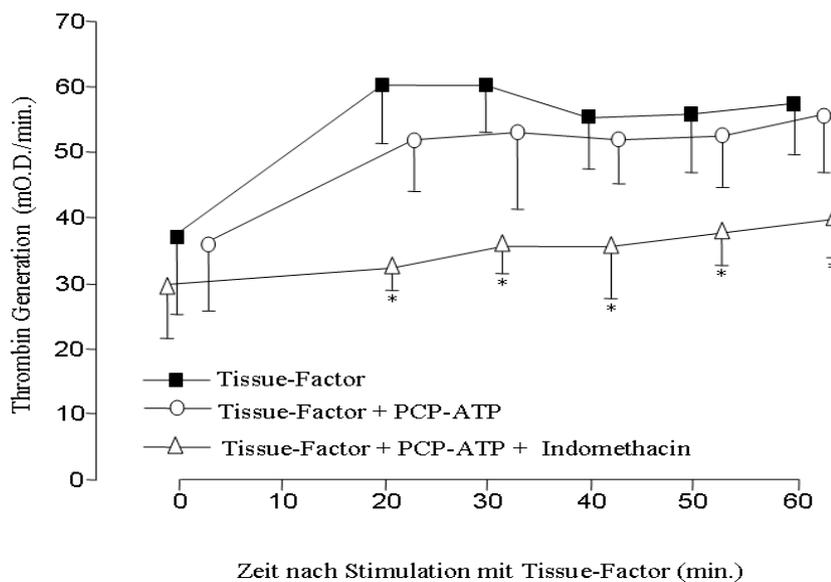


Abb.49 :Thrombingeneration unter Indomethacin und PCP-ATP Hemmung (TF)

3.1.4 Gesamt Thrombinfreisetzung

Diese Werte entsprechen der Summe der m.O.D./min. Bestimmungen für jede einzelne Messreihe über den Zeitraum von 60 Minuten. In der Gesamtmenge von produzierten Thrombin nach der Stimulierung mit entweder Thrombin und Tissue-Factor konnten nur Indomethacin und EMD eine signifikante Reduzierung gegenüber der stimulierten Testreihe zeigen ($p < 0,05$).

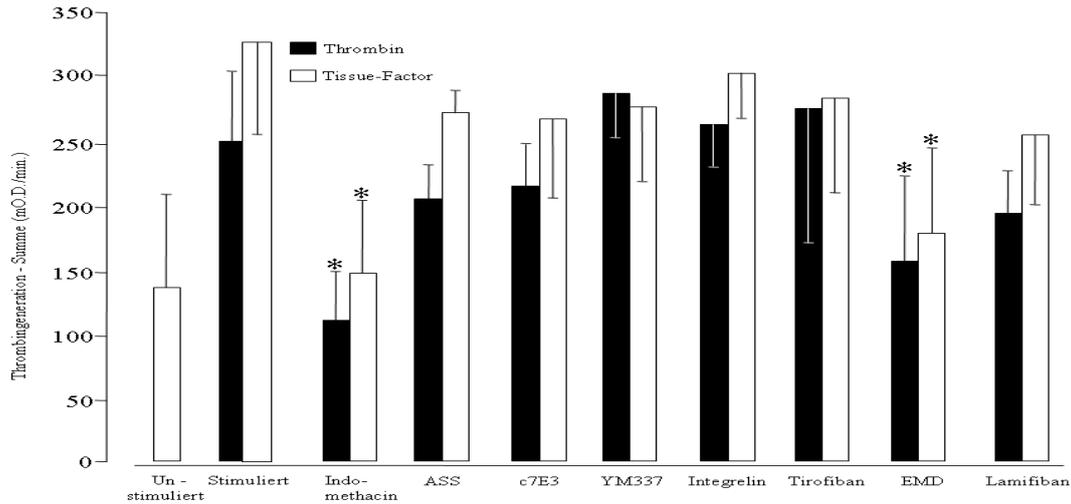


Abb.50:Thrombinfreisetzung unter GPIIb/IIIa und Cyclooxygenase-Hemmung

Unter Stimulierung mit Thrombin und Tissue-Factor zeigte sich bei der Cyclooxygenase Inhibition mit Indomethacin eine signifikante Hemmung der Gesamtmenge von gebildeten Thrombin ($p < 0,05$). Die Kombination mit den GPIIb/IIIa Antagonisten zeigte unter EMD eine signifikante Reduktion der Thrombingeneration im statistischen Vergleich mit der Indomethacin Testreihe ($p < 0,05$).

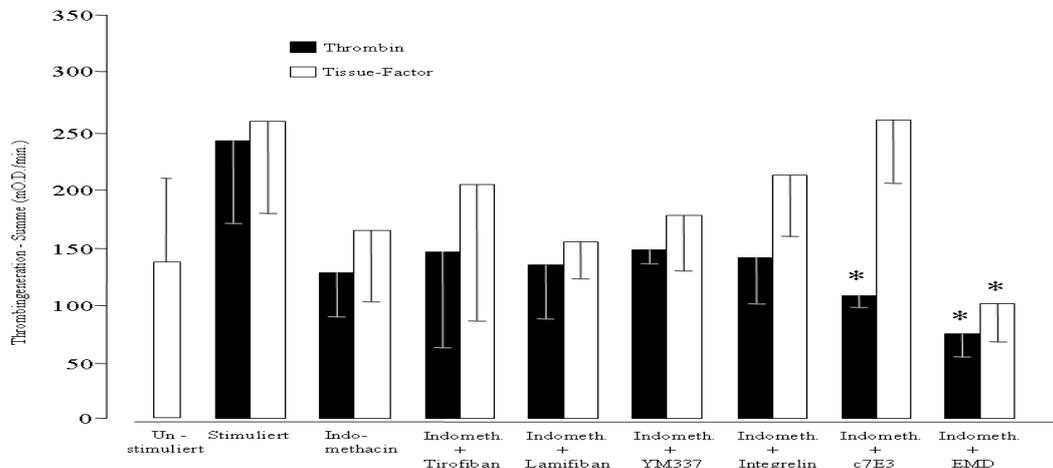


Abb.51:Thrombinfreisetzung unter GPIIb/IIIa und Indomethacin

Unter der ADP Rezeptorblockierung mit PCP-ATP konnte keine Hemmung der Gesamt Thrombin-Menge belegt werden. Nur in der gemeinsamen Hemmung mit Indomethacin konnte die bekannte Reduktion der Thrombinproduktion weiterhin nachvollzogen werden. Mit der Kombination eines Fibrinogenrezeptorantagonisten zeigten sich keine signifikanten Hemmungen der freigesetzten Gesamt-Thrombin-Menge.

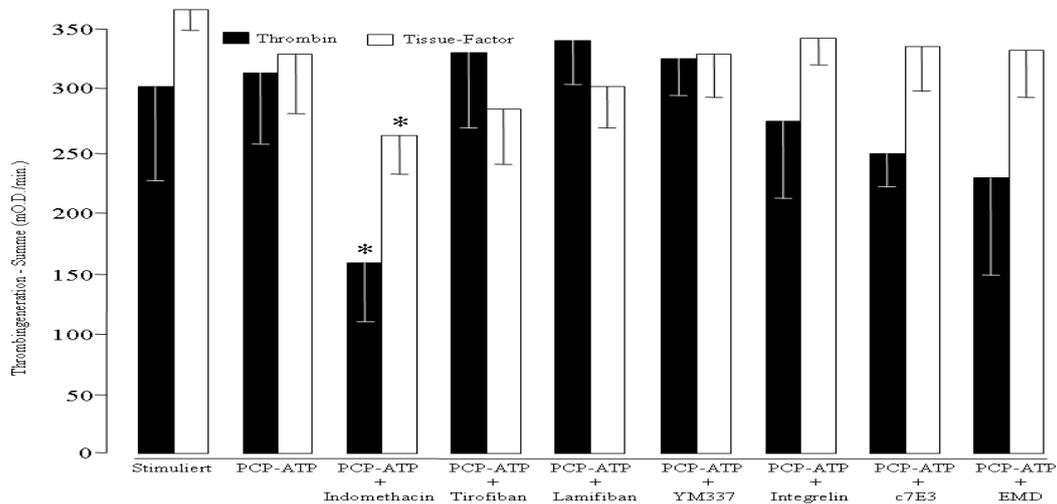


Abb.52:Thrombinfreisetzung unter GPIIb/IIIa und PCP-ATP

Auch unter ADP Rezeptorblockierung mit Apyrase zeigte sich keine signifikante Reduktion der Thrombin-Gesamt-Menge. Nur in der Kombination mit dem Fibrinogenrezeptorantagonisten EMD konnte eine numerische Reduktion der Thrombinbildung gesehen werden, die aber nicht signifikant war.

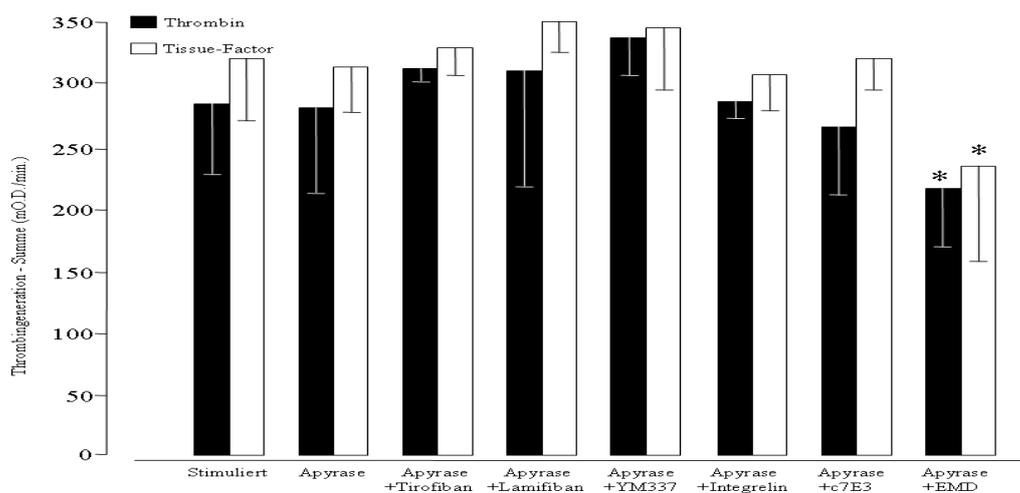


Abb.53:Thrombinfreisetzung unter GPIIb/IIIa und Apyrase

4 Diskussion

Blutplättchen spielen eine zentrale Rolle in der Regulation der Blutgerinnung. Die aktivierte Thrombozytenoberfläche mit dem Prothrombinasekomplex und der plättchen-eigenen Thrombingeneration führen mittels der Gerinnungsfaktoren zu einer Verbindung des extrinsischen und intrinsischen Blutgerinnungssystems. Hier zeigt sich, dass eine klare Spaltung dieser Aktivierungswege nicht möglich ist und dass der Thrombozyt eine entscheidende Verbindung dieser Aktivierungswege der Gerinnung darstellt.

Um das klinische Outcome von Patienten nach koronarem Stenting oder im Rahmen einer akuten thrombotischen Erkrankung zu verbessern kommen unterschiedliche thrombozyteninhibierende Substanzen, wie ASS, die Thienopyridine Clopidogrel und Prasugrel, das Triazolo-Pyrimidin Ticagrelor und die GPIIb-IIIa-Antagonisten (z.B. Abciximab, Tirofiban) zum Einsatz.

Obwohl die Fibrinogenrezeptorantagonisten z.B. Abciximab oder Tirofiban, kombiniert mit einer Therapie bestehend aus ASS und Clopidogrel, bei der interventionellen Kardiologie einen weit verbreiteten Einsatz haben, fehlt bis heute ein direkter und detaillierter Vergleich ihrer unterschiedlichen Effekte auf die Thrombozytenfunktion.

In der vorliegenden Studie wurden die GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten zum Teil kombiniert mit ADP-Rezeptorantagonisten und Cyclooxygenase-Inhibitoren geprüft.

Ziel war es eine potentielle Eigenaktivierung der Plättchen bedingt durch eigenständige Freisetzung von Thrombin zu detektieren. Da Thrombin ein starker Plättchenagonist ist, welcher z.B. weitere Thrombozyten in der Umgebung von plättchen-reichen Thromben rekrutiert, wäre die vermehrte Bildung von Thrombin ein unerwünschter pharmakologischer Nebeneffekt.

Die Hauptergebnisse dieser experimentellen Studie sind im Folgenden dargestellt:

- (1) Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten GPIIb-IIIa-Antagonisten gleichermaßen effektiv in der Hemmung der Thrombozytenaggregation und ineffektiver in der Freisetzung von ATP bei hochdosierter ADP- oder Thrombinrezeptor-Stimulation waren.
- (2) Die Hemmung des Fibrinogenrezeptors mit den verwendeten intravenös zu applizierenden Antagonisten zeigte keine signifikante Hemmung der plättchen-eigenen Thrombingeneration unter Thrombinstimulierung.

- (3) YM337 und Integrelin steigerten die Thrombingeneration .
- (4) Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die effektive Hemmung des Cyclooxygenase Systems eine signifikante Reduktion der plättchen-eigenen Thrombingeneration und damit eine Protektion vor einer Eigenstimulierung des Thrombozyten darstellt.
- (5) Unter Tissue-factor und Thrombin Induktion konnte für den oral zu applizierenden GPIIbIIIa Antagonisten EMD eine Inhibition der plättchen-eigenen Thrombingeneration gezeigt werden.
- (6) Indomethacin zeigte unter Kombination mit EMD und c7E3 synergistische Effekte in der Hemmung der Thrombingeneration.

4.1 Plättchenaggregation und ATP Release

Bei Stimulation des Thrombinrezeptors war die Inhibition der Plättchenaggregation durch alle Antagonisten deutlich schwächer. Es ist anzunehmen, dass die Ursache für die diskrepanz unterschiedliche Inhibition von ADP- und TRAP-induzierter Plättchenaggregation, welche bereits früher beobachtet wurde (Bihour 1999, Dickfeld 2001), am ehesten in der Mobilisation des internen Pools von nicht-geblockten GPIIb-IIIa-Rezeptoren durch den potenteren Agonist TRAP zu sehen ist (Nurden 1999; Gawaz 2000; Kleiman 1995; Morgenstern 1992). Diese Beobachtungen werden durch Untersuchungen von Neumann et al bestätigt, bei denen drei GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten miteinander verglichen wurden (Neumann 2001). Auch hier konnte nach Stimulation mit TRAP keine komplette Inhibition der Plättchenaggregation erreicht werden.

