

Die antikoagulatorischen Eigenschaften von Ethylpyruvat

eingereicht von
August Fiegl

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der
Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am
Lehrstuhl für Physiologische Chemie

Unter der Anleitung von

Assoz.-Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr. rer. nat. Gerhard Cvirn

und

Priv.-Doz. Mag. Dr. Gerd Hörl

Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 16.9.2020

August Fiegl eh.

Danksagungen

Ein besonderer Dank gilt meinem Diplomarbeitsbetreuer Assoz.-Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr. rer. nat. Gerhard Cvirn, welcher mich sehr gut unterstützt und mir einen guten Einstieg in die medizinische Forschung ermöglicht hat.

Ein weiterer Dank gilt meinen Eltern Martin und Therese, die mir das Studium ermöglicht haben und mir immer zur Seite standen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Großvater em. o. Univ.-Prof. Dr. med. Heinz Huber und Onkel Univ.-Doz. Dr. med. Michael Fiegl bedanken, welche meine Begeisterung für die Medizin und Forschung entfacht haben.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen.....	i
Inhaltsverzeichnis.....	ii
Abkürzungen und deren Erklärung.....	iv
Abbildungsverzeichnis.....	vii
Zusammenfassung.....	ix
Einleitung.....	ix
Material und Methoden.....	ix
Ergebnisse.....	x
Diskussion.....	x
Abstract.....	xi
Introduction.....	xi
Methods.....	xi
Results.....	xi
Discussion.....	xii
1 Einleitung.....	1
1.1 Der septische Schock und dessen Auswirkung auf die Hämostase.....	1
1.2 Die Gerinnungskaskade.....	2
1.2.1 Das extrinsische (exogene) System.....	4
1.2.2 Das intrinsische (endogene) System.....	4
1.3 Thrombozyten.....	5
1.3.1 Ursprung und Morphologie.....	5
1.3.2 Oberfläche der Thrombozyten.....	6
1.3.3 Thrombozytenadhäsion.....	7
1.3.4 Aktivierung der Thrombozyten.....	7
1.3.5 Thrombozytenaggregation.....	8
1.4 Das Endothel.....	8
1.4.1 Der Aufbau des Endothels.....	8
1.4.2 Das Endothel als Regulator der Hämostase.....	9
1.4.3 Endotheliale Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion.....	9
1.5 Die Fibrinolyse.....	10
1.6 Regulation der Hämostase.....	12
1.6.1 Das Protein C- und S-System.....	12
1.6.2 Antithrombin-Heparansulfat-System.....	13
1.6.3 Prostazyklin-Thromboxan-System.....	13

1.7	Inhibitoren der Hämostase.....	14
1.7.1	<i>Gerinnungshemmung in vitro</i>	14
1.7.2	<i>Hemmung der Hämostase in vivo</i>	15
1.8	Die biochemischen Eigenschaften von EP.....	18
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Probengewinnung und -vorbereitung.....	21
2.2	Thrombozytenaggregometrie.....	22
2.2.1	<i>Lichttransmissionsaggregometrie nach Born</i>	22
2.2.2	<i>Impedanzaggregometrie nach Cardinal</i>	23
2.2.3	<i>Multiple Elektroden-Aggregometrie</i>	25
2.3	Thrombelastometrie.....	27
2.4	Thrombozytenadhäsion.....	29
2.5	Platelet Function Analyzer (PFA-200).....	30
2.6	Blutbild.....	32
2.7	Thrombingeneration.....	33
2.8	ATP-Messung.....	34
2.9	Globaltests der plasmatischen Gerinnung (APTT und PT).....	34
2.10	Statistische Methode.....	35
3	Ergebnisse.....	36
3.1	Einflüsse von EP auf die Thrombozytenaggregation.....	36
3.2	Einflüsse von EP auf die ATP-Exozytose.....	37
3.3	Einflüsse von EP auf den Verlauf der Gerinnselformung (Thrombelastometrie).....	37
3.4	Einflüsse von EP auf die Plättchenfunktion (PFA-200).....	39
3.5	Einflüsse von EP auf die Plättchenadhäsion (Impact R).....	41
3.6	Einflüsse von EP auf die Thrombingeneration.....	42
3.7	Einflüsse von EP auf die Gerinnungszeiten APTT und PT.....	44
4	Diskussion.....	46
4.1	EP hemmt die Plättchenfunktion.....	46
4.1.1	<i>Hemmung der Thrombozytenaktivierung durch EP</i>	46
4.1.2	<i>Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation durch EP</i>	46
4.1.3	<i>Hemmung der ATP-Exozytose von Thrombozyten durch EP</i>	47
4.2	Antiinflammatorische und Antioxidative Eigenschaften von EP.....	48
4.3	Einfluss von EP auf die Apoptose und den Zellmetabolismus.....	50
4.4	EP als potentielles Medikament gegen Atherosklerose.....	50
	Literaturverzeichnis.....	53

Abkürzungen und deren Erklärung

ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Analysis of variance
APC	Aktiviertes Protein C
APTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AS	Average size
AT	Antithrombin
ATP	Adenosintriphosphat
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CAT	Calibrated automated thrombography
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRP	C-reaktives Protein
CT	Coagulation Time
DIC	Disseminated intravascular coagulation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EP	Ethylpyruvat
ETP	Endogenous thrombin Potential
F _I O ₂	Inspiratorische Sauerstofffraktion
GP	Glykoprotein
GSH	Glutathion
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
IκB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid

LT	Lag Time
MCF	Maximal clot firmness
MCH	Mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
MGDF	Megakaryocyte growth and development factor
MS	Maximale Steigung
NF- κ B	Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells
NMH	Niedermolekulare Heparine
NO	Stickstoff Monoxid
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PaO ₂	Arterieller O ₂ Partialdruck
PAC-1	Procaspase Activating Compound-1
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PFA-200	Platelet function analyzer 200
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKC	Protein Kinase C
PPP	Platelet poor plasma
PRP	Platelet rich plasma, plättchenreiches Plasma
PT	Prothrombinzeit
r-PA	Reteplase
rt-PA	Recombinant tissue-Plasminogen-Activator
SC	Surface coverage
t-PA	Tissue-Plasminogen-Activator
t-PA	Alteplase
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor

TNF- α	Tumor Nekrose Faktor
TNK-tPA	Tenecteplase
TPO	Thrombopoetin
ttPEAK	Time to peak
TXA ₂	Thromboxan-A ₂
VelIndex	Velocity Index
vWF	Von Willebrand Faktor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Quelle: Pape Hans-Christian, Physiologie (2019), S. 296

Abbildung 2: Quelle: Universitätsklinikum Düsseldorf, Vorlesung Hämostaseologie WS 2008/09

Available at: <https://slideplayer.org/slide/652446/>

Abbildung 3: Quelle: Universitätsklinikum Düsseldorf, Vorlesung Hämostaseologie WS 2008/09,

Available at: <http://slideplayer.org/slide/652446/>

Abbildung 4: Quelle: Horn Florian, Biochemie des Menschen (2012), S.535

Abbildung 5: Quelle: Horn Florian, Biochemie des Menschen (2012), S. 534

Abbildung 6: Quelle: Wikipedia Pyruvat

Available at:

<https://de.wikipedia.org/wiki/Pyruvate>

Abbildung 7: Quelle: Wikipedia Brenztraubensäureethylester

Available at:

<https://de.wikipedia.org/wiki/Brenztraubensäureethylester>

Abbildung 8: Quelle: Wikipedia Thrombozytenaggregometrie

Available at:

<https://de.wikipedia.org/wiki/Thrombozytenaggregometrie#/media/>

Datei:TAgregation_Verlauf_2.jpg

Abbildung 9: Quelle: Wikipedia Thrombozytenaggregometrie

Available at:

<https://de.wikipedia.org/wiki/Thrombozytenaggregometrie#/media/>

Datei:TAgregation_Schema.jpg

Abbildung 10: eigens angefertigtes Foto des Chronolog Whole Blood Aggregometer Model 700 am Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Med Uni Graz

Abbildung 11: Quelle: Internetseite der Firma Roche über Gerinnungsdiagnostik

Available at:

<https://www.roche.de/diagnostics/systeme/gerinnungsdiagnostik/multiplate-analyzer.html#Merkmale>

Abbildung 12: Quelle: Universitätsklinikum Ulm, Thrombozytenfunktion mittels Multiplate-Analyser

Available at:

https://www.uniklinik-ulm.de/fileadmin/default/09_Sonstige/Klinische-Chemie/Seiteninhalte/Seiteninhalte_M/Multiplate.pdf

Abbildung 13: eigens angefertigtes Foto des ROTEG 05 Rotationselastometer am Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Med Uni Graz

Abbildung 14: Quelle: Dissertationsschrift, „Untersuchungen zur Wertigkeit der Rotationsthrombelastometrie (ROTEM) für die Therapiekontrolle bei Hämostasestörungen kardiochirurgischer Patienten“, Universität Jena
Available at: <https://d-nb.info/1016620217/34>

Abbildung 15: Quelle: Internetseite des Zentrallabors der Universitätsklinik Halle
Available at: <http://www.medizin.uni-halle.de/index.php?id=6336&L=1%27%20and%20char%28124%29%20user%20charxt>

Abbildung 16: eigens angefertigtes Foto des Diamed Impact-R am Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Med Uni Graz

Abbildung 17: eigens angefertigtes Foto des Innovance PFA-200 am Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Med Uni Graz

Abbildung 18: eigens angefertigtes Foto des Sysmex KX-21N Automated Hematology Analyzer am Lehrstuhl für Physiologische Chemie der Med Uni Graz

Abbildung 19: Quelle: Internetseite der Firma Berthold über ATP-Messung
Available at: <https://www.berthold.com/de/bioanalytik/wissen/glossar/atp-messung/>

Abbildungen 20-36: Die graphische Darstellung der im Rahmen dieser Diplomarbeit gemessenen Daten erfolgte mit dem GraphPad 7.0 Paketes des Programmes Prism

Abbildung 37: Quelle: Aktories Klaus, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie (2013), S.63

Zusammenfassung

Einleitung

In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Ethylpyruvat (EP) antiinflammatorische und antioxidative Eigenschaften besitzt. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde untersucht, ob EP auch gerinnungshemmende Eigenschaften besitzt. Dadurch wäre EP möglicherweise geeignet, die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen, wie z.B. Atherosklerose, hintanzuhalten. Die hier vorliegenden Gerinnungsanalysen wurden vorwiegend in (menschlichem) Vollblut durchgeführt.

Material und Methoden

Die Thrombozytenfunktion (Thrombozytenadhäsion und -aggregation) wurde mithilfe des „Platelet Function Analyzers PFA 200“ und des „Cone and platelet Analyzers CPA (Impact R)“ gemessen. Die Thrombozytenaggregation und damit verbundene ATP-Ausschüttung wurden am „Chrono-Log Impedanz Aggregometer“ bestimmt.

Der Gerinnselbildungsverlauf wurde am „Thrombelastometer“ gemessen, die jeweilige Thrombin-Entstehungskurven am „CAT-Thrombinscope BV“.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe einer linearen Regression oder univariaten Varianzanalyse (ANOVA). Als *post hoc*-Test wurde die Bonferroni-Holm-Korrektur verwendet.