4.2 Degranulation

Erhöhte Plättchenaktivierung und Granula-Sekretion sind von zentraler Bedeutung für die Pathophysiologie der akuten und subakuten Stent-Thrombose. Man geht heutzutage davon aus, dass diese beiden Effekte entscheidend sowohl zur Progression der Atherosklerose per se als auch zur Gefäßstenose im Anschluss an eine koronare Interventionen beitragen (Gawaz 2001, Dickfeld 2001).

Um den Einfluss der gegenwärtig angewandten antithrombozytären Behandlungsstrategien auf die Plättchen-Sekretion zu evaluieren, wurde die ATP-Freisetzung als Marker für die

Freisetzung der dichten Granula untersucht. Es konnte gezeigt werden dass GPIIb/IIIa Antagonisten nach schwacher Stimulierung einen inhibitorischen Effekt auf die Freisetzung der dichten Granula haben. Bei starker Stimulation jedoch hatte keines der untersuchten Medikamente einen entscheidenden inhibitorischen Einfluss auf die Freisetzung der dichten Granula. Es wurde schon mehrmals gezeigt, dass GPIIb-IIIa-Rezeptoren schlechte Inhibitoren der Degranulation sind, so z.B. durch Gawaz (Gawaz 2000), Dickfeld (Dickfeld 2001) und Neumann (Neumann 2001).

4.3 Thrombin stimulierte Thrombingeneration

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stehen im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen Thrombinsenkung durch Gabe von Abciximab oder Tirofiban. Jedoch wurde bisher auch noch nicht der Zeitverlauf über eine Stunde untersucht. Bei den in vitro durchgeführten Testungen zeigten sich für die genannten GPIIb/IIIa Antagonisten, bis auf EMD keine signifikanten Reduktionen der Thrombingeneration. Abgesehen von den fehlenden thrombozytenaktivierenden Einflüssen, wie sie in vivo bei einem Patienten nach Stentimplantation vorherrschen, sind die Konzentrationen der GPIIb-IIIa-Rezeptoren, bei denen sie einen inhibitorischen Effekt erzielt haben, weit über dem physiologisch erreichten Konzentration. (Simon 1997, Keularts 1998, Tam 1998, Vidhun 1999).

Da die Agonisten-induzierte Thrombingeneration unter Cyclooxygenase-Hemmung ausreichend reduziert werden konnte, ist dies ein Hinweis auf die Notwendigkeit einer Kombinationstherapie von unterschiedlich wirkenden Thrombozyten-Aggregationshemmern. Dies gilt besonders, wenn man davon ausgeht, dass die Thrombozyten beim Passieren der durch die koronare Intervention verletzten Gefäßwand subendothelialen Komponenten exponiert sind und in Folge aktiviert werden und dadurch eine Thrombozyten-Oberfläche als Ausgangspunkt für die Thrombingeneration bilden (Scharf 1992, Wittkowsky 2002)

4.4 Tissue-factor stimulierte Thrombingeneration

Neben der Plättchenaggregation, welche zu akuter und subakuter Thrombose im Anschluss an eine koronare Intervention führt, ist die Plättchenadhäsion an die endotheliale Zelloberfläche ein wichtiger Aktivierungsweg der Plättchen. Durch die Freisetzung von In-

haltsstoffen aus Alpha-Granula und dichten-Granula haben die Thrombozyten das Potential, wichtige endotheliale Zellfunktionen wie Chemotaxis und Migration zu regulieren (Gawaz 1997, Gawaz 2000).

In der aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass auch hier die Cyclooxygenasehemmung von entscheidender Wichtigkeit ist. Vor allem die tendenzielle Wirkungssummiierung mit EMD, einem Antagonisten der keinem Einfluß auf die LIBS Induktion hat (Dickfeld 2001), ist sehr interessant. Wie bereits bekannt ist, führen GPIIbIIIa Antagonisten, die eine LIBS induzierende Basis haben über eine Thromboxan A-2 vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calcium Konzentrationen zur Steigerung der intrinsischen Aktivierbarkeit des Thrombozyten (Honda 1998, Peter 1998). Freisetzungsreaktionen der Blutplättchen sind Calcium abhängig (Siess 1989). Gerade die Substanzen, die entweder keine LIBS Aktivität haben (EMD) oder einen entscheidenden Prozess – die Thromboxan Bildung (Indomethacin) hemmen, liefern einen möglichen Hinweis, dass die plättchen-eigene Thrombingeneration mit der LIBS Aktivität eng in Zusammenhang steht. Somit ist die Kombination von Indomethacin oder Aspirin mit einem GPIIbIIIa Antagonisten ohne LIBS Aktivität (z.B. EMD) zu favorisieren.).

4.5 Direkter Vergleich der Fibrinogenrezeptorantagonisten

Die untersuchten GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten haben den gleichen Wirkmechanismus, sie inhibieren den letzten Teil der Signaltransduktionsstrecke der Plättchenaggregation, d.h. die Fibrinogenbindung an den GPIIb-IIIa-Rezeptor des Thrombozyten. Drei Typen dieser Antagonisten sind derzeit vorhanden. Einerseits gibt es monoklonale Antikörper (c7E3, YM337), synthetische Peptide wie Integrelin, Lamifiban oder synthetisierte Nicht-Peptide wie Tirofiban oder EMD 122347.

Es konnte im Rahmen der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass alle Fibrinogenrezeptorantagonisten gleichermaßen effektiv bei der Reduktion der induzierten Plättchenaggregation sind. Ähnliche Ergebnisse zeigen die Untersuchungen von Neumann et al 2001.

Die plättchenabhängige Thrombingenerierung wurde signifikant durch den Einsatz von EMD, eines aktiven Metaboliten eines oralen GPIIbIIIa Antagonisten gehemmt. Vor allem im Vergleich mit z.B. YM337 oder Integrelin, die zum Teil zu einer Steigerung der Thrombingeneration führten, zeigt sich die Notwendigkeit der weiteren klinischen Kontrollen hinsichtlich

der pharmakologischen Unterschiede der GPIIb/IIIa Antagonisten. Hier zeigte sich, dass die meisten der klinisch angewendeten Antagonisten keinen Einfluß auf die Thrombingeneration hatten. Aber es gilt vor allem diejenigen in ihrer Funktion und in ihren Wechselwirkungen zu bestimmen, die in einem akuten koronaren Syndrom oder einer Intervention mehr Risiken als Nutzen haben.

4.6 Therapeutische Aussichten

Die Frage dieser Studie hinsichtlich der prokoagulatorischen Aktivität der Fibrinogenrezeptorantagonisten ist für die Therapieentscheidung wichtig. Im heutigen Klinikalltag stehen mehrere Antagonisten zur Verfügung. Die Indikation für diese Therapie ist hinlänglich bereits geklärt worden, z.B. die PRISM- und die CAPTURE-Studie haben diesen positiven Effekt bei der medikamentösen Behandlung der instabilen Angina pectoris bewiesen (The PRISM Investigators, The CAPTURE Investigators). Darüber hinaus haben Studien gezeigt, dass die Kombination von GPIIb-IIIa-Antagonisten mit Fibrinolytika sich vorteilhaft auf die Rekanalisationsrate bei der Fibrinolysetherapie des akuten Myokardinfarktes auswirkt (The IMPACT-AMI-Investigators 1997, The PARADIGM-Investigators 1998, Cannon 1999), aber die schon oft vermutete und auch teilweise bestätigte Aktivierung der prothrombotischen Reaktionen könnten ein weiteres Kriterium zur Wahl sein. Von Seiten der in dieser Studie gesehenen Ergebnisse gibt es nur den oralen Antagonisten EMD, der die Anforderungen hinsichtlich der Reduktion der Thrombingeneration erfüllen konnte. In experimentellen Studien konnte zwar ein inhibierender Effekt des Fibrinrezeptorantagonisten EMD auf die plättchen-eigene Thrombingeneration demonstriert werden, aber die negativen Daten der EXCITE, OPUS und BRAVO-Studie zeigten das die oralen GPIIb-IIIa – Antagonisten eine erhöhte Mortalität aufgrund einer höheren Blutungsrate hatten.

Weiterhin ist aber festzuhalten, dass ein multimodaler Ansatz mit mehreren antithrombozytären Medikamenten eine bessere antithrombotische Therapie darstellt. Dieser Aspekt ist aber bereits in den klinischen Alltag eingezogen. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass durch Kombination von z.B. ASS und Clopidogrel eine Reduktion von Stent-Thrombosen erzielt werden kann (Leon 1998, The CURE Committee 2001).

Von dem heutigen Bild der Atherosklerose-Entstehung rücken die entzündlichen Komponenten in den Vordergrund und vor allem Faktor- κ B, der die zentrale Schaltzelle entzündlicher Veränderungen in Gefäßwandzellen darstellt (Brand 1996). Aktivierte Blutplättchen stimulieren das NF- κ B-System und induzieren die Transkription NF- κ B-regulierter Genpro-

dukte (Koshelnick 1997, Gawaz 1998) und bilden somit Grundlage für das Fortschreiten der ursächlichen Atherosklerose. Medikamente zur Hemmung dieses inflammatorischen Aspektes wären sicherlich eine Bereicherung der bisherigen Sekundärprophylaxe.

Die Plättchen eigene Degranulation kann selbst durch synergistischen Einsatz aller untersuchten Substanzen (ASS, Clopidogrel, GPIIb/IIIa Antagonisten) nur unbefriedigend inhibiert werden. Da durch diesen Mechanismus eine inflammatorische und mitogene Reaktion in der Gefäßwand initiiert werden kann, ist die Hemmung dieser Freisetzungsreaktionen durch Entwicklung neuer Medikamente weiterhin erforderlich um eine suffiziente Akut- und Langzeitbehandlung der Gefäßveränderungen zu erhalten.

Die Einführung der neuen Antikoagulantien z.B. Dabigatran, einem Medikament, welches nach oraler Einnahme direkt das humane α -Thrombin blockiert, wird erneut Raum für die Erforschung von Kombinationsstrategien in der Prävention oder Therapie von thrombotischen Ereignissen geschaffen werden. Jedoch auch hier zeigten Studien wie die WOEST-Studie, dass Kombinationstherapien, bzw. Triple-Therapien mit einem erheblichen Blutungsrisiko behaftet sind. Die Veröffentlichung der PLATO-Studie zur Therapie mit Ticagrelor einem nicht der Stoffgruppe der Thienopyridine zugehörigem Inhibitor des P_2Y_{12} ADP Rezeptors und Prasugrel in der TRITON-TIMI-38-Studie zeigt die Aktualität neuer Ansätze in der multimodalen Plättchenhemmung.

In der TRA2P-Studie mit dem PAR-1-Rezeptor Antagonisten Vorapaxar hemmt dieser effektiv die Thrombin vermittelte Plättchenaggregation und reduzierte die bekannten vaskulären Endpunkte. Auch dieser neue Wirkungsmechanismus geht mit einer Steigerung insbesondere der intrakraniellen Blutungen einher.

Weiterhin werden Genomics und Proteomics in der thrombozytären Forschung und somit im Verständnis der Vielfalt der Interaktionen des Blutplättchens innerhalb der vaskulären Erkrankungen neue Erkenntnisse bringen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden experimentellen Studie wurden die prokoagulativen Effekte der GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten Abciximab, Lamifiban, Eptifibatide, Tirofiban, EMD, YM337 kombiniert mit weiteren thrombozytären Funktionshemmung mittels ADP-Rezeptorblockade und/oder Cyclooxygenase-Hemmung untersucht.

Die Ergebnisse dieser Studie lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- a) Alle geprüften Fibrinogenrezeptorantagonisten führten zu einer Reduktion der Agonisten-induzierten Plättchenaggregation ($p < 0,05$).
- b) Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Indomethacin als Cyclooxygenase-Hemmstoff sowohl die Plättchenaggregation, als auch die Thrombingeneration ausreichend hemmen kann ($p < 0,05$).
- c) Der orale GPIIbIIIa Antagonist EMD konnte die Thrombingeneration sowohl unter Thrombin, als auch unter Tissue-Factor Stimulierung hemmen ($p < 0,05$).
- d) Die intravenös zu verabreichenden GPIIbIIIa Antagonisten (Abciximab, Lamifiban, Eptifibatide, Tirofiban) zeigten keine relevanten Auswirkungen auf die plättchen-eigene Thrombingeneration über den Zeitverlauf von einer Stunde ($p < 0,05$).
- e) Die Antagonisten YM337 und Integrelin zeigten eine Steigerung der Thrombingeneration ($p < 0,05$).
- f) Die ADP Rezeptor Antagonisten zeigten in dieser Studienanordnung keinen Effekt auf die Thrombingeneration ($p < 0,05$).

Die prokoagulatorische Potenz der GPIIbIIIa Antagonisten, gemessen an der Stimulierung der plättchen-eigenen Thrombinfreisetzung konnte nur durch EMD entscheidend gehemmt werden. EMD und Abciximab konnten in Kombination mit einer Cyclooxygenase Hemmung einen tendenziellen synergistischen Effekt in der Reduktion der Thrombingeneration zeigen. Restlich ergaben sich keine signifikanten Auswirkungen auf die Thrombingeneration durch die eingesetzten Fibrinogenrezeptorantagonisten.

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
CD	Cluster of Determinants
Col	Kollagen
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Azetat
Fg	Fibrinogen
Fn	Fibronektin
GP	Glykoprotein
I. E.	Internationale Einheiten
i.v.	Intravenös
ICAM	Intercellular adhesion molecule
KHK	Koronare Herzkrankheit
LIBS	Liganden induzierte Bindungsstelle
M	Mol/l
PBS	phosphate buffered saline
PPP	Platelet Poor Plasma
PRP	Platelet Rich Plasma
PTCA	Percutane transluminale Koronarangioplastie
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
rtPA	rekombinant tissue plasminogen activator
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TF	Tissue Faktor
TRAP	thrombin receptor activating peptide
TxA ₂	Thromboxan A ₂
Z. n.	Zustand nach

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Diskoide Form nicht-aktivierter Thrombozyten	2
Abb. 2: Aggregation und Adhäsion	3
Abb. 3: Schematische Darstellung der Thrombozytenadhäsion	5
Abb.4 : Thrombozyten in der Aggregation mit Pseudopodienausbildung	5
Abb. 5: Schematische Darstellung der Thrombozytenaggregation	6
Abb. 6: Struktur des GP I Ib-IIIa-Rezeptor	8
Abb. 7 : ADP-Rezeptoren	10
Abb. 8: Wirkorte von Antithrombozytären Substanzen	11
Abb. 9: Struktur von Fibrinogenrezeptorantagonisten	17
Abb.10: Gerinnungsaktivierung durch den Tissue Factor	22
Abb. 11 : Auswertung der Lichtaggregometrie und Luminometrie	26
Abb. 12 : Pipettierschema	28
Abb. 13 : Prinzip der technischen Messung der Thrombingeneration	29
Abb.14: Aggregationskurvenverlauf unter Inhibition	32
Abb.15: Maximale Aggregation in Prozent (%) unter Stimulation mit 5µM ADP	33
Abb.16: Maximale Aggregation in Prozent (%) unter Stimulation mit 20µM ADP	34
Abb.17: Maximale Aggregation in Prozent (%) unter Stimulation mit 25µM TRAP	35
Abb.18: ATP Freisetzung unter ADP 5µM Stimulierung	36
Abb.19: ATP Freisetzung unter ADP 20µM Stimulierung	37
Abb.20: ATP Freisetzung unter 25µM TRAP Stimulierung	38
Abb.21:Thrombingeneration unter Thrombinstimulation	39
Abb.22: Thrombingeneration unter Tissue-Factor Stimulation	40
Abb.23:Thrombingeneration unter c7E3-Hemmung (Thr.)	41
Abb.24 :Thrombingeneration unter c7E3-Hemmung (TF)	41
Abb.25 :Thrombingeneration unter EMD-Hemmung (Thr.)	42
Abb.26 :Thrombingeneration unter EMD-Hemmung (TF)	42
Abb.27 :Thrombingeneration unter Integrelin-Hemmung (Thr.)	43
Abb.28 :Thrombingeneration unter Integrelin-Hemmung (TF)	43
Abb.29 :Thrombingeneration unter Lamifiban-Hemmung (Thr.)	44
Abb.30 :Thrombingeneration unter Lamifiban-Hemmung (TF)	44
Abb.31 :Thrombingeneration unter Tirofiban-Hemmung (Thr.)	45
Abb.32 :Thrombingeneration unter Tirofiban-Hemmung (TF)	45
Abb.33 :Thrombingeneration unter YM337-Hemmung (Thr.)	46
Abb.34 :Thrombingeneration unter YM337-Hemmung (TF)	46
Abb.35 :Thrombingeneration unter PCP-ATP-Hemmung (Thr.)	47
Abb.36 :Thrombingeneration unter PCP-ATP-Hemmung (TF)	47
Abb.37 :Thrombingeneration unter Apyrase-Hemmung (Thr.)	48
Abb.38 :Thrombingeneration unter Apyrase-Hemmung (TF)	48
Abb.39 :Thrombingeneration unter Gamma (γ)-S-ATP Hemmung (Thr.)	49
Abb.40 :Thrombingeneration unter Gamma (γ)-S-ATP Hemmung (TF)	49
Abb.41 :Thrombingeneration unter Indomethacin Hemmung (Thr.)	50
Abb.42 :Thrombingeneration unter Indomethacin Hemmung (TF)	50
Abb.43 :Thrombingeneration unter PCP-ATP und c7E3 Hemmung (Thr.)	51
Abb.44 :Thrombingeneration unter PCP-ATP und EMD Hemmung (Thr.)	51
Abb.45 :Thrombingeneration unter Indomethacin und c7E3 Hemmung (Thr.)	52
Abb.46 :Thrombingeneration unter Indomethacin und EMD Hemmung (Thr.)	53
Abb.47 :Thrombingeneration unter Indomethacin und EMD Hemmung (TF)	53
Abb.48 :Thrombingeneration unter Indomethacin und PCP-ATP Hemmung (Thr.)	54
Abb.49 :Thrombingeneration unter Indomethacin und PCP-ATP Hemmung (TF)	54

Abb.50:Thrombinfreisetzung unter GPIIb/IIIa und Cyclooxygenase-Hemmung	55
Abb.51:Thrombinfreisetzung unter GPIIb/IIIa und Indomethacin	55
Abb.52:Thrombinfreisetzung unter GPIIb/IIIa und PCP-ATP	56
Abb.53:Thrombinfreisetzung unter GPIIb/IIIa und Apyrase	56

Tabellenverzeichnis

Tab 1: Untersuchte GPIIb-IIIa-Antagonisten	15
Tab 2: Endkonzentrationen der Antagonisten.....	24

Literaturverzeichnis

1. Abrams C, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Haemost* 65 (1991) 467-473
2. Andrews RK, Lopez JA, Bendt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol* 29 (1997) 91-105
3. Antiplatelet Trialists Collaboration. Collaborative overview of randomized trials of antiplatelet therapy-I: Prevention of death, myocardial infarction and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients *BMJ* 308 (1994) 81-106
4. Antman, E. M., C. H. McCabe, E. P. Gurfinkel, A. G. Turpie, P. J. Bernink, D. Salein, A. Bayes De Luna, K. Fox, J. M. Lablanche, D. Radley, J. Premmereur and E. Braunwald (1999). "Enoxaparin prevents death and cardiac ischemic events in unstable angina/non-Q-wave myocardial infarction. Results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 11B trial." *Circulation* **100**(15): 1593-1601.
5. Armstrong P. Heparin in acute coronary disease-requiem for a heavyweight? *N Engl J Med* 337 (1997) 492-494
6. Aronson DL, Chang P, Kessler CM. Platelet-dependent thrombin generation after in vitro fibrinolytic treatment. *Circulation* 85 (1992) 1706-1712
7. Bach RR. Initiation of coagulation by tissue factor. *Crit.Rev.Biochemistry* (1988) 23:339-368
8. Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary atherosclerosis, a multifactorial disease. *Circulation* 87 (1993) II-3 – II-16
9. Bazan JH. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc.Natl.Acad.USA* 87 (1990) 6934-6938
10. Becker RC. Antiplatelet therapy in coronary heart disease. *Arch Pathol Lab Med* 117 (1993) 89-96
11. Becker RC, Tracy RP, Bovill EG, Mann KG, Ault K. The clinical use of flow cytometry for assessing platelet activation in acute coronary syndroms. TIMI-III thrombolysis and anticoagulation group. *Coron Art Dis* 5 (1994) 339-345
12. Bennett CL, Davidson CJ, Raisch DW, Weinberg PD, Benett RH, Feldman MD. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with ticlopidine in the setting of coronary artery stents and stroke prevention. *Arch Intern Med* 159 (1999) 2524-2528

13. Bennett CL, Connors JM, Carwile JM, Moake JL, Bell WR, Tarantolo SR, McCarthy LJ, Sorde R, Hatfield AJ, Feldman MD, Davidson CJ, Tsai HM. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel. *N Engl J Med* 342 (2000) 1773-1777
14. Berkowitz SD, Harrington RA, Rund MM, Tcheng JE. Acute profound thrombocytopenia after c7E3 FAB therapy. *Circulation* 95 (1997) 809-813
15. Bertrand ME, Legrand V, Boland J, Fleck E, Bonnier J, Emmanuelson H, Vrolix M, Missault L, Chierchia S, Casaccia M, Niccoli L, Oto A, White C, Webb-Peploe M, Van Belle E, McFadden EP. Randomized multicenter comparison of conventional anticoagulation versus antiplatelet therapy in unplanned and elective coronary stenting. The full anticoagulation versus aspirin and ticlopidine (fantastic) study. *Circulation* 98 (1998) 1597-1603
16. Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, Gershlick AH, Investigators for Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting: the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation* 102 (2000) 624-629
17. Bihour C, Durrieu-Jais C, Macchi L, Poujol C, Coste P, Besse P, Nurden P, Nurden AT. Expression of markers of platelet activation and the interpatient variation in response to abciximab. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (1999) 212-219
18. Bithell TC. The physiology of primary hemostasis. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens Jn, Herausgeber. *Wintrobe's Clinical Hematology*, Lea & Febinger Verlag Philadelphia, 9. Auflage, 1993, 57-82
19. Blankenship JC. Bleeding complications of glycoprotein IIb-IIIa receptor inhibitors *Am Heart J* 138 (1999) S287-S296
20. Blasi F. Urokinase and urokinase receptor: a paracrine/autocrine system regulation cell migration and invasiveness. *Bioessays* 15 (1993) 105-111
21. Böck M, Gawaz M, Dietzler A, Heim MU, Mempel W. Single-donor platelet concentrates: changes of surface glycoproteins during storage. *Haemostasis* 24 (1994) 230-235
22. Born GVR. Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets. *J. Physiol Lond.* 162 (1962) 67-73
23. Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 168(1963) 178-196
24. Brand K, Page S, Rogler G, Barsch A, Brandl R, Knuechel R, Pate M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 97 (1996) 1715-1722

25. Braun M, Kramann J, Strohbach H, Schrör K. Incomplete inhibition of platelet secretion by low-dose aspirin. *Platelets* 5 (1994) 325-331
26. Cannon CP, Tracy R. Clotting for the clinician: an overview of thrombosis and antithrombotic therapy. *J Thrombosis and Thrombolysis* 2 (1995) 95-106
27. Cannon CP. Combination therapy for acute myocardial infarction: glycoprotein IIb/IIIa inhibitors plus thrombolysis. *Clin Cardiol* 22 (1999) IV37-43
28. Carmelie Carmeliet, P., N. Mackman, L. Moons, T. Luther, P. Gressens, I. Van Vlaenderen, H. Demunck, M. Kasper, G. Breier, P. Evrard, M. Muller, W. Risau, T. Edgington and D. Collen (1996). "Role of tissue factor in embryonic blood vessel development." *Nature* **383**(6595): 73-75.
29. Charo IF, Kieffer N, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins. Aus: Colman RW, Hirsh J, Marder V, Salzman EW (Hrsg.): *Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice*. Philadelphia, JB Lippincott, 1994, 3.Auflage, 489-507
30. Clemetson KJ. Platelet GPIIb-V-IX complex. *Thrombosis and Haemostasis* 78 (1997) 266-270
31. Cohen LS. Clinical pharmacology of acetylsalicylic acid. *Sem Thromb Hemost* 2 (1976) 95-106
32. Cohen Cohen, M., C. Demers, E. P. Gurfinkel, A. G. Turpie, G. J. Fromell, S. Goodman, A. Langer, R. M. Califf, K. A. Fox, J. Premmureur and F. Bigonzi (1997). "A comparison of low-molecular-weight heparin with unfractionated heparin for unstable coronary artery disease. Efficacy and Safety of Subcutaneous Enoxaparin in Non-Q-Wave Coronary Events Study Group." *N Engl J Med* **337**(7): 447-452.
33. Coller BS, Peerschke EI, Scudder LE, Sullivan CA. A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa. *J Clin Invest* 72 (1983) 325-338
34. Coller BS. Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy. *Circulation* 92 (1995) 2373-2380
35. Coller BS. Platelet GPIIb/IIIa antagonists: the first anti-integrin receptor therapeutics. *J Clin Invest.* 99 (1997) 1467-1471
36. Coller BS. Monitoring platelet GPIIb/IIIa antagonist therapy. *Circulation* 97 (1998) 5-9
37. Coller BS. Binding of abciximab to alpha V beta 3 and activated alpha M beta 2 receptors: with a review of platelet-leukocyte interactions. *Thromb Haemost* 82 (1999) 326-336

38. Colman RW, Cook JJ, Niewiarowski S. Mechanisms of platelet aggregation. Aus: Colman RW, Hirsh J, Marder V, Salzman EW (Hrsg.): Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice. Philadelphia, JB Lippincott, 1994b, 3. Auflage, 508-521
39. Colman RW, Marder VJ, Salzman EW, Hirsh J. Overview of Hemostasis. Aus: Colman RW, Hirsh J, Marder V, Salzman EW (Hrsg.): Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice. Philadelphia, JB Lippincott, 1994a, 3. Auflage, 3-18
40. Coukell AJ, Markham A. Clopidogrel. *Drugs* 54 (1997) 745-750
41. Cox D. Methods for monitoring platelet function. *Am Heart J* 135 (1998) S160-S169
42. D'Souza SE, Ginsberg MH, Matsueda GR, Plow EF. A discrete sequence in a platelet integrin is involved in ligand recognition. *Nature* 350 (1991) 66-68
43. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 145 (1964) 1310-1333
44. Davies MJ. The composition of coronary-artery plaques *N Engl J Med* 336 (1997) 1312-1314
45. Deckelbaum LI, Sax FL. Tirofiban, a nonpeptide inhibitor of the platelet glycoprotein IIb-IIIa receptor. In: Sasahara AA, Loscalzo J, editors. *New Therapeutic Agents in Thrombosis and Thrombolysis*. Marcel Dekker, 1997, 355-365
46. DeGroot PG, Sixma JJ. Platelet adhesion. *Br J Haematol* 75 (1990) 581-589
47. Dickfeld T, Lengyel E, May AE, Massberg S, Brand K, Page S, Thielen C, Langenbrink K, Gawaz M. Transient interaction of activated platelets with endothelial cells induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 via p38 mitogen-activated protein kinase mediated pathway. Implications for atherogenesis. *Cardiovasc Res* 49 (2001) 189-199
48. Dickfeld T, Ruf A, Pogatsa-Murray G, Müller I, Engelmann B, Taubitz W, Fischer J, Meier O, Gawaz M. Differential antiplatelet effects of various glycoprotein IIb-IIIa antagonists. *Thromb Res* 101 (2001) 53-64
49. Drake TA, Morrissey JH, Edington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues Implications for disorders of haemostasis and thrombosis. *Am. J. Pathol.* 134 (1989) 1087-1097
50. Du X, Plow EF, Frelinger AL, O'Toole TE, Loftus JC, Ginsberg MH. Ligands activate integrin β IIb β 3 (platelet GPIIb-IIIa). *Cell* 65 (1991) 409-416
51. Du X, Ginsberg MH. Integrin alpha IIb beta 3 and platelet function. *Thromb Haemost* 78 (1997) 96-100