Ergebnisse

Unsere Messungen zeigten zum ersten Mal in Vollblut, dass EP eine hemmende Wirkung sowohl auf die Thrombozytenfunktion als auch auf die sekundäre Hämostase besitzt. Impedanzaggregometrie: Die Stärke der Aggregation und der ATP-Exozytose nehmen mit steigender EP-Konzentration ab. PFA-200: Der EP-Zusatz führte zu einer dosisabhängigen Verlängerung der „Closure Time“.

CPA: „Surface Coverage“ und „Average Size“ nahmen mit steigender EP-Konzentration ab. Sekundäre Hämostase: sowohl die „activated partial thromboplastin time APTT“ als auch die „Prothrombinzeit PT“ wurden durch EP-Zusatz dosisabhängig verlängert. Nur die CAT-Messungen zeigten eine leichte Zunahme der Thrombingeneration mit steigender EP-Konzentration.

Diskussion

Die im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführten Messungen zeigen, dass EP eine hemmende Wirkung auf die primäre und sekundäre Hämostase besitzt. Die hemmende Wirkung des EP auf die Plättchenfunktion dürfte auf eine in Anwesenheit von EP

verminderte Thrombozytenaktivierung (verminderte Phosphorylierung der Enzyme Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und Protein Kinase C) mit anschließender verminderter Thrombozytenadhäsion und -aggregation (verringerte P-Selektin-Expression bzw. Glykoprotein IIb/IIIa-Expression) zurückzuführen sein. Die Verlängerung der Standard-Gerinnungszeiten APTT und PT durch EP-Zusatz lässt vermuten, dass EP auch die sekundäre Hämostase hemmen kann. Zwar zeigen CAT-Messungen, dass sich der Thrombin-Peak durch EP-Zusatz etwas erhöht, nicht aber das „Endogene Thrombin Potential“, also die Gesamtmenge an entstandenem Thrombin.

EP besitzt antiinflammatorische, antioxidative und antikoagulatorische Eigenschaften. Somit könnte sich EP in Zukunft als geeignetes Molekül erweisen, um die Entstehung von atherosklerotischen Plaques hintanzuhalten.

Abstract

Introduction

Ethyl pyruvate (EP) has proven anti-inflammatory and antioxidative properties. We aimed to investigate whether EP also possesses antiplatelet and anticoagulant properties particularly in the physiological environment of whole blood.

Methods

We investigated the effects of increasing concentrations of EP on platelet function (Platelet function analyzer PFA 200, Cone and platelet Analyzer Impact R), on platelet aggregation (impedance method), on the course of clot development (thrombelastometry), and on standard coagulation times.

Results

EP exerted significant antiplatelet actions. i) Impedance aggregometry measurements revealed that amplitudes and ATP exocytosis dose-dependently decreased and lag times dose-dependently increased in the presence of increasing EP concentrations. ii) "Closure times" were dose-dependently prolonged by EP using the Platelet function analyzer 200. iii) Both "Surface Coverage" and "Average size" were dose-dependently decreased by increasing EP concentrations using the cone and platelet analyzer CPA. EP also exerted significant anticoagulant actions: "Activated partial thromboplastin time (APTT)" and "prothrombin time (PT)" were dose-dependently prolonged by EP.

Discussion

We found that EP possesses antiplatelet and anticoagulant properties in whole blood. Together with its proven anti-inflammatory and antioxidative properties, EP is a potentially anti-atherosclerotic drug. Chronic administration of EP might be a suitable tool to impede the development of atherosclerotic lesions.

1 Einleitung

Das zentrale Thema dieser Diplomarbeit ist die Erforschung der gerinnungs- und plättchenhemmenden Eigenschaften des Stoffes Ethylpyruvat (EP). Nachdem die Gerinnung ein komplexes Geschehen im Körper ist, welches einerseits die Blutstillung bei Bedarf gewährleistet, andererseits nicht überschießend stattfinden darf und auch lokal und zeitlich begrenzt werden muss, scheint es mir wichtig, zuerst die Zusammenhänge der Blutstillung auf zellulärer (primäre Hämostase) und plasmatischer Ebene (sekundäre Hämostase), sowie die Auflösung des Gerinnsels (Fibrinolyse) genauer zu beschreiben. Es ist unerlässlich, das aktuelle Wissen über Blutgerinnung und Fibrinolyse im Detail zu beleuchten, bevor die konkrete Fragestellung erläutert und die Testergebnisse präsentiert werden.

1.1 Der septische Schock und dessen Auswirkung auf die Hämostase

Der Begriff „Sepsis“ stammt vermutlich von Hypokrates von Kos (460-366 v. Chr.) und wurde von diesem als eine generalisierte Entzündung mit Fieber als Hauptmerkmal erkannt.¹ Der Grundstein für die heute gültige Definition der Sepsis wurde viel später von Roger Bone (1941-1997) gelegt: „Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion“.¹

Die akute Sepsis und der septische Schock zählen weltweit zu den häufigsten Krankheitsbildern bei Patienten und Patientinnen auf Intensivstationen.¹ Eine gefürchtete Komplikation stellt bei der Sepsis die sogenannte disseminierte intravasale Gerinnung (DIG, engl. DIC, *disseminated intravascular coagulation*) dar. Dabei handelt es sich um eine massive Aktivierung der Blutgerinnung als Reaktion auf unterschiedliche endogene oder exogene Auslöser, die in erster Linie zur Entstehung multipler Mikrothromben im Blutstrom führt. Nicht selten werden dadurch die versorgenden Gefäße lebenswichtiger Organe thromboembolisch okkludiert, es entwickelt sich eine Schädigung der betroffenen Organe, bis hin zum Multiorganversagen. In weiterer Folge werden die Gerinnungsfaktoren und Blutplättchen (Thrombozyten) verbraucht, und die entstandenen Blutgerinnsel beginnen sich aufzulösen (Fibrinolyse).² Die im Rahmen der Fibrinolyse freigesetzten

Fibrin- und Fibrinogenspaltprodukte hemmen zusätzlich die Blutgerinnung.² Durch diese generalisierte Blutungsneigung können diffuse, petechiale Blutungen (Ekchymosen) auftreten.² Die sogenannte Verbrauchskoagulopathie geht mit einer generalisierten Blutungsneigung einher und wird auch als hämorrhagische Diathese bezeichnet.²

Die Aktivierung der Gerinnungskaskade erfolgt bei der DIG unabhängig von der Ursache durch die Freisetzung von *tissue factor* (TF, Gewebethromboplastin, Faktor III), welcher im septischen Zustand hochreguliert wird.^{2,3}

Die Sepsis-induzierte Prokoagulation ist ein großes klinisches Problem. Deshalb sind Medikamente notwendig, welche bei septischem Schock helfen könnten, die Gerinnungsaktivierung zu stoppen. Ein solches Medikament könnte EP sein, welches die Entstehung von TF, einem wichtigen Initiator der Blutgerinnung, unterdrückt. Hinweise dafür liefern Untersuchungen an Ratten, bei denen die Verabreichung von EP während einer DIG zu einer verminderten Expression von TF-mRNA führte.³

1.2 Die Gerinnungskaskade

Das Gerinnungssystem setzt sich aus den Blutplättchen (Thrombozyten, siehe Kapitel 1.2) sowie einer Reihe von verschiedenen Gerinnungsfaktoren zusammen, welche im Falle einer Gefäßverletzung aktiviert werden und das entstandene Gefäßleck abdichten sollen.^{4,5}

Dies erfolgt zuallererst im Rahmen der primären Hämostase durch die Thrombozytenaggregation, also das Zusammenlagern von aktivierten Thrombozyten zu einem sogenannten „weißen Thrombus“. ^{4,5} Dieser ist in sich noch recht instabil und muss durch ein Maschenwerk aus Fibrinfäden, welches in der sekundären Hämostase gebildet wird, verfestigt werden.⁴

Die zentralen Bausteine der sekundären Gerinnung stellen die in ihrer inaktiven Form im Blutplasma zirkulierenden Gerinnungsfaktoren dar, welche allesamt, mit Ausnahme von ionisiertem Ca^{2+} (Faktor IV), Proteine sind.⁵ Viele von ihnen besitzen eine proteolytische Aktivität (sogenannte Proteasen). Die Aufgabe dieser Proteasen ist es andere Gerinnungsfaktoren zu spalten und dadurch in ihren aktiven Zustand überzuführen. Dadurch erfolgt kaskadenartig die enzymatische Aktivierung einer Reihe von Gerinnungsfaktoren bis zur Entstehung von Fibrinfäden, die der

Stabilisierung des Plättchenthrombus dienen. In der gängigen Nomenklatur werden die aktivierten Gerinnungsfaktoren mit einem angefügten „-a“ gekennzeichnet.⁶

Mit Ausnahme von Ca^{2+} werden alle Gerinnungsfaktoren in der Leber synthetisiert.⁴ Die Faktoren II, VII, IX und X werden allerdings Vitamin-K abhängig produziert.⁵ Diese können erst nach der Carboxylierung des Glutamatrestes unter Mitwirkung von Vitamin-K, vermittelt durch Ca^{2+} , an die negativ geladene Oberfläche von aktivierten Thrombozyten binden und dadurch die Gerinnungskaskade aktivieren.

Die Aktivierung der Gerinnungskaskade kann sowohl über das extrinsische (exogene) als auch das intrinsische (endogene) System erfolgen. Beide Systeme haben eine gemeinsame Endstrecke ab dem Faktor X mit dem Ziel den Plättchenthrombus durch Fibrinpolymere zu verfestigen. In Abbildung 1 ist die Gerinnungskaskade schematisch dargestellt.

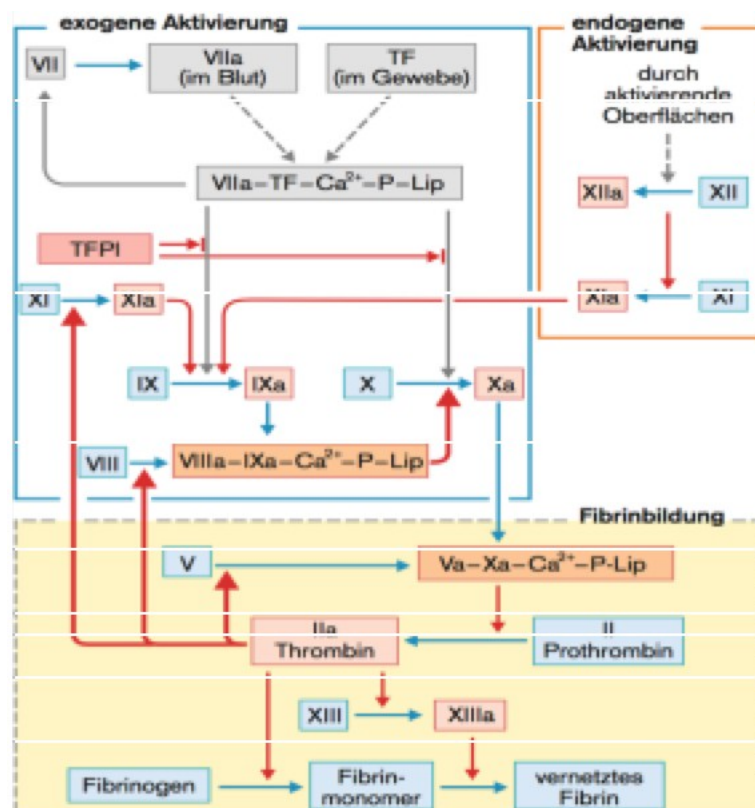


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade

1.2.1 Das extrinsische (exogene) System

Die wesentliche Voraussetzung für die Aktivierung des extrinsischen Systems ist die Verletzung des subendothelialen Gewebes, was die Freisetzung des TF zur Folge hat. Der Gewebefaktor ist im normalen Zustand vom Endothel bedeckt und hat somit keinen Kontakt zum Blut.^{5,7}