52. Eikelboom JW, Anand SS, Malmberg K, Weitz JI, Ginsberg JS, Yusuf S. Unfractionated heparin and low-molecular-weight heparin in acute coronary syndrome without ST elevation: a meta-analysis. *Lancet* 355 (2000) 1936-1942
53. Esmon CT. Regulation of blood coagulation. *Biochim Biophys Acta* 1470 (2000) 349-360
54. Faulds D, Sorkin EM. Abciximab (c7E3 Fab). A review of its pharmacology and therapeutic potential in ischaemic heart disease. *Drugs* 48 (1994) 583-598
55. Feinman, R. D., J. Lubowsky, I. Charo and M. P. Zabinski (1977). "The lumi-aggregometer: a new instrument for simultaneous measurement of secretion and aggregation by platelets." *J Lab Clin Med* **90**(1): 125-129.
56. Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, Fitzgerald GA. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med* 315 (1986) 983-989
57. Fragmin During Instability in Coronary Artery Disease (FRISC) Study Group. Low-molecular-weight heparin during instability in coronary artery disease. *Lancet* 347 (1996) 561-568
58. Frelinger AL, Cohen I, Plow EF, Smith MA, Roberts J, Lam SCT, Ginsberg MH. Monoklonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin α IIb- β 3 (Glycoprotein IIb-IIIa) alter receptor affinity, specificity and function. *J Biol Chem* 266 (1990) 17106-17111
59. Fuster V, Badimon L, Badimon J, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndroms. *N Engl J Med* 326 (1992) 242-250
60. Fuster V, Badimon L, Cohen M, Ambrose JA, Badimon JJ, Chesebro J. Insights into pathogenesis of acute ischemic syndroms. *Circulation* 77 (1988) 1213-1220
61. Gachet C, Hechler B, Leon C, Vial C, Leray C, Ohlmann P, Cazenave JP. Activation of ADP receptors and platelet function. *Thrombosis and Haemostasis* 78 (1997) 271-275
62. Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 86 (2001) 222-232
63. Gawaz M, Loftus JC, Bajt ML, Frojmovic MM, Plow EF, Ginsberg MH. Ligand bridging mediates integrin α IIb β 3 dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest* 8 (1991) 1128-1134
64. Gawaz M, Bogner C, Gurland HJ. Flowcytometry analysis of mepacrine-labelled platelets in patients with end-stage renal failure. *Haemostasis* 23 (1993) 284-289
65. Gawaz M, Dobos G, Späth M, Mujais SK. Platelet membrane glycoprotein GPIIb/IIIa function is impaired in end-stage renal failure (ESRF). *J Am Soc Nephrol* 5 (1994) 36-46

66. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A, Schömig A. Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation* 96 (1997) 1809-1818
67. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schömig A, Brand K. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 98 (1998) 1164-1171
68. Gawaz M, Ruf A, Neumann FJ, Pogatsa-Murray G, Dickfeld T, Zohlhofer D, Schömig A. Effect of glycoprotein IIb-IIIa receptor antagonism on platelet membrane glycoproteins after coronary stent placement. *Thromb Haemost* 80 (1998) 994-1001
69. Gawaz M, Neumann FJ, Schömig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease, consequences for diagnosis and therapy. *Circulation* 99 (1999) e1-e11
70. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schömig A, Neumann FJ. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 148 (2000) 75-85
71. Gawaz M, Ruf A, Pogatsa-Murray G, Dickfeld T, Rüdiger S, Taubitz W, Fischer J, Müller I, Meier O, Patscheke H, Schömig A. Incomplete inhibition of platelet aggregation and glycoprotein IIb-IIIa receptor blockade by abciximab: importance of internal pool of glycoprotein IIb-IIIa receptors. *Thromb Haemost* 83 (2000) 915-922
72. Gawaz M (Herausgeber). *Blood platelets*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Auflage, 2001, 4-7, Abbildungen: S. 9-11, S. 19, S. 35, S. 50, S. 101
73. Gawaz M, Seyfarth M, Müller I, Rüdiger S, Pogatsa-Murray G, Wolf B, Schömig A. Comparison of effects of clopidogrel versus ticlopidine on platelet function in patients undergoing coronary stent placement. *Am J Cardiol* 87 (2001) 332-336, A9
74. Gimbrone M. Vascular endothelium: Nature's blood container. In: Gimbrone M, editor. *Vascular Endothelium in Hemostasis and Thrombosis*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1986, 1-21
75. Ginsberg MH, Frelinger AL, Lam SCT, Forsyth J, McMillian R, Plow EF, Shattil SJ. Analysis of platelet aggregation disorders based on flow cytometric analysis of membrane glycoprotein IIb-IIIa with conformation-specific monoklonal antibodies. *Blood* 76 (1990) 2017-2023

76. Ginsberg MH, Loftus JC. Platelet integrins. *Thromb Haemost.* 74 (1995) 352-359
77. Giugliano RP. Drug-induced thrombocytopenia: Is it a serious concern for glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors? *J Thromb Thrombolysis* 5 (1998) 191-202
78. Goodman S, Bigonzi F, Radley D, Le Louer V, Gosset F, Cohen M, for the ESSENCE Group. One-year follow-up of the ESSENCE trial (enoxaparin versus heparin in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction). *Eur Heart J* 50 (1998) Abstract P477
79. Harder S., Kirchmaier C., Krzywanek H.-J., Westrup D., Bae J.-W., Breddin H.K. Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Effects of a New Antibody Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitor (YM337) in Healthy Subjects. *Circulation* 100 (1999) 1175-1181
80. Harker LA, Bruno JJ. Ticlopidine mechanism of action on human platelets. *Aus: Hass K, Easton JD (Hrsg). Ticlopidine, Platelets and Vascular Disease. Springer Verlag, New York 1993, 99-116*
81. Hauptmann J, Stürzebecher J. Synthetic inhibitors of thrombin and factor Xa: from bench to bedside. *Thromb Res* 93 (1999) 203-241
82. Hawrylowicz CM, Howells GL, Feldmann M. Platelet-derived interleukin-1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production. *J Exp Med* 174 (1991) 785-790
83. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391 (1998) 591-594
84. Hennekens CH, Dyken ML, Fuster V. Aspirin as a therapeutic agent in cardiovascular disease. A statement from healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 96 (1997) 2751-2753
85. Herbert JM, Frehel D, Vellee E, Kieffer G, Gouy D, Berger Y, Necciari J, Defreyn G, Maffrand JP. Clopidogrel, a novel antiplatelet and antithrombotic agent. *Cardiovasc drug rev* 11 (1993) 180-198
86. Herrman AG. Rationale for the combination of anti-aggregating drugs. *Thrombosis Res* 92 (1998) S17-S21
87. Heyward SA, Dubois-Stringfellow N, Rapoport R, Bautch VL. Expression and inducibility of vascular adhesion receptors in development. *FASEB J* 9 (1995) 956-962
88. Hiller E, Riess H. *Hämorrhagische Diathese und Thrombose. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Deutschland, 2. Auflage (in Zusammenarbeit mit K. Auberger), 1998*

89. Honda S, Tomiyama Y, Aoki T, Shiraga M, Kurata Y, Seki J, Matsuzawa Y. Association between ligand-induced conformational changes of integrin α IIb β 3 and α IIb β 3-mediated intracellular Ca^{2+} signaling. *Blood* 92 (1998) 3675-3683
90. Hollopeter, G., H. M. Jantzen, D. Vincent, G. Li, L. England, V. Ramakrishnan, R. B. Yang, P. Nurden, A. Nurden, D. Julius and P. B. Conley (2001). "Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs." *Nature* **409**(6817): 202-207.
91. Jarvis B, Simpson K. Clopidogrel: a review of its use in the prevention of atherothrombosis. *Drugs* 60 (2000) 347-377
92. Kaku S, Umemura K, Mizuno A, Yano S, Suzuki K, Kawasaki T, Nakashima M. Evaluation of a GPIIb/IIIa receptor antagonism on platelet membrane glycoproteins after coronary stent placement. *Thromb Haemost* 80 (1998) 994-1001
93. Kalafatis M, Sword NA, Rand MD. Membrane dependent reactions in blood coagulation: role of vitamin k-dependent enzyme complexes. *Biochem.Biophys.Acta* 1227 (1994) 113-129
94. Kamm W., Raddatz P., Gante J., Kissel T. Prodrug approach for GPIIbIIIa – Peptidomimetic antagonists to enhance their transport in monolayers of human intestinal cell line (caco-2). *Pharmaceutical Res.* 16 (1999) 1527-1533
95. Kefalides NA. Biochemical aspects of the vessel wall. In: Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW, Herausgeber. *Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice.* JB Lippincott Co Verlag, Philadelphia, 2. Auflage, 1987, 247-263
96. Kestin AS, Ellis PA, Barnard MR, Errichetti A, Rosner BA, Michelson AD. The effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity. *Circulation* 88 (1993) 1502-1511
97. Keularts LW, Beguin S, deZwaan C, Hemker HC. Treatment with a GPIIb/IIIa antagonist inhibits thrombin generation in platelet rich plasma from patients. *Thromb Haemostasis* 80 (1998) 370-371
98. Kleimann NS, Raizner AE, Jordan R, Wang AL, Norton D, Mace KF, Joshi A, Coller BS, Weisman HF. Differential inhibition of platelet aggregation induced by adenosine diphosphate of a thrombin receptor-activating peptide in patients treated with bolus chimeric 7E3 Fab: implications for inhibition of the internal pool of GPIIb/IIIa receptors. *J Am Coll Cardiol* 26 (1995) 1665-1671
99. Kleiman NS. Pharmacology of the intravenous platelet receptor glycoprotein IIb/IIIa antagonists. *Coron Artery Dis* 9 (1998) 603-616

100. Klein W, Buchwald A, Hillis SE, Monrad S, Sanz G, Turpie G, van der Meer J, Olaisson E, Undeland S, Ludwig K. Comparison of low-molecular-weight heparin with unfractionated heparin acutely and with placebo for 6 weeks in the management of unstable coronary artery disease: Fragmin in unstable Coronary Artery Disease Study (FRIC). *Circulation* 96 (1997) 61-68
101. Koshelnick Y, Ehart M, Hugnagl P, Heinrich PC, Binder BR. Urokinase receptor is associated with the components of the JAK1/STAT1 signaling pathway and leads to activation of this pathway upon receptor clustering in hum kidney epithelial tumor cell line TCL-598. *J Biol Chem* 272 (1997) 28563-28567
102. Küttler T (Hrsg.). *Pharmakologie und Toxikologie*. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart, Deutschland, 17. Auflage, 1996, 162-164
103. Kulkarni, S., S. M. Dopheide, C. L. Yap, C. Ravanat, M. Freund, P. Mangin, K. A. Heel, A. Street, I. S. Harper, F. Lanza and S. P. Jackson (2000). "A revised model of platelet aggregation." *J Clin Invest* **105**(6): 783-791.
104. Kunapuli SP, Daniel JL. P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem J* 336 (1998) 513-523
105. Lam LH, Silbert JE, Rosenberg RD. The separation of active and inactive forms of heparin. *Biochem Biophys Res Commun* 69 (1976) 570-577
106. Landers SC, Gupta M, Lewis JC. Ultrastructural localization of tissue factor on monocyte-derived macrophages and macrophage foam cells associated with atherosclerotic lesions. *Virchows Arch.* 425 (1994) 49-54
107. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65 (1991) 859-873
108. Le Breton H, Plow EF, Topol EJ. Role of platelets in restenosis after percutaneous coronary revascularization. *J Am Coll Cardiol* 28 (1996) 1643-1651
109. Lefkowitz J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb-IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 332 (1995) 1553-1559
110. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, Gordon PC, Cutlip DE, Ho KK, Giambartolomei A, Diver DJ, Lasorda DM, Williams DO, Pocock SJ, Kuntz RE. A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators. *N Eng J Med* 339 (1998) 1665-1671
111. Lewis HD, Davis JW, Archibald DG, Steinke WE. Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. Results of a veterans administration cooperative study. *N Engl J Med* 309 (1983) 396-403

112. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J. Intern. Med.* 247 (2000) 349-358
113. Lincoff AM, Popma JJ, Ellis SG, Hacker JA, Topol EJ. Abrupt vessel closure complicating coronary angioplasty: clinical, angiographic and therapeutic profile. *J Am Coll Cardiol* 19 (1992) 926-935
114. Lincoff AM, Califf RM, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 35 (2000) 1103-1115
115. Lindahl U, Backstrom G, Thunberg L. The antithrombin-binding sequence in heparin: identification of an essential 6-O-sulfate group. *J Biol Chem* 25 (1983) 9825-9830
116. Llevadot J, Coulter SA, Giugliano RP. A practical approach to the diagnosis and management of thrombocytopenia associated with glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors. *J Thromb Thrombolysis* 9 (2000) 175-180
117. MacFarlane RG. An enzyme cascade in blood clotting mechanism and its function as a biological amplifier. *Nature* 202 (1964) 498
118. Mackie IJ, Neal CR. *The Platelet. Platelet-vessel wall interactions (The Bloomsbury series in clinical science)*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 1988, 1-32
119. Madan M, Berkowitz SD, Cheng JE. Glycoprotein GPIIb-IIIa integrin blockade. *Circulation* 98 (1998) 2629-2635
120. Makgoba MW, Sanders ME, Ginther Luce GE, Dustin ML, Springer TA, Clark EA, Mannoni P, Shaw S. ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B, T and myeloid cells. *Nature* 331 (1988) 86-88
121. Matzdorff AC, Kühnel G, Kemeks-Matthes B, Voss, R. Comparison of GP IIb/IIIa Inhibitors and Their Activity as Measured by Aggregometry, Flow Cytometry, Single Platelet Counting, and the Rapid Platelet Function Analyzer. *J Thrombosis Thrombolysis* 12 (2001) 129-139
122. McEver RP. Regulation of function and expression of P-selectin. *Agents Actions Suppl* 47 (1995) 117-119
123. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 87 (1996) 4925-4936
124. Michelson AD, Furman MI. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Curr Opin Hematol* 6 (1999) 342-348
125. Michelson AD, Barnard MR, Krueger La, Frelinger AL 3rd, Furman MI. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods* 21 (2000) 259-270