Der Gewebefaktor bildet dann mit im Blut zirkulierenden Ca^{2+} , Faktor VIIa und Phospholipiden einen Komplex, der seinerseits die Aktivierung des Faktors X bewirkt. Außerdem spaltet dieser Komplex direkt den Faktor IX zu Faktor IXa und bewirkt dadurch eine frühzeitige Aktivierung des intrinsischen Weges (sogenannter Josso Loop).^{4,8} Der Faktor Xa führt als Komplex mit Faktor Va, Phospholipiden und Ca^{2+} den Faktor Prothrombin (Faktor II) in Thrombin (Faktor IIa) über.⁴ Thrombin wandelt nicht nur Fibrinogen in Fibrinmonomere um, sondern aktiviert noch eine Reihe anderer Gerinnungsfaktoren aus dem intrinsischen System (V, VIII, XI und XIII).⁴

Diese positive Rückkoppelungsschleife stellt die Schnittstelle zwischen dem extrinsischen und intrinsischen System dar und führt zu einer entscheidenden Verstärkung der Gerinnungsaktivität.⁴ Dieser rückwirkende Verstärkungseffekt macht deutlich, warum die Faktoren VIII und IX so wichtig für die Blutgerinnung sind, was sich auch klinisch beim Vorliegen einer Hämophilie A oder B bemerkbar macht: Bei diesem Krankheitsbild kann es zu spontanen, großflächigen Hämatomen und Gelenkblutungen bei starkem Mangel (<1% Restaktivität) der Gerinnungsfaktoren VIII (Hämophilie A) bzw. IX (Hämophilie B) kommen.⁹

Das extrinsische System wird nach kurzer Zeit durch den *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) inaktiviert, indem TFPI den TF/Faktor VII Komplex und den Faktor X inhibiert.¹⁰

1.2.2 Das intrinsische (endogene) System

Die Aktivierung des intrinsischen Systems benötigt im Gegensatz zum extrinsischen System keine Gefäßverletzung. Als Auslöser dient dabei der Kontakt von Faktor XII zu einer negativ geladenen Oberfläche und hochmolekularem Kallikrein und Kininogen.⁴ Dieser Komplex bewirkt seinerseits die Spaltung von Faktor XI zu XIa, welcher in weiterer Folge den Gerinnungsfaktor IX aktiviert.⁷ Faktor

IXa bildet dann gemeinsam mit Faktor VIIIa, Phospholipiden und zirkulierendem Ca^{2+} einen Komplex, der Faktor X zu Xa spaltet.⁷

Von diesem Schritt an laufen beide Systeme ident ab, was im Abschnitt 1.2.1 noch genauer besprochen wird.

Man nimmt heute an, dass der Aktivierung des intrinsischen Systems im physiologischen Zustand praktisch keine Bedeutung zukommt, da Patienten und Patientinnen mit einem genetischen Mangel an Faktor XII keine erhöhte Blutungsneigung zeigen.⁴ Klinisch relevant ist die endogene Aktivierung aber sehr wohl: Wenn zum Beispiel körperfremde Oberflächen wie zentrale Venenkatheter, Dialysemembranen oder künstliche Herzklappen mit dem Blut in Kontakt kommen, kann das intrinsische System angeregt werden.⁴

Als Endprodukt der Gerinnungskaskade entstehen, katalysiert durch den Faktor IIa, aus Fibrinogen niedermolekulare Fibrinmonomere.⁴ Diese lagern sich durch nicht kovalente Bindungen (v.a. Wasserstoffbrückenbindungen) zu Polymeren zusammen (koagulieren) und bilden dadurch einen noch recht instabilen Thrombus.⁴ Im letzten Schritt der Gerinnung wird der Thrombus durch den Faktor XIII stabilisiert, indem er zwischen den Fibrinmonomeren kovalente Bindungen schafft.⁴

Somit entsteht als Produkt der gesamten Blutgerinnung ein Maschenwerk aus Fibrinfäden, in das auch Erythrozyten eingebettet sind (roter Thrombus).⁴

1.3 Thrombozyten

1.3.1 Ursprung und Morphologie

Die zentralen Zellen der Hämostase sind die Thrombozyten, deren Hauptaufgabe die Stillung von Blutungen darstellt. Thrombozyten entstehen, wie auch alle anderen Blutzellen, aus der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle (HSZ), welche die Urzelle der Hämatopoese darstellt und im adulten, roten Knochenmark gebildet wird.¹¹ Die myeloische Reihe der Blutbildung bringt schließlich polyploide Megakaryozyten, die direkten Vorläuferzellen der Thrombozyten, hervor.¹¹ Diese sind mit ihrem Durchmesser von 35- 150 μm die größten Zellen im Knochenmark und können mittels Abschnürung mehrere hundert bis tausend Plättchen hervorbringen, welche ihrerseits die kleinsten korpuskulären Bestandteile des Blutes darstellen.⁷

Ihre Aktivität und Produktivität wird von verschiedenen Zytokinen beeinflusst, wie zum Beispiel Thrombopoetin (TPO) oder *megakaryocyte growth and development factor* (MGDF).¹² TPO wird in der Leber gebildet und unterliegt dem Einfluss von Interleukin-6, das während einer Entzündung hochreguliert wird. Deshalb kommt es im Rahmen von entzündlichen Prozessen oft zu einem Anstieg der Thrombozyten (Thrombozytose).⁵

Morphologisch unterscheiden sich unstimulierte von aktivierten Thrombozyten: Während inaktive Thrombozyten in ihrer diskoiden Ruheform zirkulieren, kommt es durch deren Aktivierung zu einer Abrundung und Ausbildung von Fortsätzen (Pseudopodien), was die spätere Aggregation erleichtern soll (Echinosphärozyten).¹² Formwandel (*shape change*) und Aggregation erfolgen in Sekundenschnelle nach einer Stimulation durch Thrombin oder ADP.¹² Ein weiterer durch die Aktivierung geförderter Prozess ist die Exozytose von adhäsiven Rezeptoren an die Oberfläche.¹³ Diese können in weiterer Folge aktiviert werden und eine vermehrte Thromboxan (TXA₂)-Bildung auslösen, welche ihrerseits die Thrombozytenaggregation anregt.¹³ Therapeutisch kann die thrombozyteneigene TXA₂-Bildung selektiv durch niedrigdosierte Acetylsalicylsäure (ASS, Aspirin) gehemmt werden, was zu einer effektiven Plättchenaggregationshemmung führt.

1.3.2 Oberfläche der Thrombozyten

Die Plasmamembran von Thrombozyten enthält eine Reihe von Oberflächenmolekülen, welche maßgeblich für deren Funktion verantwortlich sind. Ein wichtiges Beispiel dafür sind sogenannte Glykoproteine (GP), die alle mit unterschiedlichen Agonisten (z.B. Thrombin, TXA₂, ADP) oder Liganden interagieren und für die Plättchenfunktion unerlässlich sind.¹² Die wichtigsten Thrombozytenglykoproteine werden hier kurz erwähnt:

GP-IIb/IIIa dient als Fibrinogenrezeptor, kann aber auch den von-Willebrand-Faktor (vWF) und Fibronectin binden und ist besonders für die Thrombozytenaggregation wichtig.¹⁴ Der seltenen Thrombozytenfunktionsstörung Thrombasthenie Glanzmann liegt ein Synthesedefekt dieses Rezeptors zu Grunde, welcher zu einer Störungen der Thrombozytenaggregation führt und sich klinisch durch spontane Schleimhautblutungen, Nasenbluten und verstärkte Geburtsblutungen bei betroffenen Frauen präsentiert.^{12,15}

1.3.3 Thrombozytenadhäsion

GP-Ia/IIa fungiert als Kollagenrezeptor und entfaltet somit seine Wirkung bei der Thrombozytenadhäsion.⁵ Durch die Freilegung von subendothelialer Matrix bei Gefäßverletzungen kommt es durch die Interaktion dieses Rezeptors mit Kollagenfibrillen zu einer Thrombozytenadhäsion an das defekte Areal.⁵ Aufgrund der starken Scherkräfte im Gefäß reicht die Bindung über den Kollagenrezeptor alleine nicht aus, stellt also nur den ersten Kontakt her.⁷

In weiterer Folge wird die vorerst noch recht lose Thrombozytenadhäsion durch den vWF verstärkt.⁷ Dieser wird vorwiegend von Megakaryozyten und Endothelzellen gebildet und in Form der sogenannten Weibel-Palade-Körperchen in der Tunica Intima der Gefäßwand gespeichert.⁷ Im Falle einer Gefäßverletzung werden diese supportiv freigesetzt und entfalten lokal ihre Wirkung.^{5,7,19} Dabei bildet vWF eine Brücke zwischen den Kollagenfasern und dem Rezeptorkomplex GP-Ib-V-XI-Komplex auf der Thrombozytenmembran aus.⁴ Ein Defekt dieses Rezeptors liegt dem seltenen Bernard-Soulier-Syndrom (Prävalenz 1:1.000.000.) zu Grunde, welches klinisch mit hämorrhagischen Diathesen, einer erhöhten Hämatomneigung und Purpura der Haut einhergeht.¹⁶

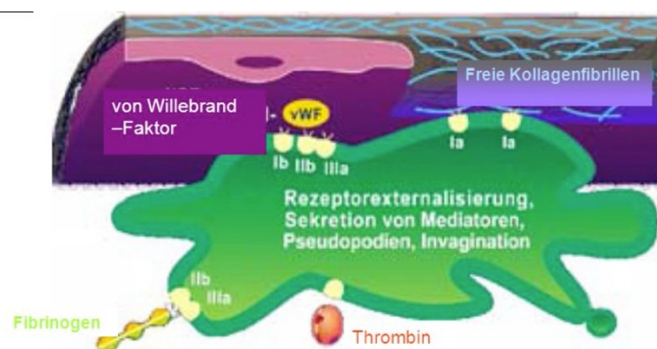


Abbildung 2: Thrombozytenadhäsion

1.3.4 Aktivierung der Thrombozyten

Nach der oben erwähnten Thrombozytenadhäsion am Endothel erfolgt deren Aktivierung, welche im Wesentlichen aus drei Schritten besteht: Freisetzung von lokalen Aktivierungsmediatoren, Formveränderung der Thrombozyten (*shape change*, siehe Kapitel 1.4.1) und Bildung eines Thrombozytenaggregates (weißer Thrombus).⁴

Im Rahmen der Aktivierung schütten die Thrombozyten ihre Granula aus, welche Stoffe wie Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosintriphosphat (ATP), Thromboxan A₂, Serotonin und den Plättchenaktivierenden Faktor (PAF) enthalten.^{4, 5}

Weitere sezernierte Stoffe wie Fibronectin, der vWF und Fibrinogen unterstützen die Adhäsion, indem sie die Bindung zum Endothel verstärken und den Grundstein für die spätere Thrombozytenaggregation legen.⁵

1.3.5 Thrombozytenaggregation

Den letzten Schritt der primären Hämostase bezeichnet man Thrombozytenaggregation, welche der Bildung eines Plättchenthrombus dient.⁵ Dabei wirken eine Reihe von thrombozytären Faktoren zusammen, um eine robuste Bindung zwischen den Blutplättchen zu gewährleisten.¹³ Von besonderer Bedeutung ist dabei der Oberflächenrezeptor GP-IIb/IIIa, indem er die Thrombozyten über die Bindung von polymeren Proteinen (z.B. vWF oder Fibrinogen, siehe Abbildung 3) zur Aggregation befähigt.⁵

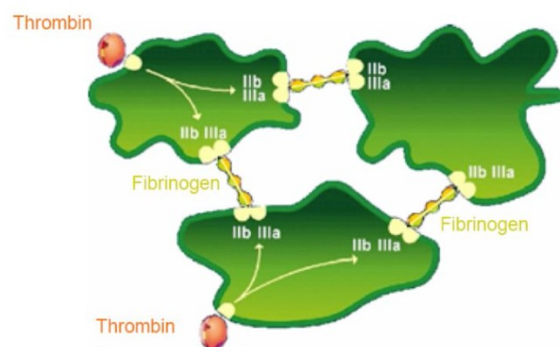


Abbildung 3: Thrombozytenaggregation

1.4 Das Endothel

1.4.1 Der Aufbau des Endothels

Das Endothel ist ein lückenloser, einschichtiger Belag aus platten Zellen, welche mit ihrer Längsachse parallel zum Blutstrom ausgerichtet sind.¹⁷ Sie stehen mit dem Blut in ständiger Wechselwirkung, indem sie mit Hilfe von diversen, lokalen Mediatoren auf alle Blutzellen, insbesondere die Thrombozyten, einwirken.¹⁷

Die innerste, von Endothelzellen aufgebaute Schicht namens Tunica Intima, dient dem zirkulierenden Blut als direkte Barriere, was auf seinen lückenlosen Aufbau zurückzuführen ist.¹⁷ Durch die Ausstattung mit sogenannten Adhärenskontakten, *tight junctions* und Gap Junctions ist eine optimale Trennung des Intravasalraumes von tieferen Wandschichten möglich, was den Durchtritt von Blutbestandteilen durch die Blutgefäße verhindert.¹⁷

Im Rahmen von Entzündungsreaktionen ist diese Barrierefunktion in unterschiedlichem Ausmaß aufgehoben, es kommt zu einem Übertreten von Blutbestandteilen aus dem Intravasalraum in den Extravasalraum.² Folge davon sind die Kardinalsymptome der Entzündung wie Überwärmung (lat. *calor*), Schmerz (lat. *dolor*), Rötung (lat. *rubor*), Schwellung (lat. *tumor*) und Funktionseinschränkung (lat. *functio laesa*).²

1.4.2 Das Endothel als Regulator der Hämostase

Im physiologischen Zustand gilt es als wichtige Aufgabe des Endothels, ein stabiles Gleichgewicht zwischen pro- und antithrombotischen Faktoren herzustellen.¹³ Das Endothel ist zur Produktion und Freisetzung einer Reihe von Gewebshormonen befähigt, was eine Grundvoraussetzung für die Regulation der Blutgerinnung ist.¹³

Das Endothel stellt unter normalen Bedingungen eine nicht-thrombogene Oberfläche dar, welche die Plättchenaktivierung verhindert.¹³ Dabei spielen vor allem die antagonistisch wirkenden Faktoren Thromboxan A₂ und Prostacyclin eine wichtige Rolle (siehe Kapitel 1.6.3). Ein weiterer endothelialer Faktor der fibrinolytisch tätig ist und hilft, kleine, ständig gebildete Blutgerinnsel aufzulösen ist der *tissue-type plasminogen activator* (t-PA).⁷ Ebenfalls vom Endothel hergestellt wird sein direkter Gegenspieler *plasminogen activator inhibitor-1* (siehe Kapitel 1.5).

Dadurch wird augenscheinlich, dass die endotheliale Regulation der Hämostase einem feinabgestimmten Gleichgewicht zwischen Blutgerinnung und Gerinnungshemmung unterliegt. Diese Balance kann durch eine endotheliale Dysfunktion im Rahmen von artherosklerotisch veränderten Gefäßen zugunsten der prothrombotischen Faktoren verschoben werden, was in einer vermehrten Thrombosebildung resultiert.¹³

1.4.3 Endotheliale Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion

Der Tonus der glatten Gefäßmuskulatur wird von einer Reihe von lokalen und systemischen Faktoren reguliert. Dabei kommt dem Stickstoffmonoxid eine besondere Rolle zu, welches vom Enzym endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) direkt in den Endothelzellen gebildet wird und vielfältige Wirkungen entfaltet.

Auf die Gefäßmuskelzellen wirkt es vasodilatatorisch, antimigratorisch, antiproliferativ und hemmt dadurch die Entstehung von Atherosklerose (Atherogenese).¹³ Die vasodilatatorische Wirkung von Stickstoffmonoxid ist darauf zurückzuführen, dass die Synthese von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) angekurbelt wird und es über *second messenger* zu einer Dephosphorylierung von Myosin kommt.⁵ Außerdem wirkt sich NO negativ auf die Thrombozytenadhäsion und -aggregation aus.¹³ Diese Eigenschaften machen verständlich, warum NO in der Akuttherapie des Myokardinfarkts die Reperfusion fördert und damit die Prognose bedeutend verbessern kann.¹⁸

1.5 Die Fibrinolyse

Durch exogene und endogene Auslöser kommt es zur Aktivierung der Blutgerinnung. Simultan dazu läuft ein gegenläufiger Mechanismus ab, die sogenannte Fibrinolyse, welcher der Auflösung des gebildeten Fibrins dient.⁴ Auch unter physiologischen Bedingungen entstehen permanent kleine Mengen an Fibrin, welche aber schnell durch die Fibrinolyse eliminiert werden.⁴ Es herrscht also unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen Blutgerinnung und Fibrinolyse, welches jedoch durch eine Gewebsverletzung oder Aktivierung des intrinsischen Systems zugunsten der Blutgerinnung verschoben werden kann. Erst dadurch ist die Bildung eines Thrombus und die daraus resultierende Blutstillung möglich.⁴

Der entscheidende Faktor bei der Fibrinolyse ist Plasmin, welches, wie die meisten Gerinnungsfaktoren, eine Serinprotease darstellt.⁷ Es bindet an Fibrinpolymere und spaltet diese zwischen der D- und E-Domäne, wodurch das Gerinnsel in seine Einzelteile aufgelöst wird.⁷ Eines seiner Spaltprodukte, die sogenannten D-Dimere können nach abgelaufener Fibrinolyse im Blut gemessen werden und stellt daher einen sehr wichtigen Laborparameter in der Diagnostik von Thrombosen dar.^{5,7} Die Vorstufe des Plasmins, das Plasminogen, wird in der Leber gebildet und muss durch Aktivatoren in seine aktive Form übergeführt werden, da die Fibrinolyse nur zu bestimmten Zeitpunkten gestartet werden sollte.⁵

Der wichtigste dieser Aktivatoren ist der t-PA welcher kontinuierlich von Endothelzellen gebildet wird.^{4,7} Die Freisetzung des t-PA kann durch unterschiedliche Stimuli wie zum Beispiel körperliche Anstrengung verstärkt werden, was auch in der „Starke Frauen Studie“ an der Medizinischen Universität Graz gezeigt werden konnte.¹⁹ Andere fördernde Faktoren sind eine venöse Stauung oder Sauerstoffmangel.⁴ Nach der Sekretion aus dem Endothel bindet t-PA an seinen Wirkungsort, das Fibrin, wo es dann in weiterer Folge Plasminogen zu Plasmin aktiviert und dieses zum Abbau des Fibrinpolymers befähigt (siehe Abbildung 4).^{5,7}

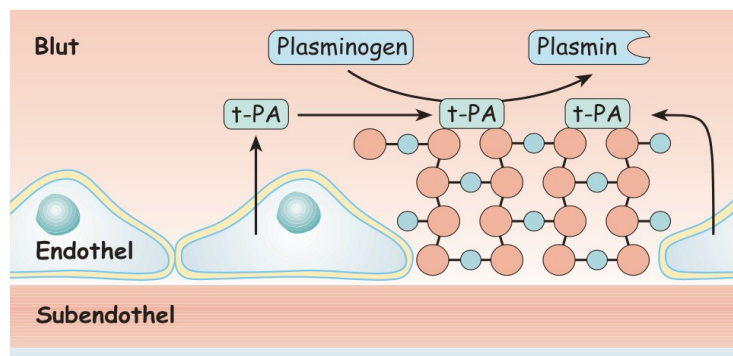


Abbildung 4: Die Wirkungsweise von t-PA

Ein weiterer wichtiger Plasminogen-Aktivator ist die sogenannte Urokinase, welche seine Funktion in unterschiedlichen Geweben ausübt, jedoch nicht so sehr im Blut.⁵ Der Name des Enzyms kommt daher, dass sich eine besonders hohe Konzentration der Urokinase im Urin befindet.⁵

Klinisch macht man sich die Wirkungsweise der Plasminogen-Aktivatoren zunutze, indem man sie in der Lysetherapie bei akuten Verschlüssen der

Koronararterien oder anderen Versorgungsgefäßen (z.B. Hirnarterien, Lungenarterien) systemisch verabreicht. Mittel der Wahl stellen heutzutage die fibrin-spezifischen Fibrinolytika wie zum Beispiel t-PA (Alteplase), r-PA (Reteplase) und TNK-tPA (Tenecteplase) dar.²⁰ Das aus Streptokokken gewonnene Fibrinolytikum Streptokinase wird zur Akuttherapie des Myokardinfarktes in vielen Ländern nicht mehr empfohlen, da es, im Gegensatz zu den fibrin-spezifischen Fibrinolytika, häufig zu anaphylaktischen Reaktionen führt.²⁰

1.6 Regulation der Hämostase

Der natürliche Ablauf der sekundären Blutgerinnung unterliegt Einflussfaktoren, die eine uneingeschränkte Gerinnung verhindern um schwerwiegenden klinischen Folgen wie Thrombosen und Infarkten vorzubeugen.⁵ Dabei sollen an dieser Stelle die Grundzüge des Protein S und C Systems, des Antithrombin-Heparansulfat-Systems und des Prostazyklin-Thromboxan-Systems erwähnt werden, welche gemeinsam die Ausbreitung eines Gerinnungsprozesses verhindern.^{5,7}

1.6.1 Das Protein C- und S-System

Eine wichtige Voraussetzung für die Aktivierung des antikoagulatorisch wirkenden Protein C ist ein ablaufender Gerinnungsprozess, welcher mit der Bildung des zentralen Faktors Thrombin seinen Höhepunkt erreicht.¹² Nachdem Thrombin an seinen endothelgebundenen Rezeptor Thrombomodulin bindet, kommt es zu einem Verlust seiner gerinnungsfördernden Eigenschaften und zum Einsetzen einer Gerinnungshemmung durch die Aktivierung von Protein C.¹² In weiterer Folge wird aktiviertes Protein C dazu angeregt, gemeinsam mit Protein S und Kalzium als Kofaktoren einen Komplex auf Endothelzellen und Blutplättchen auszubilden.¹² Dieser Komplex vermag durch seine proteolytische Aktivität die Faktoren Va und VIIIa zu inaktivieren, die Neubildung von Thrombin zu verhindern und somit die Ausbreitung des Gerinnungsprozesses aufzuhalten.¹² Protein S gilt als der einzige Vitamin-K-abhängige Gerinnungsfaktor ohne enzymatische Aktivität.