126. Mishkel GJ, Aguirre FV, Ligon RW, Rocha-Singh KJ, Lucore CL. Clopidogrel as adjunctive antiplatelet therapy during coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 34 (1999) 1884-1890
127. Morgenstern E, Ruf A, Patscheke H. Transport of anti-glykoprotein IIb/IIIa-antibodies into the alpha-granules of unstimulated human blood platelets. *Thromb Haemost* 67 (1992) 121-125
128. Morgenstern E. Platelets morphology/ultrastructure. In: Bruchhausen FV, Walter U, eds. *Platelets and their factors: Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer Verlag, Heidelberg, Germany, 1997, 27-52
129. Motz W. Die optimale Dosierung von Acetylsalicylsäure in der Therapie der koronaren Herzkrankheit. *Internist* 35 (1994) 1165-1170
130. Mousa SA, Bennett JS. Platelets in health and disease: Platelet GPIIb-IIIa structure and function : recent advances in antiplatelet therapy. *Drugs of the future* 21 (1996) 1141-1154
131. Müller C, Büttner HJ, Petersen J, Roskamm H. A randomized comparison of clopidogrel and aspirin versus ticlopidine and aspirin after the placement of coronary-artery stents. *Circulation* 101 (2000) 590-593
132. Müller I, Seyfarth M, Rüdiger S, Wolf B, Pogatsa-Murray G, Schömig A, Gawaz M. Effect of a high loading dose of clopidogrel on platelet function in patients undergoing coronary stent placement. *Heart* 85 (2001) 92-93
133. Nemerson Y., Bach R. Tissue factor revisited. *Prog.Hemost.Thromb.* 23 (1982) 657-668
134. Neumann FJ, Schömig A. Glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade with coronary stent placement. *Semin Interv Cardiol* 3 (1998) 81-90.
135. Neumann FJ, Hochholzer W, Pogatsa-Murray G, Schömig A, Gawaz M. Antiplatelet effects of abciximab, tirofiban and eptifibatide in patients undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 37 (2001) 1323-1328
136. Neumann FJ. Medikamentöse Therapie der instabilen Angina pectoris. *Internist* 43 (2002) 112-120
137. Nicholas RA, Nazarowski ER, Watt WC, Li Q, Boyer J, Harden TK. Pharmacological and second messenger signalling selectivities of cloned P2Y receptors. *J Auton Pharmacol* 16 (1996) 319-323
138. Nurden A, Macchi L, Bihour C, Durrieu C, Besse P, Nurden P. Markers of platelet activation in coronary hearts disease patients. *Eur J Clin Invest* 24 (1994) 42-45

139. Nurden A. Human platelet Glykoproteins. In: Bloom A, Forbes CD, Herausgeber. Haemostasis and Thrombosis. Churchill Livingstone Verlag, New York, Dritte Auflage, 1994, 115-165
140. Nurden A, Humbert M, Bilhour C. A specific ADP-dependent pathway of platelet activation that is inhibited by clopidogrel. *Pharmacol Res* 31 (suppl.) (1995) 291
141. Nurden AT, Poujol c, Nurden P. Different activation states of GP IIb/IIIa complexes in platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis* 10 (1999) S67-S70
142. Nurden AT. Inherited abnormalities of platelets. *Thromb Haemost* 82 (1999) 468-480
143. Nurden AT, Poujol C, Durrieu-Jais C, Nurden P. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: basic and clinical aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (1999) 2835-2840
144. Osterud B, Rapaport SJ. Activation of factor IX by reaction product of tissue factor and factor VII: Additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc.Natl.Acad.Sci* 74 (1977) 5260-5264
145. Pache J, Kastrati A, Mehilli J, Gawaz M, Neumann FJ, Seyfarth M, Hall D, Braun S, Dirschinger J, Schömig A. Clopidogrel therapy in patients undergoing coronary stenting: value of a high-loading-dose regimen. *Catheter Cardiovasc Interv* 55 (2002) 436-441
146. Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med* 330 (1994) 1287-1294
147. Peter KH, Schwarz M, Ylänne J, Kohler B, Moser M, Nordt T, Salbach P, Kübler W, Bode C. Induction of fibrinogen binding and platelet aggregation as a potential intrinsic property of various glycoprotein IIb/IIIa (α IIb β 3) inhibitors. *Blood* 92 (1998) 3240-3249
148. Peter KH, Straub A, Kohler B, Volkmann M, Schwarz M, Kubler W, Bode C. Platelet activation as a potential mechanism of GP IIb/IIIa inhibitor-induced thrombocytopenia. *Am J Cardiol* 84 (1999) 519-524
149. Peto, R., R. Gray, R. Collins, K. Wheatley, C. Hennekens, K. Jamrozik, C. Warlow, B. Hafner, E. Thompson, S. Norton (1988). "Randomised trial of prophylactic daily aspirin in British male doctors." *Br Med J (Clin Res Ed)* **296**(6618): 313-316.
150. Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 65 (1991) 359-362
151. Plow EF, D'Souza SE, Ginsberg MH. Ligand binding to GPIIb-IIIa: a status report. *Semin Thromb Memost.* 18 (1992) 324-332
152. Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 70 (1990) 427-451
153. Preissner KT, Kanse SM, May AE. Urokinase Receptor: A molecular organizer in cellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 12 (2000) 621-628

154. Rai R, Sprengeler PA, Elrod KC, Young WB. Perspectives on factor Xa inhibition. *Curr Med Chem* 8 (2001) 101-119
155. Ranke C, Hecker H, Creutzig A, Alexander K. Dose-dependent effect of aspirin on carotid atherosclerosis. *Circulation* 87 (1993) 1873-1879
156. Rapaport SJ. Regulation of tissue factor pathway. *Ann.NY.Acad.SCI.* 614 (1991) 51-62
157. Reverter JC, Beguin S, Kessels H, Kumar R, Hemker HC, Coller BS. Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. *J Clin Invest* 98 (1996) 863-874
158. Rivers RPA, Cattermole HEJ, Wright I. The expression of surface tissue-factor apoprotein by blood monocytes in course of infections in early infancy. *Pediatr. Res.* 31 (1992) 567-573
159. Rosenberg RD, Damu PS. The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem* 248 (1973) 6490-6505
160. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. *Nature* 362 (1993) 801-809
161. Rossi F, Rossi E, Pareti FI, Colli S, Tremoli E, Gallo L. In vitro measurement of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade by abciximab: interindividual variation and increased platelet secretion. *Haematologica* 86 (2001) 192-198
162. Ruggeri ZM. New insights into mechanisms of platelet adhesion and aggregation. *Sem Hematol* 31 (1994) 229-239
163. Savi, P., J. Combalbert, C. Gaich, M. C. Rouchon, J. P. Maffrand, Y. Berger and J. M. Herbert (1994). "The antiaggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation by the hepatic cytochrome P450-1A." *Thromb Haemost* **72**(2): 313-317
164. Scarborough RM, Naughton MA, Teng W, Rose JW, Phillips DR, Nannizzi L, Arfsten A, Campbell AM, Charo IF. Design of potent and specific integrin antagonists. Peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa. *J Biol Chem* 268 (1993) 1066-1073
165. Scharf RE, Tomer A, Marzec UM, Teirstein PS, Ruggeri ZM, Harker LA. Activation of platelets in blood perfusing angioplasty-damaged coronary arteries. Flow cytometric detection. *Arterioscler Thromb* 12 (1992) 1475-1487
166. Schneider DJ, Taatjes DJ, Sobel BE. Paradoxical inhibition of fibrinogen binding and potentiation of alpha-granule release by specific types of inhibitors of glycoprotein IIb-IIIa. *Cardiovasc Res* 45 (2000) 437-446

167. Schömig A, Kastrati A, Dirschinger J, Mehili J, Schricke U, Pache J, Martinoff S, Neumann FJ, Schwaiger M. Coronary stenting plus platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade compared with tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. Stent versus Thrombolysis for Occluded Coronary Arteries in Patients with Acute Myocardial Infarction Study Investigators. *N Engl J Med* 334 (1996) 1084-1089
168. Schömig A, Kastrati A, Dirschinger J, Mehili J, Schricke U, Pache J, Martinoff S, Neumann FJ, Schwaiger M. Coronary stenting plus platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade compared with tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. Stent versus Thrombolysis for Occluded Coronary Arteries in Patients with Acute Myocardial Infarction Study Investigators. *N Engl J Med* 343 (2000) 385-391
169. Schrör K. Thrombozyten. (Physis Spezial; 67). Verlag Urban und Vogel, München, 1993
170. Schrör K. The effect of prostaglandins and thromboxane A₂ on coronary vessel tone – mechanisms of action and therapeutic implications. *Eur Heart J* 14 Suppl I (1993) 34-41
171. Schrör K. Antiplatelet drugs. A comparative review. *Drugs* 50 (1995) 7-28
172. Schrör K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Semin Thromb Hemost* 23 (1997) 349-356
173. Schrör K (Hrsg.). Abciximab – Erstes klinisch eingeführtes Antiintegrin zur Hemmung der Thrombozytenaggregation. Dr.Schrör Verlag, Frechen, 2000
174. Schrör K. Ticlopidine and clopidogrel. In: Antiplatelet Therapy in Clinical Practice. Ferguson JJ, Chronos NAF, Harrington RA (Herausgeber), Martin Dunitz Verlag, London, 3. Auflage, 2000, 93-111
175. Schrör K (Hrsg.). Antithrombotische Pharmaka. Dr. Schrör Verlag, Frechen, 2002, Abbildung: S. 6
176. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 70 (1987) 307-312
177. Shattil SJ. Function and regulation of the β_3 integrins in hemostasis and vascular biology. *Thromb Haemost* 74 (1995) 149-155
178. Shoji M, Abe K, Nawroth PP, Rickles FR. Molecular mechanism linking thrombosis and angiogenesis in cancer. *Trends Cardiovasc.med.* 7 (1997) 52-59
179. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 69 (1989) 50-178
180. Simon DI, Xu H, Ortlepp S, Rogers C, Rao NK. 7E3 monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa cross reacts with the leukocyte integrin Mac-1

- and blocks adhesion to fibrinogen and ICAM-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (1997) 528-535
181. Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane: studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J Biol Chem.* 264 (1989) 17049-17057
 182. Soslaw, G., L. Arabe, J. Parker and A. Pelleg (1993). "Aggregation of human and canine platelets: modulation by purine nucleotides." *Thromb Res* 72(2): 127-137
 183. Sixma JJ. Interaction of blood platelets with the vessel wall. In: Bloom A, Forbes CD, Herausgeber. *Haemostasis and Thrombosis*. Churchill Livingstone Verlag, New York, 3. Auflage, 1994, 259-285
 184. SoRelle, R. Stents are the CADILLAC of care. Controlled Abciximab and Device Investigations to Lower Late Angioplasty Complications. *Circulation* 105 (2002) e9094-e9095
 185. Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* 52 (1988) 925-933
 186. Steinhubl SR. Assessing the optimal level of platelet inhibition with GP IIb/IIIa inhibitors in patients undergoing coronary intervention. Rationale and design of the GOLD Study. *J Thrombosis Thrombolysis* 9 (2000) 199-205
 187. Swahn E, Wallentin L, for the FRISC Study Group. Low-molecular-weight heparin (Fragmin) during instability in coronary artery disease (FRISC). *Am J Cardiol* 80 (Suppl 5 A) (1997) 25E-29E
 188. Talley JD. Pathogenesis of acute ischemic coronary syndromes. *J Intervent Cardiol* 11 (1998) 427-435
 189. Tam SH, Sassoli PM, Jordan RE, Nakada MT. Abciximab (ReoPro, chimeric 7E3 Fab) demonstrates equivalent affinity and functional blockade of glycoprotein IIb/IIIa and alpha(v)beta3 integrins. *Circulation* 98 (1998) 1085-1091
 190. Taubman, M. B., J. T. Fallon, A. D. Schechter, P. Giesen, M. Mendlowitz, B. S. Fyfe, J. D. Marmur and Y. Nemerson (1997). "Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis." *Thromb Haemost* 78(1): 200-204

191. Taub R, Gould RJ, Garsky VM, Ciccarone TM, Hoxie J, Friedman PA, Shattil SJ. A monoclonal antibody against the platelet fibrinogen receptor contains a sequence that mimics a receptor recognition domain of fibrinogen. *J Biol Chem* 264 (1989) 259-265
192. Tcheng, J. E., S. G. Ellis, B. S. George, D. J. Kereiakes, N. S. Kleiman, J. D. Talley, A. L. Wang, H. F. Weisman, R. M. Califf and E. J. Topol (1994). "Pharmacodynamics of chimeric glycoprotein IIb/IIIa integrin antiplatelet antibody Fab 7E3 in high-risk coronary angioplasty." *Circulation* **90**(4): 1757-1764
193. The CAPRIE Steering Committee. A randomized, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 348 (1996) 1329-1339
194. The CAPTURE Investigators. Randomized placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina: The CAPTURE study. *Lancet* 349 (1997) 1429-1435
195. The CURE committee. The Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events (CURE) trial programme. Rationale, design and baseline characteristics including a meta-analysis of the effects of thienopyridines in vascular disease. *Eur Heart J* 21 (2000) 2033-2041
196. The EPIC Investigators. Use of monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. *N Engl J Med* 330 (1994) 956-961
197. The EPILOG Investigators. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low dose heparin during percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med* 336 (1997) 1689-1698
198. The EPISTENT Investigators. Randomised placebo-controlled and balloon-angioplasty-controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein-IIb/IIIa blockade. *Lancet* 352 (1998) 87-92
199. The IMPACT-AMI-Investigators. Combined accelerated tissue-plasminogen activator and platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin receptor blockade with Integrelin in acute myocardial infarction. Results of a randomized, placebo-controlled, dose-ranging trial (IMPACT-AMI). *Circulation* 1997; 95: 846-854
200. The PARADIGM-Investigators. Combining thrombolysis with the platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitor lamifiban: results of the Platelet Aggregation Receptor Antagonist Dose Investigation and Reperfusion Gain in Myocardial Infarction (PARADIGM) trial. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 2003-2010