Klinisch kann sowohl der unterschiedlich starke Mangel des Protein C-Antigens als auch die Verminderung dessen enzymatischer Aktivität relevant werden.¹² Dabei herrschen jedoch im Ausmaß der Symptome starke Unterschiede zwischen

Individuen mit einem heterozygoten und homozygoten Protein-C-Mangel.¹² Diese reichen von einem normal hohen Thromboserisiko, bis hin zu nicht mit dem Leben vereinbaren Krankheitsbildern, die bereits im Neugeborenenalter auftreten.¹²

Eine weitere Mutation, die sogenannte Faktor-V-Leiden-Mutation, welche in Europa sehr verbreitet ist, hat eine Auswirkung auf das Protein C- und S-System.²¹ Sie stellt in Europa den häufigsten angeborenen Thrombose-Risikofaktor dar und gilt als die gängigste Ursache einer APC-Resistenz, also einer verlangsamten Inaktivierung des Faktor-V durch aktiviertes Protein C (APC).¹² Dabei ist das angeborene Thromboserisiko (Thrombophilie) bei heterozygoten Anlageträgern 5-10fach, bei homozygoten Anlageträgern 50-100fach erhöht.²¹

Allerdings kann diesem erhöhten Thromboserisiko kurzfristig durch sportliche Aktivität vorgebeugt werden, da es nach sportlicher Belastung zu einer vermehrten Ausschüttung des Fibrinolysefaktor t-PA kommt und dadurch die Thrombus-Bildung verringert wird.⁵

1.6.2 Antithrombin-Heparansulfat-System

Antithrombin (AT) ist ein Serinproteaseinhibitor, welcher in der Lage ist, einen Komplex mit Thrombin (Faktor IIa), Faktor X und anderen aktivierten Gerinnungsfaktoren einzugehen und deren enzymatische Aktivität irreversibel zu blockieren.¹²

Mithilfe von Heparansulfat, einem auf Endothelzellen lokalisiertem Polysaccharid, wird eine Konformationsänderung des AT-Moleküls ausgelöst, welche dessen Reaktionsgeschwindigkeit mit den Gerinnungsfaktoren ca. um das Hundertfache steigert.¹² Durch das Antithrombin-Heparansulfat-System wird also über lokale Mechanismen eine Gerinnungshemmung erreicht und dadurch eine ungehemmte Durchblutung der Mikrozirkulation gewährleistet.⁷

Therapeutisch macht man sich diesen Mechanismus bei Verwendung der Heparinen zunutze, welche aus Schweinedarmschleimhäuten isoliert und gegebenenfalls modifiziert werden (siehe Kapitel 1.5.2.2)²².

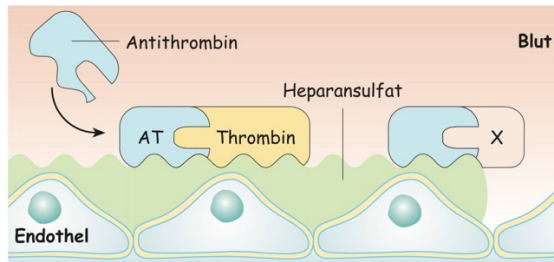


Abbildung 5: Wirkungsweise des Antithrombin-Heparansulfat-Systems

1.6.3 Prostazyklin-Thromboxan-System

Ganz allgemein stellen Eicosanoide lokale Gewebshormone dar, die ihre Wirkung in unmittelbarer Umgebung ihres Entstehungsortes entfalten.¹² Sie haben unterschiedliche lokale Wirkungen wie zum Beispiel die Regulation des Gefäßtonus, der Gefäßpermeabilität oder die Aggregation von Thrombozyten.¹² Chemisch leiten sich die Eicosanoide von mehrfach ungesättigten Fettsäuren ab und werden mit Hilfe der Cyclooxygenasen durch die Modifikation der 20 Kohlenstoffatome langen Arachidonsäure hergestellt.^{23,24}

Von besonderer Bedeutung für die Hämostase sind dabei die beiden Eicosanoide Prostazyklin und Thromboxan A_2 , welche teilweise gegensätzliche Wirkungen aufweisen: Während das von Blutplättchen gebildete TXA_2 vasokonstriktorisch wirkt und die Aggregation der Thrombozyten fördert, führt Prostazyklin zu einer Vasodilatation und hemmt die Thrombozytenaggregation.¹²

Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) greifen wesentlich in den Arachidonsäure-Stoffwechsel ein und entfalten dadurch in konzentrations- und substratabhängiger Weise antipyretische, antiinflammatorische, analgetische und thrombozytenaggregationshemmende Wirkungen (siehe Kapitel 1.5.2).

1.7 Inhibitoren der Hämostase

Durch die genaue Untersuchung und ein besseres Verständnis der Blutgerinnung wurde für die Entwicklung von gerinnungshemmenden Stoffen der Grundstein gelegt. Diese sind in vielerlei Hinsicht enorm wichtig und aus der täglichen klinischen Routine und Forschung nicht mehr wegzudenken. Gerinnungshemmer werden sowohl therapeutisch als für die klinische Diagnostik sehr häufig verwendet.

Da sich diese Diplomarbeit mit den antikoagulatorischen Eigenschaften von EP beschäftigt, ist es sinnvoll, an dieser Stelle ein wenig genauer auf die gängigen Antikoagulantien und Thrombozytenaggregationshemmer einzugehen und deren Wirkungsweise in groben Zügen zu beschreiben.

1.7.1 Gerinnungshemmung *in vitro*

In der klinischen Routine, wie zum Beispiel bei der Gerinnungsdiagnostik, Blutgruppenbestimmung oder beim Erstellen eines Blutbildes, ist es häufig notwendig, frisch gewonnenes Blut ungerinnbar zu machen. Dadurch verhindert man die Bildung von Fibringerinnseln. In der Gerinnungsdiagnostik kann man die Gerinnung zu einem späteren Zeitpunkt durch Zugabe von Gerinnungsaktivatoren (z.B. Ca^{2+} , TF) ablaufen lassen und diese messen.

Standardmäßig werden dabei Komplexbildner (häufig Chelatoren) verwendet, welche in der Lage sind, Ca^{2+} abzufangen. Da Kalzium für das Ablaufen der Gerinnungskaskade notwendig ist, wird das Blut durch den Entzug von Ca^{2+} ungerinnbar gemacht.²⁵ Dabei wird das Blut mit folgenden, in den Abnahmeröhrchen bereits vorgelegten Antikoagulantien in Kontakt gebracht: Na^+ -EDTA, Na^+ -Citrat, Na^+ -Oxalat, Na^+ -Fluorid.²⁶

1.7.2 Hemmung der Hämostase *in vivo*

Es gibt eine Vielzahl an Krankheitsbildern, bei denen Patienten und Patientinnen eine gerinnungs- und/oder thrombozytenaggregationshemmende Therapie benötigen. In aller Regel sind diese Krankheiten mit einer erhöhten Neigung zu Gerinnselbildungen assoziiert, welche sich in diversen Abschnitten des Herz-Kreislaufsystems manifestieren können.

Im Allgemeinen können Medikamente, welche die Hämostase hemmen, sowohl auf Ebene der Thrombozyten (Thrombozytenaggregationshemmer) als auch der plasmatischen Gerinnung (Antikoagulantien oder Gerinnungshemmer) in die Blutgerinnung eingreifen. Als grobe Faustregel werden dabei Thrombozytenaggregationshemmer zur Thromboseprophylaxe im arteriellen Schenkel (z.B. bei pAVK, Zustand nach Insult, akuter Myokardinfarkt) verwendet, während Antikoagulantien im venösen Schenkel (Pulmonalarterienembolie,

Vorhofflimmerarrhythmie, tiefe Beinvenenthrombose, mechanische Herzklappen) ihre prophylaktische Wirkung entfalten.²⁷

Thrombozytenaggregationshemmer wirken, wie der Name schon erahnen lässt, auf unterschiedliche Vorgänge, welche zur Thrombozytenaggregation beitragen. Der bekannteste Wirkstoff dieser Gruppe stellt sicherlich die Acetylsalicylsäure dar, welche schon in kleinen Dosen (30-50 mg) als Hemmstoff der Cyclooxygenase-1 (COX-1) wirkt und dadurch die Synthese von Thromboxan A₂ inhibiert. Da Thrombozyten keinen Zellkern haben und nicht zur Neusynthese der COX-1 befähigt sind, wirkt Acetylsalicylsäure etwa so lang wie die durchschnittliche Lebensdauer eines Blutplättchens (8-11 Tage).

Weitere Thrombozytenaggregationshemmer binden selektiv an Oberflächenrezeptoren der Blutplättchen, welche der Aggregation dienen und blockieren diese:

Beispiele dafür sind ADP-Rezeptorblocker (z.B. Clopidogrel, Ticagrelor, Cangrelor).²⁸ Außerdem kann die Inhibition des GP-IIb/IIIa zu einer effizienten Plättchenhemmung führen (z.B. Eptifibatid, Abcixiban, Tirofiban).²⁹

Die heutzutage häufig eingesetzten Antikoagulantien (Gerinnungshemmer) haben prinzipiell alle das Ziel, die Bildung und Wirkung von Thrombin (FIIa), dem zentralen Molekül der Blutgerinnung, herabzusetzen.³⁰ Diese Hemmung kann auf verschiedenen Stufen der Gerinnungskaskade erfolgen (z.B FXa oder FIIa).³⁰

Ein wichtiger Vertreter der Gerinnungshemmer stellt das Heparin und dessen Abkömmlinge dar. Heparin wird auch als indirektes Antikoagulans bezeichnet, weil es über eine etwa tausendfache Verstärkung des endogenen antithrombotischen Moleküls AT seine Wirkung entfaltet.³⁰

Das in der Leber produzierte Plasmaprotein AT gilt als der wichtigste antithrombotische Faktor im menschlichen Körper.⁵ Es ist als Serinproteaseinhibitor (Serpine) in der Lage, an die Gerinnungsfaktoren FXa und FIIa zu binden und diese zu inaktivieren.⁵ Unter normalen Bedingungen wirkt AT nur sehr schwach, weshalb es auf Heparin als Wirkungsverstärker angewiesen ist.

In der Heparintherapie unterscheidet man fraktionierte (niedermolekulare Heparine, NMH) von unfraktionierten (hochmolekulare Heparine, UFH) Heparinen.⁵ Während unfraktioniertes Heparin unter anderem die Faktoren Xa und IIa hemmen kann, inhibiert fraktioniertes Heparin hauptsächlich Faktor Xa.⁵ Dies ist darin

begründet, dass für die Inaktivierung von Thrombin eine direkte Interaktion zwischen Heparin und Thrombin notwendig ist, was aufgrund der Molekülgröße nur bei unfraktioniertem Heparin möglich ist.¹² Weder unfraktionierte, noch fraktionierte Heparine sind oral wirksam, sie müssen daher intravenös bzw. subcutan injiziert werden, damit entsprechende Wirkspiegel erreicht werden können.³⁰

Eine weitere wichtige Klasse der Gerinnungshemmer stellen die sogenannten Cumarine (Vitamin-K-Antagonisten) dar, welche die enzymatische Aktivierung von Vitamin-K-Epoxid zu Vitamin-K-Hydrochinon hemmen.³⁰ Die gerinnungshemmende Wirkung dieser Medikamente ist darin begründet, dass die Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X (siehe Kapitel 1.3) in der Leber nicht carboxyliert werden, was deren biologische Aktivität deutlich reduziert (10-40% der normalen Aktivität).³⁰

Da Cumarine nicht auf bereits synthetisierte Gerinnungsfaktoren wirken, ist zu beachten, dass erst nach einiger Zeit (frühestens am 3. Tag nach Therapiebeginn) ein signifikanter Hemmeffekt der Blutgerinnung eintritt.³⁰ Zudem ist bei Therapieeinleitung und Überwachung von Nebenwirkungen auf folgenden Umstand besonders Acht zu geben: Auch die antikoagulatorischen Faktoren Protein C und S müssen von Vitamin-K Carboxyliert werden, um biologisch aktiv zu sein.³⁰ Da jedoch die Halbwertszeit von Protein C mit 6 Stunden deutlich kürzer ist als die von Faktor II (>50h), kommt es zunächst nach Einleitung einer Cumarin-Therapie zur Hemmung eines wichtigen antikoagulatorischen Faktors, was ein anfänglich erhöhtes Thromboserisiko zur Folge hat.³⁰ Um dieser unerwünschten Nebenwirkung vorzubeugen, ist es notwendig, den Patienten und Patientinnen zu Beginn einer Cumarin-Therapie mittels Heparin (i.d.R. NMH) zu antikoagulieren, bis die gewünschte Cumarinwirkung erreicht wird. Die Messung der gewünschten gerinnungshemmenden Wirkung erfolgt mit Hilfe der *international normalized ratio* (INR), welche die Funktionsleistung des extrinsischen Systems der Blutgerinnung widerspiegelt.³¹ Je größer der INR-Wert ist, desto höher das Ausmaß der Gerinnungshemmung.³¹ In der Regel (z.B. bei Zustand nach Vorhofflimmern, Lungenembolie oder tiefer Venen Thrombose) sollte der INR-Zielwert zwischen 2 und 3 liegen.³¹

Die neuesten, seit dem Jahr 2008 am Markt erhältlichen Gerinnungshemmer heißen „neue orale Antikoagulantien“ (NOAKs, direkte orale Antikoagulantien, DOAKs). Im Unterschied zu Cumarinen und Heparinen wirken DOAKs auf eine

direkte Weise gerinnungshemmend (nicht über den Vitamin-K-Mechanismus oder die Affinitätsverstärkung von Antithrombin), indem sie entweder Thrombin (Dabigatran) oder Faktor Xa (z.B. Apixaban, Rivaroxaban, Edoxaban) direkt hemmen.³² Dabei ergeben sich in der Therapie einige Vorteile gegenüber den indirekt wirkenden Cumarinen, was in der klinischen Routine zu einer zunehmenden Ablösung der Vitamin-K-Antagonisten durch DOAKs führt.³² Ein Nachteil der neuen Wirkstoffklasse war die bis dato eingeschränkte Verfügbarkeit eines Antidots, welches in Notfallsituationen oder bei Blutungskomplikationen die Wirkung der Antikoagulantien aufhebt.³³ Nachdem für Dabigatran 2015 das Antidot Idarucizumab zugelassen wurde, wurde im Jahr 2019 nur eine „bedingte“ Empfehlung für die Zulassung von Ondexxya, einem Antidot gegen Apixaban und Rivaroxaban, ausgesprochen.³⁴

1.8 Die biochemischen Eigenschaften von EP

EP (siehe Abbildung 7) ist eine chemische Verbindung aus der Gruppe der Pyruvate.³⁵ Pyruvat (siehe Abbildung 6), das Anion der Brenztaubensäure, ist das Endprodukt der Glykolyse. Dort spielt es also eine zentrale Rolle im anaeroben und aeroben Stoffwechsel des Menschen.³⁶ EP, welches nicht im menschlichen Körper vorkommt, wird durch Oxidation von Milchsäureethylester mit Kaliumpermanganat gewonnen.³⁵ Es liegt bei Raumtemperatur als Flüssigkeit vor (Siedepunkt 165°C, Schmelzpunkt 12°C) und ist wasserlöslich.³⁵

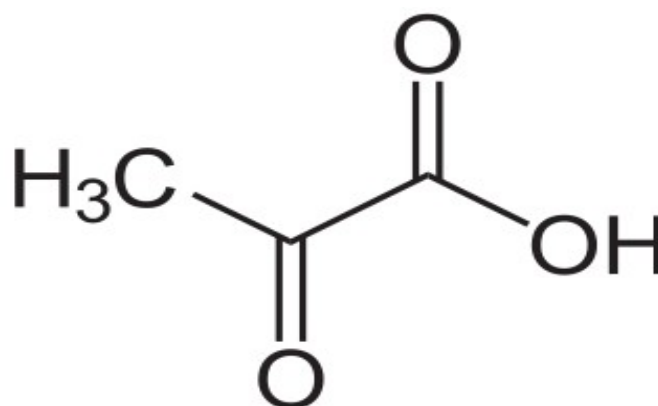


Abbildung 6: Strukturformel von Pyruvat

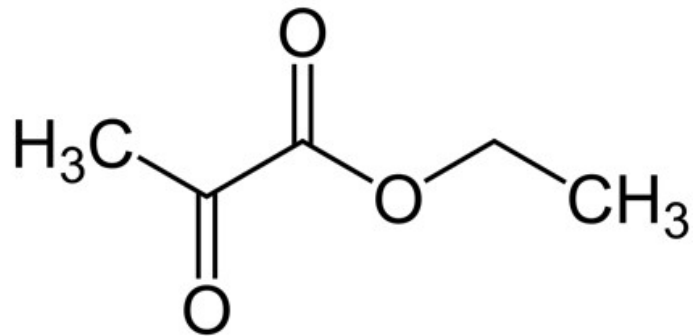


Abbildung 7: Strukturformel von EP

Die meisten bisherigen Untersuchungen von EP erfolgten in Form von präklinischen Experimenten, welche sowohl unter *in vitro*- als auch *in vivo*-Bedingungen durchgeführt wurden.

In der von Kenneth K. Kao *et al.* verfassten Literaturübersicht wird auf das bisher erlangte Wissen über die antiinflammatorischen und zytoprotektiven Eigenschaften des Stoffes eingegangen.³⁷ Einleitend werden die biochemischen Eigenschaften von Pyruvat beschrieben und die Vorteile seines Derivates EP erläutert.³⁷ EP sei laut den Untersuchungen von Sims *et al.* in wässrigen Lösungen wesentlich stabiler als Pyruvat.³⁸ Seit dem effektiven Einsatz von EP in Mausexperimenten im Jahre 2001 wurden mehr als 150 wissenschaftliche Arbeiten über EP veröffentlicht.^{37,38} Die Forschungsgruppe um Carrie A. Sims postulierte außerdem, dass die Stabilität von EP in wässriger Lösung nur temporär gegeben sei, was den Anwender dazu zwingt, die Lösung unmittelbar vor dem experimentellen Einsatz herzustellen.³⁸ Im nächsten Teil der Übersichtsarbeit wird auf die bis dato erforschten, entzündungshemmenden Eigenschaften von EP eingegangen.³⁷

Einen wesentlichen Beitrag zu den antiinflammatorischen Eigenschaften von EP leisteten die Forscher und Forscherinnen Yang *et al.*, welche hämorrhagische Schocks an Mäusen auslösten, um den Einfluss von EP auf dieses Krankheitsbild zu evaluieren.³⁹ Positive antiinflammatorische Effekte von EP konnten anhand folgender Parameter gezeigt werden: Unter Einfluss von EP kam es zu einer verminderten Aktivierung und Bindung des proinflammatorischen Faktors *nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells* (NF-κB).³⁹ Des Weiteren wurde die Expression der mRNA von Tumor Nekrose Faktor (TNF), Cyclooxygenase (COX-2), Interleukin-6 (IL-6) und induzierbaren Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) durch EP herabgesetzt.³⁹

Zu einem späteren Zeitpunkt wurden diese Untersuchungen von Ulloa *et al.* erweitert, indem Mausmakrophagen der Zelllinie RAW 264.7 mit Lipopolysaccharid (LPS, Bestandteil der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien) behandelt wurden, was unter anderem zu einer Sekretion des proinflammatorischen Faktors TNF führte.⁴⁰ Die Sekretion dieses Proteins konnte durch die Verabreichung von EP erfolgreich inhibiert werden.⁴⁰ Außerdem konnten Ulloa *et al.* zeigen, dass das Überleben von Mäusen im septischen Schock- ausgelöst durch die Infusion einer letalen Dosis von LPS oder die Ligatur und anschließende Punktion des Blinddarmes- infolge der Verabreichung von EP verbessert werden konnte.⁴⁰ Eine Reihe weiterer Publikationen bestätigte und erweiterte die Forschungsergebnisse in Bezug auf die antiinflammatorischen Wirkungen von EP.³⁷

Mit Hilfe einer Reihe von Untersuchungen an endotoxämischen Ratten konnte eine Forschungsgruppe aus Taiwan 2011 die antikoagulatorischen Eigenschaften von EP nachweisen.³ Wie in diesen Untersuchungen gezeigt wurde, wird die Expression des TF durch die Verabreichung von EP herunterreguliert, was als wichtige Grundlage für die Untersuchungen dieser Diplomarbeit dient.³ Außerdem kam es durch die Verabreichung von EP zu einer Reduktion der Plasmakonzentrationen von TNF- α , was das bisherige Wissen über die antiinflammatorischen Wirkungen des Stoffes erweiterte.³

Ziel dieser Diplomarbeit ist die genaue Untersuchung der antikoagulatorischen Wirkung von EP im Vollblut und plättchenfreien Plasma (PPP). Dadurch könnte man der Beantwortung der Frage, ob EP in die klinische Therapie integriert werden sollte, näher kommen.

2 Material und Methoden

Konventionelle Globaltests der Blutgerinnung, wie die Bestimmung der Prothrombinzeit (PT), der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (APTT), der Plättchenzahl und Fibrinkonzentration sowie der Spaltprodukte (z.B. D-Dimere) stellen die gängigsten diagnostischen Parameter der Blutgerinnung dar. Obwohl diese Laborparameter sehr wichtig für die klinisch-chemische Routinediagnostik sind, haben diese einige Limitationen: Sie geben keine Auskunft über die Thrombozytenfunktion und sind nicht in der Lage, die dynamischen Prozesse der Blutgerinnung und Fibrinolyse zu messen.⁴¹ Des Weiteren werden die herkömmlichen Globaltests der Gerinnung in Plasma durchgeführt, was die Bedingungen *in vivo* nicht so gut widerspiegelt wie Messungen an Vollblutproben.⁴¹

Heutzutage stehen aber Messmethoden zur Verfügung, mit deren Hilfe man komplexe Fragestellungen auch in physiologisch wichtigen Vollblutproben untersuchen kann. Beispiele dafür sind Methoden wie die Thrombozytenaggregometrie, die Thrombelastometrie, der Platelet Function Analyzer und die Thrombozytenadhäsion, mit denen im Rahmen dieser Diplomarbeit gearbeitet wurde.

Mit Hilfe dieser Methoden kann sowohl die Thrombozytenfunktion als auch die Gerinnungskaskade auf unterschiedlichen Ebenen evaluiert werden und der Einfluss anderer Faktoren (wie z.B. Zusammensetzung des Blutes, eingesetzte Aktivatoren der Blutgerinnung, Additivlösungen wie EP oder Medikamentenwirkungen) gemessen werden.