201. The PRISM Investigators. A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. *N Engl J Med* 338 (1998) 1498-1505
202. The PRISM-PLUS Investigators. Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non Q-wave myocardial infarction. *N Engl J Med* 338 (1998) 1488-1497
203. The RAPPORT Investigators. Randomized, placebo-controlled trial of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation* 98 (1998) 734-741
204. The RESTORE Investigators. Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty. *Circulation* 96 (1997) 1445-1453
205. The RISC Group. Risk of myocardial infarction and death during treatment with low dose aspirin and intravenous heparin in men with unstable coronary artery disease. *Lancet* 336 (1990) 827-830
206. Theroux, P., H. Ouimet, J. McCans, J. G. Latour, P. Joly, G. Levy, E. Pelletier, M. Juneau, J. Stasiak, P. deGuise (1988). "Aspirin, heparin, or both to treat acute unstable angina." *N Engl J Med* **319**(17): 1105-1111
207. Theroux P, Fuster V. Acute coronary syndroms. Unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *Circulation* 97 (1998) 1195-1206
208. The TARGET Investigators. Topol EJ, Moliterno DJ, Herrmann HC, Powers ER, Grines CL, Cohen DJ, Cohen EA, Bertrand M, Neumann FJ, Stone GW, Dibattiste PM, Demopoulos L. Comparison of two platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors, tirofiban and abciximab, for the prevention of ischemic events with percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med* 344 (2001) 1888-1894
209. Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists in coronary artery disease. *Eur Heart J* 17 (1996) 9-18
210. Topol EJ. Toward a new frontier in myocardial reperfusion therapy: emerging platelet preeminence. *Circulation* 97 (1998) 211-218
211. Topol EJ, Mark DB, Lincoff AM, Cohen E, Burton J, Kleiman N, Talley D, Sapp S, Booth J, Cabot CF, Anderson KM, Califf RM. Outcomes at 1 year and economic implications of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade in patients undergoing coronary stenting: results from a multicentre randomised trial. EPISTENT Investigators. Evaluation of Platelet IIb/IIIa Inhibitor for Stenting. *Lancet* 354 (1999) 2019-2024

212. Ueda A, Okuda K, Ohno S, Shirai A, Iarashi T, Matsunaga K, Fukushima J, Kawamoto S, Ishigatsubo Y, Okubo T. NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J Immunol* 153 (1994) 2052-2063
213. Urban P, Macaya C, Rupprecht HJ, Kiemeneij F, Emanuelsson H, Fontanelli A, Pieper M, Wesseling T, Sagnard L. Randomized evaluation of anticoagulation versus antiplatelet therapy after coronary stent implantation in high-risk patients. The MATTIS-Trial. *Circulation* 98 (1998) 2126-2132
214. Valente AJ, Rozek MM, Sprague EA, Schwartz CJ. Mechanisms in intimal monocyte-macrophage recruitment. A special role for monocyte chemotactic protein-1. *Circulation* 86 (1992) III20-III25
215. Vidhun R, Feldman D, Stoyanov MY, Badimon JJ, Ambrose JA. Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition with abciximab on thrombin generation and activity during percutaneous coronary intervention *Am Heart J* 138 (1999) 49-54
216. Wallentin L, Ohlsson J, Swahn E. Low-molecular-weight-heparin during instability in coronary artery disease. *Lancet* 347 (1996) 561-567
217. Warkentin TE, Powling MJ, Hardisty RM. Measurement of fibrinogen binding to platelets in whole blood by flow cytometry: a micromethod for the detection of platelet activation. *Br J Haematol* 76 (1990) 387-394
218. Weber A-A, Schrör K. Differential inhibition of adenosine diphosphate – versus thrombin receptor-activating peptide-stimulated platelet fibrinogen binding by abciximab due to different glycoprotein IIb/IIIa activation kinetics. *Blood* 98 (2001) 1619-1621
219. Wencel-Drake JD, Plow EF, Kunicki TJ, Woods VL, Keller DM, Ginsberg MH. Localization of internal pools of membrane glykoproteins involved in platelet adhesive responses. *Am J Pathol* 124 (1986) 324-334
220. Wertheimer SJ, Myers CL, Wallace RW, parks TP. Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. Differential regulation by tumor necrosis factor-alpha and phorbol myristate acetate. *J Biol Chem* 267 (1992) 12030-12035
221. White JG. Platelets and atherosclerosis. *Eur J Clin Invest* 24 (1994) Suppl. 1: 25-29
222. White JG. Unstable angina. In: *Textbook of cardiovascular medicine*. Topol EJ (Herausgeber), Lippincott-Raven Verlag, Philadelphia, 2. Auflage, 1998, 365-393
223. Willerson JT, Golino P, Eidt J, Campbell WB, Buja M. Specific platelet mediators and unstable coronary artery lesions: Experimental evidence and potential clinical implications. *Circulation* 80 (1989) 198-205

224. Wittkowsky AK. The role of thrombin inhibition during percutaneous coronary intervention. *Pharmacotherapy* 22 (2002) 97S-104S
225. Woods VL, Wolff LE, Keller DM. Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins. *J Biol Chem* 261 (1986) 15242-15251
226. Xiao Z, Theroux P. Platelet activation with unfractionated heparin at therapeutic concentrations and comparisons with a low-molecular-weight heparin and with a direct thrombin inhibitor. *Circulation* 97 (1998) 251-256
227. Zaman AG, Herlft G, Worthley SG, Badimon JJ. The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 149 (2000) 251-266
228. Aradi, D., A. Tornyos, T. Pinter, A. Vorobcsuk, A. Konyi, J. Falukozy, G. Veress, B. Magyari, I. G. Horvath and A. Komocsi (2014). "Optimizing P2Y12 receptor inhibition in patients with acute coronary syndrome on the basis of platelet function testing: impact of prasugrel and high-dose clopidogrel." *J Am Coll Cardiol* **63**(11): 1061-1070.
229. Campo, G., M. Tebaldi, P. Vranckx, S. Biscaglia, C. Tumscitz, R. Ferrari and M. Valgimigli (2014). "Short- versus long-term duration of dual antiplatelet therapy in patients treated for in-stent restenosis: a PRODIGY trial substudy (Prolonging Dual Antiplatelet Treatment After Grading Stent-Induced Intimal Hyperplasia)." *J Am Coll Cardiol* **63**(6): 506-512.
230. Connolly, S. J., J. Eikelboom, C. Joyner, H. C. Diener, R. Hart, S. Golitsyn, G. Flaker, A. Avezum, S. H. Hohnloser, R. Diaz, M. Talajic, J. Zhu, P. Pais, A. Budaj, A. Parkhomenko, P. Jansky, P. Commerford, R. S. Tan, K. H. Sim, B. S. Lewis, W. Van Mieghem, G. Y. Lip, J. H. Kim, F. Lanas-Zanetti, A. Gonzalez-Hermosillo, A. L. Dans, M. Munawar, M. O'Donnell, J. Lawrence, G. Lewis, R. Afzal, S. Yusuf, A. S. Committee and Investigators (2011). "Apixaban in patients with atrial fibrillation." *N Engl J Med* **364**(9): 806-817.
231. Connolly, S. J., M. D. Ezekowitz, S. Yusuf, J. Eikelboom, J. Oldgren, A. Parekh, J. Pogue, P. A. Reilly, E. Themeles, J. Varrone, S. Wang, M. Alings, D. Xavier, J. Zhu, R. Diaz, B. S. Lewis, H. Darius, H. C. Diener, C. D. Joyner, L. Wallentin, R.-L. S. Committee and Investigators (2009). "Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation." *N Engl J Med* **361**(12): 1139-1151.
232. Easton, J. D., R. D. Lopes, M. C. Bahit, D. M. Wojdyla, C. B. Granger, L. Wallentin, M. Alings, S. Goto, B. S. Lewis, M. Rosenqvist, M. Hanna, P. Mohan, J. H. Alexander, H. C. Diener, A. Committees and Investigators (2012). "Apixaban compared with warfarin in

- patients with atrial fibrillation and previous stroke or transient ischaemic attack: a subgroup analysis of the ARISTOTLE trial." *Lancet Neurol* **11**(6): 503-511.
233. Genereux, P., G. W. Stone, R. A. Harrington, C. M. Gibson, P. G. Steg, S. J. Brener, D. J. Angiolillo, M. J. Price, J. Prats, L. Lasalle, T. Liu, M. Todd, S. Skerjanec, C. W. Hamm, K. W. Mahaffey, H. D. White, D. L. Bhatt and C. P. Investigators (2014). "Impact of intraprocedural stent thrombosis during percutaneous coronary intervention: insights from the CHAMPION PHOENIX Trial (Clinical Trial Comparing Cangrelor to Clopidogrel Standard of Care Therapy in Subjects Who Require Percutaneous Coronary Intervention)." *J Am Coll Cardiol* **63**(7): 619-629.
234. Giugliano, R. P. and E. Braunwald (2014). "The year in acute coronary syndrome." *J Am Coll Cardiol* **63**(3): 201-214.
235. Giugliano, R. P., C. T. Ruff, E. Braunwald, S. A. Murphy, S. D. Wiviott, J. L. Halperin, A. L. Waldo, M. D. Ezekowitz, J. I. Weitz, J. Spinar, W. Ruzyllo, M. Ruda, Y. Koretsune, J. Betcher, M. Shi, L. T. Grip, S. P. Patel, I. Patel, J. J. Hanyok, M. Mercuri, E. M. Antman and E. A.-T. Investigators (2013). "Edoxaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation." *N Engl J Med* **369**(22): 2093-2104
236. Granger, C. B., J. H. Alexander, J. J. McMurray, R. D. Lopes, E. M. Hylek, M. Hanna, H. R. Al-Khalidi, J. Ansell, D. Atar, A. Avezum, M. C. Bahit, R. Diaz, J. D. Easton, J. A. Ezekowitz, G. Flaker, D. Garcia, M. Geraldles, B. J. Gersh, S. Golitsyn, S. Goto, A. G. Hermosillo, S. H. Hohnloser, J. Horowitz, P. Mohan, P. Jansky, B. S. Lewis, J. L. Lopez-Sendon, P. Pais, A. Parkhomenko, F. W. Verheugt, J. Zhu, L. Wallentin, A. Committees and Investigators (2011). "Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation." *N Engl J Med* **365**(11): 981-992
237. Hankey, G. J., M. R. Patel, S. R. Stevens, R. C. Becker, G. Breithardt, A. Carolei, H. C. Diener, G. A. Donnan, J. L. Halperin, K. W. Mahaffey, J. L. Mas, A. Massaro, B. Norrving, C. C. Nessel, J. F. Paolini, R. O. Roine, D. E. Singer, L. Wong, R. M. Califf, K. A. Fox, W. Hacke and R. A. S. C. Investigators (2012). "Rivaroxaban compared with warfarin in patients with atrial fibrillation and previous stroke or transient ischaemic attack: a subgroup analysis of ROCKET AF." *Lancet Neurol* **11**(4): 315-322
238. Mahaffey, K. W., C. Held, D. M. Wojdyla, S. K. James, H. A. Katus, S. Husted, P. G. Steg, C. P. Cannon, R. C. Becker, R. F. Storey, N. S. Khurmi, J. C. Nicolau, C. M. Yu, D. Ardissino, A. Budaj, J. Morais, D. Montgomery, A. Himmelmann, R. A. Harrington, L. Wallentin and P. Investigators (2014). "Ticagrelor Effects on Myocardial Infarction and

- the Impact of Event Adjudication in the PLATO (Platelet Inhibition and Patient Outcomes) Trial." *J Am Coll Cardiol* **63**(15): 1493-1499
239. Mehta, S. R. (2013). "Cangrelor: a new CHAMPION for percutaneous coronary intervention." *Lancet* **382**(9909): 1960-1962
240. Nazif, T. M., R. Mehran, E. A. Lee, M. Fahy, H. Parise, G. W. Stone and A. J. Kirtane (2014). "Comparative effectiveness of upstream glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in patients with moderate- and high-risk acute coronary syndromes: an Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage Strategy (ACUITY) substudy." *Am Heart J* **167**(1): 43-50
241. Ndrepepa, G., F. J. Neumann, E. N. Deliargyris, R. Mehran, J. Mehilli, M. Ferenc, S. Schulz, A. Schomig, A. Kastrati and G. W. Stone (2012). "Bivalirudin versus heparin plus a glycoprotein IIb/IIIa inhibitor in patients with non-ST-segment elevation myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention after clopidogrel pretreatment: pooled analysis from the ACUITY and ISAR-REACT 4 trials." *Circ Cardiovasc Interv* **5**(5): 705-712
242. Patel, M. R., K. W. Mahaffey, J. Garg, G. Pan, D. E. Singer, W. Hacke, G. Breithardt, J. L. Halperin, G. J. Hankey, J. P. Piccini, R. C. Becker, C. C. Nessel, J. F. Paolini, S. D. Berkowitz, K. A. Fox, R. M. Califf and R. A. Investigators (2011). "Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation." *N Engl J Med* **365**(10): 883-891
243. Pride, Y. B., S. D. Wiviott, J. L. Buros, C. Zorkun, M. U. Tariq, E. M. Antman, E. Braunwald, C. M. Gibson and T. S. Group (2009). "Effect of prasugrel versus clopidogrel on outcomes among patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention without stent implantation: a TRial to assess Improvement in Therapeutic Outcomes by optimizing platelet inhibition with prasugrel (TRITON)-Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 38 substudy." *Am Heart J* **158**(3): e21-26
244. Steg, P. G., R. A. Harrington, H. Emanuelsson, H. A. Katus, K. W. Mahaffey, B. Meier, R. F. Storey, D. M. Wojdyla, B. S. Lewis, G. Maurer, L. Wallentin, S. K. James and P. S. Group (2013). "Stent thrombosis with ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes: an analysis from the prospective, randomized PLATO trial." *Circulation* **128**(10): 1055-1065
245. Steg, P. G., S. K. James and B. J. Gersh (2013). "2012 ESC STEMI guidelines and reperfusion therapy: Evidence-based recommendations, ensuring optimal patient management." *Heart* **99**(16): 1156-1157
246. Task Force on the management of, S. T. s. e. a. m. i. o. t. E. S. o. C., P. G. Steg, S. K. James, D. Atar, L. P. Badano, C. Blomstrom-Lundqvist, M. A. Borger, C. Di Mario, K.