2.1 Probengewinnung und -vorbereitung

Die verwendeten Blutproben von gesunden Spendern wurden von der Universitätsklinik für Transfusionsmedizin und Blutgruppenserologie des LKH Graz zur Verfügung gestellt. Als erstes wurde ein EDTA-Blutröhrchen durch Punktion der Cubitalvene mit Vollblut befüllt, welches später für die Erstellung des kleinen Blutbildes verwendet wurde. Anschließend wurden 9 ml Vollblut aus derselben Vene entnommen und in ein Citrat-Blutröhrchen eingefüllt. Messungen an Vollblutproben (Impedanzaggregometrie, Trombelastometrie, Plättchenfunktion und -adhäsion) wurden innerhalb von 3 Stunden nach der Blutabnahme durchgeführt. Das überbleibende Vollblut wurde in weiterer Folge zentrifugiert (20 min bei

Raumtemperatur), das PPP abpipettiert und für die Messung der APTT, PT und Thrombingeneration verwenden.

2.2 Thrombozytenaggregometrie

Mit Hilfe dieser Untersuchung ist es dem Beobachter möglich, die Funktion der Thrombozyten basierend auf deren Aggregationsfähigkeit zu evaluieren.⁵ Besonders wichtig ist diese Technik in der klinischen Routine zur Feststellung von seltenen Thrombozytenfunktionsstörungen (z.B. Bernard-Soullier Syndrom oder Thrombastenie Glanzmann) und zur Überprüfung der Wirksamkeit von Plättchenhemmern.⁵ Dabei unterscheidet man zwei verschiedene technische Ausführungen der Aggregometrie: Die Lichttransmissionsaggregometrie nach Born und die Impedanzaggregometrie nach Cardinal.^{42,43}

2.2.1 Lichttransmissionsaggregometrie nach Born

Entwickelt wurde die Technik im Jahre 1963 von Born, mit der Intention, die Thrombozytenfunktion besser untersuchen zu können.^{5,43}

Die Untersuchung basiert auf einer photometrischen Messung von plättchenreichem Plasma (PRP), welches vorab aus einer Vollblutprobe durch Zentrifugation bei niedriger G-Zahl gewonnen wird.⁴³ Infolgedessen werden Leukozyten und Erythrozyten aus dem Plasma entfernt, die kleineren Blutplättchen bleiben jedoch aufgrund ihrer geringen Masse zurück.⁴³ Nachdem das PRP in eine lichtdurchlässige Küvette überführt wird, kann die Messung der Lichttransmission durchgeführt werden. Anschließend wird die Thrombozytenaggregation mit Hilfe eines Agonisten (wie z.B. Adenosindiphosphat, Epinephrin oder Kollagen) stimuliert, wodurch die Lichtdurchlässigkeit zunimmt (siehe Abbildung 9).⁴³ Die Transmissionszunahme wird dann solange gemessen bis die Aggregation ihr Maximum erreicht.

Eine beispielhafte Transmissionskurve ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Die folgenden Punkte sind dabei von besonderer Relevanz: Nach Zugabe eines Agonisten (1) kommt es zu einer stetigen Zunahme der Aggregatbildung (2), bis die Transmission schließlich ihre Plateauphase (3) bei der maximalen Aggregation erreicht.^{5,44}

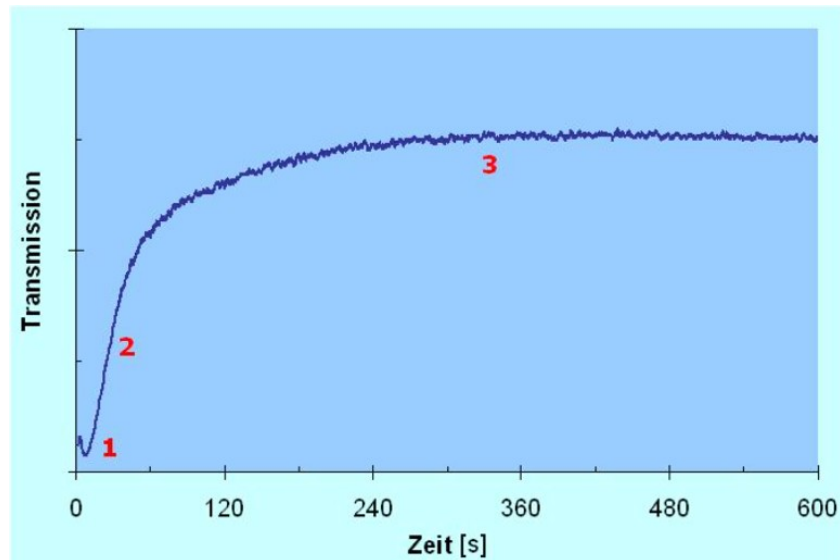


Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der Transmissionskurve (Aggregometrie nach Born) ⁴⁴

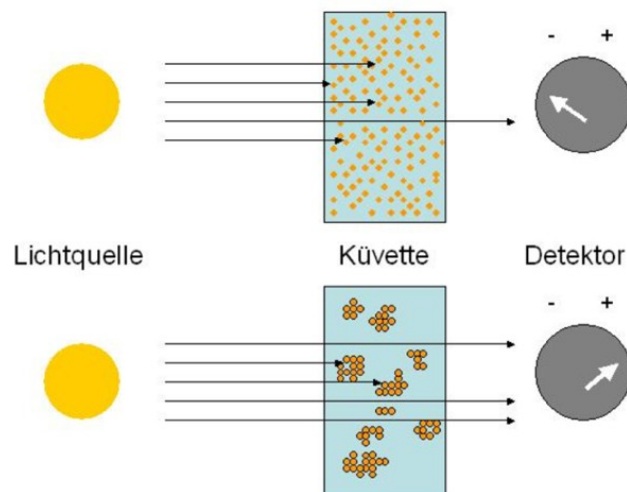


Abbildung 9: Schematische Darstellung der photometrischen Messung vor (oben) und nach (unten) der Thrombozytenaggregation ⁴⁴

2.2.2 Impedanzaggregometrie nach Cardinal

Der wesentliche Vorteil des von Cardinal und Flower entwickelten Verfahrens besteht darin, dass die Thrombozytenaggregation im Vollblut bestimmt werden kann und somit *in vivo*-Bedingungen besser widerspiegelt.⁵ Für die Untersuchung reichen in der Regel 300–500µl Vollblut.⁴² Für diese Diplomarbeit wurde mit dem Whole Blood Aggregometer Model 700 von der Firma Crono-Log Cooperation (Havertown,

Pennsylvania, USA) gearbeitet, welches nach dem von Cardinal erfundenen Prinzip funktioniert.⁴⁵

Nach der initialen Anlagerung der Thrombozyten an die Elektroden pendelt sich die Impedanz nach einer gewissen Zeit auf einem konstanten Niveau ein.⁴² Die Messung erfolgt grundsätzlich über zwei Elektroden, welche beide in die Blutprobe eingetaucht werden.^{5,42} Sobald elektrische Spannung an die Elektroden angelegt wird, kommt es zu einer Aggregation der durch Aktivatoren der Blutgerinnung aktivierten, negativ geladenen Thrombozyten an den Elektroden. Die aggregierten Thrombozyten führen zu einer Impedanzerhöhung (d.h. Zunahme des elektrischen Widerstandes), was eine Verringerung des Stromflusses zur Folge hat.⁴² Die über die Zeit zunehmende Umhüllung der Messelektroden durch die Thrombozyten erlaubt einen Rückschluss auf den dynamischen Prozess der Thrombozytenaggregation.⁴² Diese kann durch verschiedene Stoffe beeinflusst werden. Auch in der klinischen Labordiagnostik wird dieses Verfahren verwendet, um die Plättchenfunktion zu bestimmen.⁴² Das Ergebnis dieser Messung wird wie in Abbildung 7 graphisch dargestellt und ist anhand der drei Parameter Amplitude, *slope* und *lag time* (LT) zu evaluieren.

Dabei gibt die Amplitude den maximalen Ausschlag der Aggregationskurve an und ist ein Maß für die Stärke der Aggregation.^{5, 42} Die LT bestimmt den Beginn der Aggregationsphase. Die *slope* ist die Steilheit der Kurve, welche als Maß der Aggregationsgeschwindigkeit dient.^{5, 42}



Abbildung 10: Chrono-Log Whole Blood Aggregometer Model 700

2.2.3 Multiple Elektroden-Aggregometrie

Die multiple Elektroden-Aggregometrie basiert auf dem gleichen elektrophysikalischen Prinzip wie die Aggregometrie nach Cardinal.

Der wesentliche Unterschied liegt darin, dass 4 Elektroden gleichzeitig die Thrombozytenaggregation und -funktion an verschiedenen Messeinheiten messen, weshalb die Technik in der klinischen Labordiagnostik Anwendung findet.⁵ Daher ist es in der klinischen Diagnostik möglich, das gerinnungsfähige Patienten- und Patientinnenvollblut mehreren Thrombozytenaggregationshemmern gleichzeitig auszusetzen und die individuelle Wirksamkeit der verschiedenen Substanzen in separaten Aggregationskurven auszuwerten (siehe Abbildung 12).^{5,46}

Überprüft wird der Einfluss der drei wichtigsten Gruppen von Plättchenhemmern auf die Plättchenfunktion mit folgenden Tests (siehe Abbildung 11):⁵

- Cyclooxygenasehemmer wie Acetylsalicylsäure (Aspirin[®], Thrombo-ASS[®]), mit Hilfe des sogenannten „ASPI-Tests“, durch Zusetzen von Arachidonsäure (Substrat der Cyclooxygenasen)^{46,47}

- ADP-P2Y₁₂-Rezeptorhemmer wie Clopidogrel, Prasugrel und Ticlopidin mithilfe des ADP-Tests (Adenosindiphosphat-Test) ^{46,47}
- GP-IIb/IIIa wie Abciximab und Tirofiban mithilfe des sogenannten TRAP-Tests ^{46,47}

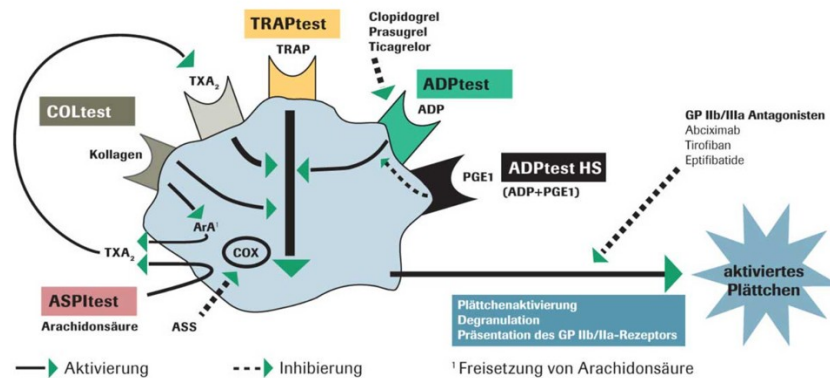
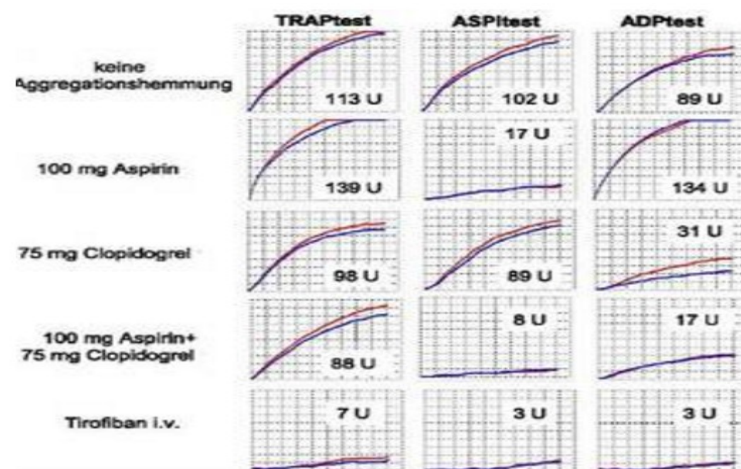