- Dickstein, G. Ducrocq, F. Fernandez-Aviles, A. H. Gershlick, P. Giannuzzi, S. Halvorsen, K. Huber, P. Juni, A. Kastrati, J. Knuuti, M. J. Lenzen, K. W. Mahaffey, M. Valgimigli, A. van 't Hof, P. Widimsky and D. Zahger (2012). "ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation." *Eur Heart J* **33**(20): 2569-2619
247. Tricoci, P., Z. Huang, C. Held, D. J. Moliterno, P. W. Armstrong, F. Van de Werf, H. D. White, P. E. Aylward, L. Wallentin, E. Chen, Y. Lokhnygina, J. Pei, S. Leonardi, T. L. Rorick, A. M. Kilian, L. H. Jennings, G. Ambrosio, C. Bode, A. Cequier, J. H. Cornel, R. Diaz, A. Erkan, K. Huber, M. P. Hudson, L. Jiang, J. W. Jukema, B. S. Lewis, A. M. Lincoff, G. Montalescot, J. C. Nicolau, H. Ogawa, M. Pfisterer, J. C. Prieto, W. Ruzyllo, P. R. Sinnaeve, R. F. Storey, M. Valgimigli, D. J. Whellan, P. Widimsky, J. Strony, R. A. Harrington, K. W. Mahaffey and T. Investigators (2012). "Thrombin-receptor antagonist vorapaxar in acute coronary syndromes." *N Engl J Med* **366**(1): 20-33
248. Whellan, D. J., P. Tricoci, E. Chen, Z. Huang, D. Leibowitz, P. Vranckx, G. D. Marhefka, C. Held, J. C. Nicolau, R. F. Storey, W. Ruzyllo, K. Huber, P. Sinnaeve, A. T. Weiss, J. P. Dery, D. J. Moliterno, F. Van de Werf, P. E. Aylward, H. D. White, P. W. Armstrong, L. Wallentin, J. Strony, R. A. Harrington and K. W. Mahaffey (2014). "Vorapaxar in acute coronary syndrome patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: subgroup analysis from the TRACER trial (Thrombin Receptor Antagonist for Clinical Event Reduction in Acute Coronary Syndrome)." *J Am Coll Cardiol* **63**(11): 1048-1057.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 16. August 1971
Geburtsort: Bad Oeynhausen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

SCHULBILDUNG

1978-1982 **Grundschule** in Bad Oeynhausen
1982-1992 **Immanuel-Kant-Gymnasium** in Bad Oeynhausen

STUDIUM

1994-2001 **Ludwig-Maximilians-Universität München – Medizinische Fakultät**

Prakt. Jahr: • 8/00-2/01: Innere Medizin (Inverness – Schottland /
Medizinische Klinik III Großhadern)
• 2/01-5/01: Neurologie (Neurologische Klinik Großhadern)
• 5/01-9/01: Chirurgie (Krankenhaus Schwabing)

PUBLIKATIONEN

Dickfeld et al., Differential Antiplatelet Effects of Various Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists, *Thrombosis Research*, 101 (2001) 53 – 64

BERUFSERFAHRUNG

1992-1993 Zivildienst als Pflegehelfer bei den Johanniter-Ordenshäusern,
Bad Oeynhausen
1993-1998 Pflegehelfer bei den Johanniter-Ordenshäusern, Bad Oeynhausen
1998-2000 Pflegehelfer im Krankenhaus München Bogenhausen

BERUFSWERDEGANG

ARZT IM PRAKTIKUM

Dezember 2001 – Juni 2003 in der Neurologischen Abteilung des
Klinikum München Harlaching (Prof.Dr.med.R.Haberl)

APPROBATION ALS ARZT Juni 2003

ASSISTENZARZT

Juni 2003 – September 2009 in der Neurologischen Abteilung des
Klinikum München Harlaching (Prof.Dr.med.R.Haberl)

FACHARZT FÜR NEUROLOGIE Mai 2009

OBERARZT

Seit Juli 2009 in der Neurologischen Abteilung des
Klinikum München Harlaching (Prof.Dr.med.R.Haberl)

Danksagung

Zuerst gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Professor Dr.med. Meinrad Gawaz für die Bereitstellung und Planung der Doktorarbeit. Seine freundliche und kollegiale Führung und Fachkompetenz waren richtungsweisend für den Verlauf der Arbeit und dem Spaß an der experimentellen Forschung und für meinen persönlichen Berufsweggang.

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof.Dr.med. Steffen Massberg für die Übernahme meiner Doktorarbeit und für die kollegiale Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich bei meiner Frau Sandra Meier für die große Unterstützung in der Realisierung dieser Doktorarbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr.med. Bernd Engelmann und seinem Team, vorallem Frau Susanne Zieseniss, die mir geduldsam die Methodik der Thrombingeneration und der ELISA-Technik vermittelte.

Einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatten Frau Kirsten Langenbrink, Frau Antje Wallmuth, Frau Christiane Donick, Frau Gisela Pogatsa-Murray im Labor für experimentelle Kardiologie des Deutschen Herzzentrums. Für Ihre freundliche Betreuung und Mitarbeit möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Weiterhin möchte ich meinen Mitdoktoranten Philipp Thomas, Winfried Taubitz, Beate Wolf und Willibald Hochholzer und meiner Mutter für Ihre volle Unterstützung und deren Mithilfe am Gelingen dieser Arbeit herzlich danken.

Anhang

Herstellung der Lösungen / Plättchenabhängige Thrombin-Messung:

Chromogen S-2238:

1 Ampulle Chromogen S-2238
+ 13,8 ml Aqua dest. = Stammlösung

1 ml Stammlösung
+ 4,8 ml Tris-Puffer pH 8,1
= fertiges Chromogen

Tris-Puffer (pH 8,1):

12,1 g Trizma-Base (Fa. Sigma-Aldrich) in 100 ml Aqua dest. auflösen

Mit rauchender 37 prozentiger Salzsäure am pH-Meter auf pH 8,1 einstellen

Tyrodes Puffer (pH 7,4):

0,2 g BSA (Bovines Serum Albumin, Fa. Sigma-Aldrich)
+ 0,2 g Glukose
+ 20 ml Tyrodes 10x
+ 180 ml Aqua dest.

Mit Hepes (Fa. Sigma-Aldrich) am pH-Meter auf pH 7,4 einstellen

Tyrodes 10x:

80 g NaCl
+ 10,15 ml NaHCO₃
+ 1,95 ml KCl
+ 1000 ml Aqua dest.

Photometer / Plättchenabhängige Thrombin-Messung:

MODULE:	KINETICS		
TEST WAVELENGTH:	405 nm		
REF. WAVELENGTH:	630 nm		
PLATE ID PROMPT:	NO		
SHAKE TIME:	5 Seconds		
DISPLAY WELL:	S6		
START MODE:	IMMEDIATELY		
TOTAL TIME OF KINETIC:	00:19.30		
TIME INTERVAL:	30 Secs.		
NUMBER OF READINGS:	40		
CALCULATION MODE:	BEST O.D./min		
O.D.'s:	INCREASING		
SCALE FACTOR:	NONE		
RESULTS LOG:	NO		
REPORT FORMAT:	mOD		
O.D. EDIT OPTION:	YES		
CONCENTRATIONS:			
STD. 1	=	31.250	mU/ml
STD. 2	=	62.500	mU/ml
STD. 3	=	125.000	mU/ml
STD. 4	=	250.000	mU/ml
STD. 5	=	500.000	mU/ml
STD. 6	=	1000.000	mU/ml
CURVE FIT TYPE	=	LINEAR POWER FIT WITH TAILS	
		Y = a+bX	
		LOG-LOG AXIS FITTING	
CURVE FIT QUALITY CONTROL : NO			
mO.D./min MATRIX : YES			
THRESHOLD MATRIX : NO			

Thrombin-Messung mit S-2238

1. Vorbereitung der 96-well Platten mit Multichannel-Pipette(**90µl Natrium-citrat 3,8**)
2. Herstellung des Chromogens (**4,8ml Tris-Puffer pH 8,1 + 1ml Chromogen S-2238** Ausgangslsg.)
3. Auftauen von Thrombin oder Tissue-Factor und Bereitstellung der Antagonisten
4. Herausnahme von CaCl₂
5. Vorbereitung des Koagulometers mit Teströhren mit Stahlkugel und aufwärmen.
6. Eine 20ml Spritze mit 2 Tuben vom CPDA aufziehen und Blutabnahme (langsam und ohne Luft)
7. Umfüllen des Blutes in die leeren CPDA-Röhrchen und bei **1000U/min. 10 min.** zentrifugieren
8. Danach abpipettieren des PRP und umfüllen in ein Falcon
9. Leicht schwenken zum Mischen und Zellzahl bestimmen (Eppi mit 50µl PRP messen)
10. Berechnung der Zellzahl auf **300.000/ml** (mit PBS verdünnen je nach Rechnung)
11. Einfüllen von jeweils **300µl PRP** in ein Teströhrchen
12. Hinzugabe von **Tyrodes-Puffer pH 7,4** , von den Antagonisten, Thrombin oder Tissue-Factor
13. Nach Hinzugabe 0-min.-Wert abnehmen (**pro Zeitintervall drei Wells mit je 10µl PRP-Lsg. füllen**)
14. Negativ-Kontrolle: 300µl PRP + 200µl Tyrodes-Puffer pH 7,4
15. Positiv-Kontrolle: 300µl PRP + 140µl Tyrodes + 60µl Thrombin oder Tissue-Factor
16. Testprobe: 300µl PRP + 90µl Tyrodes + 60µl Thrombin oder TF + 50µl Antagonist
17. Nach Abnahme des 0 min.-Werts **je 20µl CaCl₂ als Startreaktion** des Clottens dazugeben
18. Start des Koagulometers und Ablesen der Clottzeit
19. Jeweils im Zeitintervall (**0min, 20min, 30min, 40min, 50min, 60min**) 10µl einer Probe in ein Well füllen (3 – fach Bestimmungen)
20. Zwischen den Abnahmen die Standardkurve vorbereiten
21. 5 Eppis mit je 500µl Tyrodes füllen, ein Thrombineppi (50µl Thrombinlsg) mit 950µl Tyrodes füllen
22. Gut durchvortexen nach jedem Umfüllen (Verdünnungsreihe anfertigen 500µl abnehmen und umfüllen
23. In ein neues 500µl Eppi (nun 1000µl) vortexen , 500µl abnehmen usw.
24. In die dafür vorgesehenen Wells nun je 10µl Standardkurvenlsg. hinzugeben (auf Reihenfolge achten)
25. Danach mit Multichannel-Pipette auf alle Wells **je 50µl Chromogen** geben
26. Unmittelbar danach Wellplatte in den Reader geben und kinetisches **Programm** starten.
27. Nach etwa 19min. erscheint im Display eine Anzeige – auf **All-Wells** drücken
28. Nach Druckvorgang auf **Finish** gehen. Ein paar Minuten vergehen bis zum nächsten Druckvorgang
29. Ausdruck der **mO.D.-Werte** und der Standardkurve (Frage Graph yes oder no)
30. **Bei r = 0.950** oder höher auf yes drücken , bei geringern Werten auf No und Edit Yes
31. Auf dem Ausdruck falsche Werte ausfindig machen und löschen
32. Danach Druck einer neuen Kurve , **falls r > 0,950 auf Graph yes**
33. Jetzt kommt der Ausdruck der berechneten Thrombinkonzentrationen pro Well
34. Wellplatte entfernen und Geräte ausstellen.

	ADP 5 μ M	ADP 20 μ M	TRAP 20 μ M
Ohne Antagonist	80,6	92,5	95,6
C7E3	0	0	21,9
EMD	0	0	11,3
YM337	0	0	42,5
Lamifiban	0	0	14,4
Tirofiban	0	0	26,3
Integrelin	0	0	13,8

Werteangaben in Prozent (%)

Tabelle 3: Aggregation unter ADP-Rezeptorblockade mit Gamma S-ATP

	ADP 5 μ M	ADP 20 μ M	TRAP 20 μ M
Ohne Antagonist	82,0	86,9	92,5
Gamma S-ATP	26,0	30,0	94,0

Werteangaben in Prozent (%)

Tabelle 4: Aggregation unter ADP-Rezeptorblockade mit Apyrase

	ADP 5 μ M	ADP 20 μ M	TRAP 20 μ M
Ohne Antagonist	65,7	68,9	66,3
Apyrase	53,8	60,0	64,7

Werteangaben in Prozent (%)

Tabelle 5: Aggregation unter ADP-Rezeptorblockade mit PCP-ATP

	ADP 5 μ M	ADP 20 μ M	TRAP 20 μ M
Ohne Antagonist	80,0	79,0	81,0
PCP-ATP	0	0	68,0

Werteangaben in Prozent (%)

Tabelle 6: Aggregation unter Cyclooxygenaseinhibition

	ADP 5 μ M	ADP 20 μ M	TRAP 20 μ M
Ohne Antagonist	65,7	68,9	66,3
Indomethacin	0	0	0

Werteangaben in Prozent (%)

Minuten nach Stimulation

Stimulierung	Antagonist	0 Min.	20 Min.	30 Min.	40 Min.	50 Min.	60 Min.
Thrombin	⊗	19,6 ± 4,5	19,4 ± 8,7	38,5 ± 14,1	42,5 ± 18,8	49,2 ± 18,5	51,2 ± 14,2
	Tirofiban	19,2 ± 16,1	25,4 ± 16	45,6 ± 21	53,8 ± 20,2	60,1 ± 22,9	70 ± 15,4 *
	Lamifiban	9,9 ± 4,9 *	11,3 ± 2,7*	28,1 ± 11,3	34,4 ± 7,6	48,7 ± 11,4	60,1 ± 13,8
	C7E3	16,1 ± 6,5	14,8 ± 9	36,3 ± 22,3	46,1 ± 19,6	65,3 ± 10,1 *	53 ± 11,3
	YM337	18,8 ± 7,5	18,9 ± 5,4	29,9 ± 9	65,7 ± 12,2 *	72,9 ± 9,8 *	80,3 ± 9,5 *
	EMD	15,9 ± 7	12,3 ± 5,6*	18,2 ± 10 *	25,2 ± 13 *	34,4 ± 17,2 *	49,3 ± 25,1
	Integrelin	13,4 ± 5,8	21,7 ± 9,2	32,9 ± 14,7	59,4 ± 15 *	71,6 ± 7,2 *	63,1 ± 7,9 *
Tissue - Factor	⊗	22,7 ± 5,6	26,4 ± 14	37,6 ± 19,2	41,7 ± 16,5	48,5 ± 14,7	55,4 ± 14,2
	Tirofiban	22,9 ± 11	33,7 ± 18,9	47,3 ± 15,1	58,4 ± 17	59,8 ± 13,6	60,2 ± 12,9
	Lamifiban	10,4 ± 4,9*	30 ± 17,5	48,8 ± 14,7	52,7 ± 11	54,8 ± 8,4	57,3 ± 6,6
	C7E3	23,7 ± 7,4	28 ± 22,8	43,1 ± 15,7	50,9 ± 10,3	57 ± 7,1	63,1 ± 28,1
	YM337	24,1 ± 5,9	30,8 ± 11,9	43,8 ± 20,8	58,3 ± 19 *	58 ± 13	60,9 ± 10
	EMD	18,3 ± 8,4	20,9 ± 6,5	19,7 ± 8,6*	32,6 ± 20,2	40,8 ± 26,1	45,1 ± 19,8
	Integrelin	16,6 ± 4,5	31,3 ± 16,7	51,4 ± 9,5	66,1 ± 8 *	68 ± 4,8*	68,0 ± 7,4 *

Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Signifikanz * $p < 0,05$

Minuten nach Stimulation

Stimulierung	Antagonist	0 Min.	20 Min.	30 Min.	40 Min.	50 Min.	60 Min.
Thrombin	⊗	19,6 ± 4,5	19,4 ± 8,7	38,5 ± 14,1	42,5 ± 18,8	49,2 ± 18,5	51,2 ± 14,2
	Indo- methacin	15,8 ± 5,4	12,5 ± 4,6*	19,2 ± 8 *	20,2 ± 10*	23,4 ± 11,3*	24 ± 9,1 *
	Tirofiban + Indometh.	16,6 ± 13,4	12,8 ± 11,3	19,4 ± 15,3	20,6 ± 13,2	24,1 ± 13,4	37,3 ± 11,8
	Lamifiban + Indometh.	13,6 ± 5,7	10 ± 1,9 *	16,2 ± 4 *	20,7 ± 10,7	17,4 ± 11,5	31,4 ± 14,5
	C7E3 + Indometh.	19,1 ± 3,6	8,1 ± 1,7 *	12,8 ± 6 *	17,1 ± 6,3*	22,8 ± 9,8	23,7 ± 1,9
	YM337 + Indometh.	16 ± 1,5	12,6 ± 4,2	16,4 ± 5,9*	21,3 ± 5,1	29 ± 2,2	36,4 ± 5,7
	EMD + Indometh.	14,9 ± 1,8	9,6 ± 3,1 *	10,4 ± 3,9*	9,4 ± 4,4 *	10,1 ± 1,8 *	12,1 ± 6,6 *
	Integrelin + Indometh.	10,2 ± 2 *	12,0 ± 4,0	18,9 ± 5,7	21,3 ± 10,9	27,9 ± 7,7	35,8 ± 12,2
	Tissue - Factor	⊗	22,7 ± 5,6	26,4 ± 14	37,6 ± 19,2	41,7 ± 16,5	48,5 ± 14,7
Indome- thacin		17,1 ± 6 *	17,3 ± 9,2*	22,9 ± 12 *	25,4 ± 13*	29,7 ± 11,7*	34,2 ± 11,9*
Tirofiban + Indometh.		16,0 ± 8,8*	26,8 ± 17	32,2 ± 20	34,2 ± 25,4	33,4 ± 25,3	40,8 ± 20,3
Lamifiban + Indometh.		10,7 ± 3,7*	11,1 ± 3,7*	19,7 ± 8,4	25,3 ± 9,2	33,3 ± 2,9	37,8 ± 4,9
C7E3 + Indometh.		26,3 ± 13,7	26,3 ± 13,9	38 ± 11,4	43,6 ± 9,1	45,8 ± 5,1	53,3 ± 11,9
YM337 + Indometh.		16,2 ± 1,3	19,1 ± 8,3	23,1 ± 11,9	30,7 ± 6,7	33,7 ± 9,8	36,4 ± 11,6
EMD + Indometh.		13,4 ± 3,2*	13,6 ± 6,1	15,7 ± 6,1*	12,7 ± 2,3*	11,9 ± 4,9 *	22,7 ± 11,3 *
Integrelin + Indometh.		15,3 ± 1,2*	21,6 ± 12,4	31,3 ± 10,7	37,3 ± 9,7	39,9 ± 9,1	45,1 ± 9,1

Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Signifikanz * $p < 0,05$

Minuten nach Stimulation

Stimulierung	Antagonist	0 Min.	20 Min.	30 Min.	40 Min.	50 Min.	60 Min.
Thrombin	⊗	28,3 ± 16,2	24,9 ± 11,8	44,9 ± 17,7	52,1 ± 18,1	61,3 ± 16,5	64,7 ± 15,4
	PCP-ATP	25,1 ± 12	23 ± 14,8	46,8 ± 17,7	58,1 ± 12,1	63,9 ± 10,2	68,7 ± 13
	Tirofiban + PCP-ATP	25,1 ± 7,1	24,3 ± 6,3	49,2 ± 14,1	66,4 ± 11 *	68,1 ± 13,7	67,9 ± 13,8
	Lamifiban + PCP-ATP	31,6 ± 13,6	32,4 ± 15,6	53,0 ± 13,0	66,3 ± 13*	59,3 ± 18,0	67,7 ± 4,9
	C7E3 + PCP-ATP	25,3 ± 11,4	13,7 ± 6,0*	29,1 ± 9,2*	37,9 ± 11*	60,1 ± 12,0	67,0 ± 8,8
	YM337 + PCP-ATP	30,7 ± 10,3	17,6 ± 11 *	33,7 ± 18,0	51,8 ± 20,0	58,7 ± 10,2	57,8 ± 10,4*
	EMD + PCP-ATP	34,1 ± 12,5	20,1 ± 5,8	32,3 ± 17*	36,8 ± 17*	42,3 ± 22,3*	42,0 ± 12,4*
	Integrelin + PCP-ATP	28,4 ± 9,8	27,0 ± 8,1	47,2 ± 16,7	52,1 ± 10,8	66,0 ± 7,4	75,4 ± 14,0
	Indometh. + PCP-ATP	25,6 ± 12,3	11,7 ± 6,9*	18,0 ± 8,9*	23,4 ± 12 *	29,0 ± 11,2 *	35,4 ± 11,9 *
	Tissue - Factor	⊗	36,0 ± 14,5	62,1 ± 10,0	62,2 ± 8,1	56,6 ± 8,8	57,0 ± 10,4
PCP-ATP		34,9 ± 12,3	52,4 ± 9,0*	53,9 ± 14*	52,7 ± 7,8*	53,0 ± 8,9	56,8 ± 10,2
Tirofiban + PCP-ATP		29,9 ± 17,5	41,9 ± 5,2*	45,7 ± 7,2*	45,8 ± 7,7*	44,1 ± 4,4 *	51,0 ± 8,5 *
Lamifiban + PCP-ATP		35,4 ± 12,1	45,8 ± 7,3*	49,0 ± 9,0*	46,9 ± 5,0*	47,6 ± 3,5 *	50,6 ± 3,9 *
C7E3 + PCP-ATP		38,3 ± 9,2	49,6 ± 9,3*	53,4 ± 11 *	53,9 ± 7,4	53,4 ± 7,2	57,0 ± 7,2
YM337 + PCP-ATP		29,2 ± 8,2	50,4 ± 4,2*	57,9 ± 5,7	56,1 ± 7,8	57,3 ± 11,2	61,7 ± 12,1
EMD + PCP-ATP		37,8 ± 13,5	50,8 ± 7,6*	54,3 ± 10*	53,2 ± 6,5	55,4 ± 9,7	58,1 ± 11,5
Integrelin + PCP-ATP		42,8 ± 14,7	48,7 ± 5,1*	54,0 ± 7,3*	49,3 ± 4,4*	49,9 ± 6,6 *	54,7 ± 9,2
Indometh. + PCP-ATP		32,0 ± 13,2	35,8 ± 5,3*	40,5 ± 6,3*	40,5 ± 12 *	43,8 ± 7,5 *	47,1 ± 8,9 *

Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Signifikanz * p < 0,05

Minuten nach Stimulation

Stimulierung	Antagonist	0 Min.	20 Min.	30 Min.	40 Min.	50 Min.	60 Min.
Thrombin	⊗	25,3 ± 4,5	33,5 ± 12,0	55,8 ± 15,5	64,2 ± 18,9	69,2 ± 18,7	72,1 ± 18,9
	Apyrase	18,1 ± 5,7*	32,5 ± 17,4	53,0 ± 19,1	68,9 ± 20,7	71,2 ± 19,2	73,3 ± 17,1
	Tirofiban	18,9 ± 6,9	31,7 ± 15,1	58,3 ± 17,5	80,0 ± 14,7	82,0 ± 12,4	82,1 ± 8,9
	+ Apyrase						
	Lamifiban	17,3 ± 2,3*	36,0 ± 29,1	51,0 ± 45,2	77,6 ± 33,3	81,3 ± 34,0	87,0 ± 32,8
	+ Apyrase						
	C7E3	18,9 ± 5,6	27,2 ± 16,1	38,3 ± 15,6	61,0 ± 21,7	72,9 ± 9,3	81,1 ± 5,3
	+ Apyrase						
	YM337	17,2 ± 4,7*	27,4 ± 14,2	54,8 ± 22,4	82,9 ± 21,0	105,4 ± 44 *	93,1 ± 21,8 *
	+ Apyrase						
EMD	21,2 ± 5,6	31,0 ± 10,0	28,7 ± 5,9*	40,4 ± 14 *	55,4 ± 26,2	67,4 ± 25,4	
+ Apyrase							
Integrelin	17,7 ± 3,4*	25,8 ± 10,9	46,8 ± 14,9	76,6 ± 8,4	70,8 ± 4,8	86,3 ± 6,9	
+ Apyrase							
Tissue - Factor	⊗	28,9 ± 8,7	59,2 ± 27,4	75,4 ± 14,3	64,5 ± 9,0	67,7 ± 6,7	69,2 ± 8,4
	Apyrase	22,2 ± 6,6*	64,6 ± 7,3	66,6 ± 7,7*	68,2 ± 8,3	67,6 ± 7,5	68,6 ± 7,4
	Tirofiban	21,0 ± 8,2	62,4 ± 4,7	68,0 ± 0,7	76,7 ± 3,4*	74,7 ± 6,8	77,3 ± 3,0 *
	+ Apyrase						
	Lamifiban	18,2 ± 2,6	71,2 ± 9,2	68,9 ± 2,7	82,4 ± 8,2*	76,7 ± 4,7 *	79,1 ± 3,0 *
	+ Apyrase						
	C7E3	18,2 ± 7,5*	63,4 ± 3,5	64,0 ± 6,2	71,4 ± 3,4	64,7 ± 11,9	79,6 ± 6,9
	+ Apyrase						
	YM337	15,7 ± 3,6*	64,3 ± 8,7	65,3 ± 11,6	78,6 ± 11 *	84,1 ± 11 *	82,8 ± 14,5 *
	+ Apyrase						
EMD	24,7 ± 4,0	41,3 ± 11,8	44,3 ± 22 *	54,6 ± 29,7	54,1 ± 25,6	58,1 ± 26,7	
+ Apyrase							
Integrelin	16,7 ± 3,0*	60,2 ± 3,7	60,8 ± 2,0	69,4 ± 5,1	71,1 ± 2,4	68,8 ± 19,7	
+ Apyrase							

Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Signifikanz * p < 0,05

Minuten nach Stimulation

Stimulierung	Antagonist	0 Min.	20 Min.	30 Min.	40 Min.	50 Min.	60 Min.
Thrombin	⊗	18,6 ± 5,9	18,9 ± 9,7	35,1 ± 9,7	37,6 ± 7,1	46,1 ± 14,9	54,1 ± 10,0
	Gamma-S-ATP	16,7 ± 7,1	18,0 ± 11,5	31,3 ± 11,2	41,6 ± 9,9	49,1 ± 11,7	50,6 ± 11,8
	Gamma-S-ATP + Tirofiban	18,4 ± 3,5	14,4 ± 5,8	22,4 ± 5,0	44,2 ± 12,2	48,6 ± 17,8	55,7 ± 10,1
Tissue - Factor	⊗	19,3 ± 5,8	57,1 ± 4,2	58,6 ± 3,5	52,4 ± 5,8	52,5 ± 5,1	55,4 ± 6,6
	Gamma-S-ATP	24,7 ± 6,4	43,6 ± 8,7*	46,6 ± 6,7*	44,9 ± 5,9*	45,4 ± 4,4	49,7 ± 5,3
	Gamma-S-ATP + Tirofiban	20,8 ± 10,0	44,4 ± 7,4	49,7 ± 7,1	46,6 ± 3,4	47,1 ± 6,5	49,9 ± 6,0

Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Signifikanz * $p < 0,05$