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Wirkmechanismen



unterschiedlicher Plättchenhemmer

Abbildung 12: Charakteristische Veränderungen der Aggregationskurven nach Zusatz unterschiedlicher Plättchenhemmer

2.3 Thrombelastometrie

Ein wichtiger globaler Test zur Bestimmung der primären und sekundären Hämostase ist die Thrombelastometrie. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde das Gerät ROTEM 05 von der Firma Matel Medizintechnik (Hausmannsstätten, Steiermark, Österreich) verwendet (siehe Abbildung 13).⁴⁵ Sie wurde im Jahre 1948

von Hellmut Hartert an der Medizinischen Universität Heidelberg entwickelt.⁴⁸ Dabei können Messungen an Citrat-Vollblut, reinem Vollblut oder Citrat-Plasma durchgeführt werden.⁴⁵

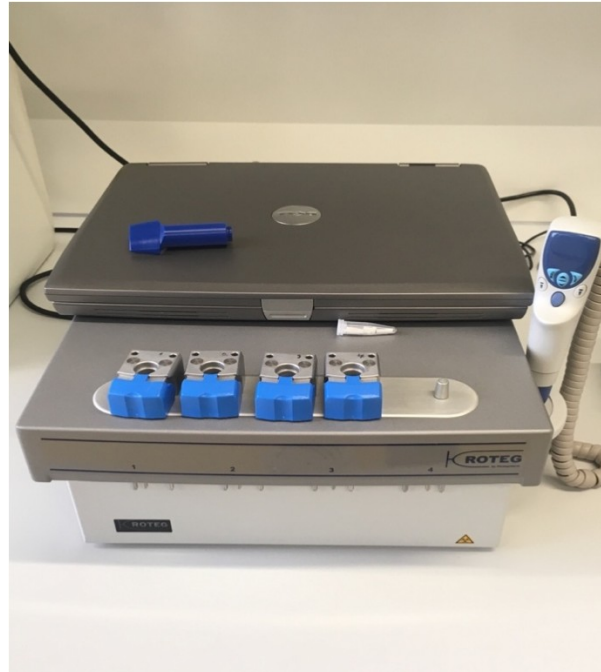


Abbildung 13: ROTEG 05 Rotationselastometer

Durch die Wahl des Thrombozytenaktivators (TF für eine extrinsische Aktivierung oder Oberflächenkontakt für eine intrinsische Aktivierung) kann bevorzugt der intrinsische (INTEM) oder extrinsische (EXTEM) Weg der Blutgerinnung analysiert werden.^{45,49} INTEM analysiert die Gerinnungsfaktoren I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII, die Thrombozytenfunktion und die Fibrinolyse.⁴⁹ Dahingegen erlaubt EXTEM Rückschlüsse auf die Faktoren I, II, V, VII, X, die Thrombozytenfunktion und die Fibrinolyse.⁴⁹ Interessant ist dabei, dass unterschiedliche Stadien der Gerinnungsbildung beobachtet werden können: Die viskoelastischen Eigenschaften des Blutes können sowohl im Rahmen der Verfestigung des Blutgerinnsels als auch während der später einsetzenden Fibrinolyse graphisch dargestellt werden.⁴⁵ Dadurch kann die Gerinnungsbildung und -auflösung dynamisch gemessen und beurteilt werden.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde mit Citrat-Vollblut-Proben gearbeitet. Die Proben wurden unmittelbar vor der Messung auf 37°C erwärmt. Als Aktivator wurde

ein Gemisch aus TF und CaCl_2 verwendet, um den extrinsischen Weg zu aktivieren. Die Konzentration des TF betrug 0,35 pmol/L, jene von CaCl_2 3 mmol/L.

Die Technik beruht darauf, dass in die mit Vollblut gefüllte Testkanüle ein Stempel eingetaucht wird, der in alternierendem Drehsinn um einen Winkel von $4,75^\circ$ rotiert. Das Rotationsausmaß dieses Stempels wird mittels Bewegungssensor registriert, vom Computer berechnet und die Bewegungsamplitude gegen die Zeit aufgetragen.⁴⁵ Abschließend wird diese Amplitudenkurve vom Untersucher ausgewertet, um detaillierte Informationen über die Blutgerinnung zu erhalten.⁴⁵

Für die Auswertung des Thrombelastogrammes sind einige Parameter relevant: Die *coagulation time* (CT) beschreibt jene Zeitdauer, die von Zugabe der Aktivierungslösung bis zum Eintritt der Gerinnselformung verstreicht.⁵⁰ Ein weiteres, wichtiges Zeitintervall ist die *clot formation time* (CFT), welche mit Ende der CT beginnt und dann endet, wenn die Bewegungsamplitude 20 mm erreicht.^{41,41} Die Amplitude der Aggregationskurve ist ein wichtiger Parameter um die Festigkeit des Gerinnsels zu messen. Dabei entspricht die Bewegungsamplitude bei uneingeschränktem Rotationsausmaß zu Beginn der Messung 0, sobald die Rotation vollständig sistiert, ist eine Bewegungsamplitude von 100 mm erreicht.⁵⁰ Um die größte Festigkeit des Gerinnsels zu bestimmen, ist die *maximum clot firmness* (MCF) heranzuziehen.^{41,45} Zuletzt kann die Kinetik (also Geschwindigkeit) der Gerinnselformung mit Hilfe des Winkels α angegeben werden, welcher geometrisch die Tangente der Kurve bei einer Bewegungsamplitude von 20 mm ist.⁴⁵ Wenn die Gerinnselformung schnell vonstattengeht, ist dieser Winkel groß und die Tangente steil, da die Bewegungsamplitude von 20 mm nach kurzer Zeit erreicht ist. Eine schematische Darstellung der Messtechnik und Aggregationskurve inklusive gemessener Parameter ist in Abbildung 14 und 15 bildlich dargestellt.

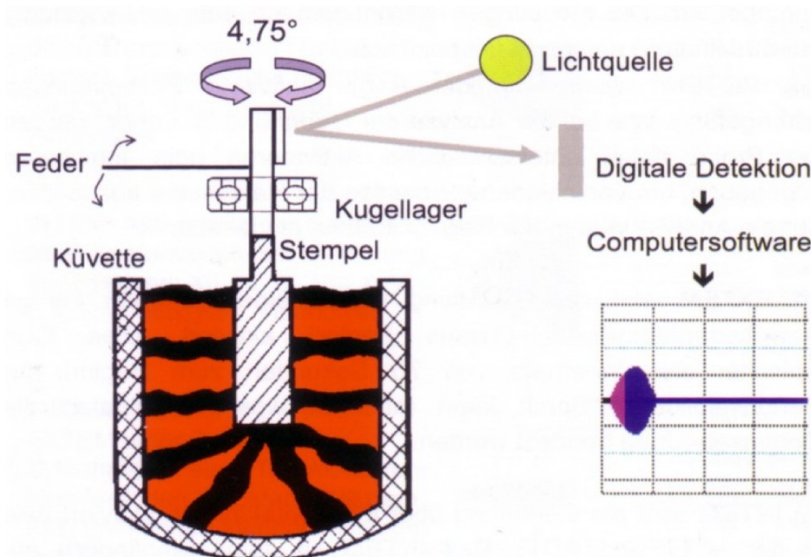


Abbildung 14: Schematischer Aufbau eines Rotationselastometers

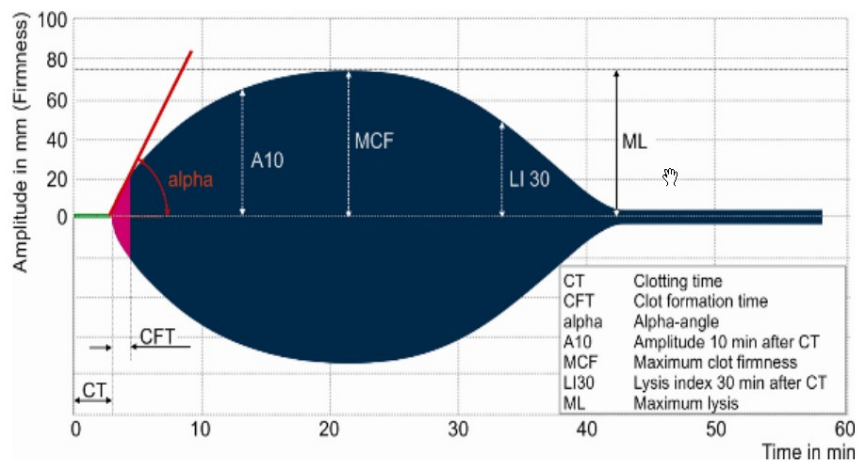


Abbildung 15: Darstellung einer Aggregationskurve
(inklusive interessierende Messparameter)

2.4 Thrombozytenadhäsion

In dieser Diplomarbeit wurde die Thrombozytenadhäsion an Vollblutproben mit Hilfe des Modells Impact-R der Firma Diamed Haemostasis AG (Chambly, Frankreich) gemessen (siehe Abbildung 16).⁴⁵

Als Probenmaterial wurde Zitrat-Vollblut in durchsichtige Polystyrol-Behältnisse pipettiert und 2 Minuten einer Rotationsbewegung ausgesetzt, um arterielle Flussbedingungen nachzustellen.⁴⁵ Infolgedessen kam es zu einer Thrombozytenadhäsion am Gefäßboden. Anschließend wurde das mit Thrombozyten beschichtete Polystyrol-Gefäß vorsichtig mit destilliertem Wasser

ausgespült, um die überschüssigen Blutbestandteile zu entfernen.⁴⁵ Vor dem letzten Schritt wurden die wandständigen Thrombozyten mit einer May-Grünwald-Lösung angefärbt, um sie anschließend fotografisch detektieren zu können.⁴⁵ Abschließend wurden die Proben mittels Rotation in 7 verschiedene Positionen gebracht, in denen sie abfotografiert wurden.⁴⁵

Die interessierenden Parameter wurden zum Schluss vom Computer ausgewertet: Die *surface coverage* (SC) stellt dabei den Anteil der Objektträgeroberfläche dar, welcher mit Thrombozyten besetzt ist. Die *average size* (AS) misst die durchschnittliche Größe der Plättchenaggregate, während die Gesamtanzahl der Aggregate der dritte zu bestimmender Parameter ist.⁴⁵ Mit Hilfe dieser Kennzahlen ist es dem Beobachter möglich, eine Aussage über die Thrombozytenfunktion unter Scherstress im Vollblut zu treffen.



Abbildung 16: Diamed Impact-R

2.5 Platelet Function Analyzer (PFA-200)

Der PFA-200 eignet sich sehr gut für die klinische Routinediagnostik, was vor allem daran liegt, dass der PFA-200 schnell (5-8 min), kostengünstig und mit einer hohen Sensitivität angeborene, erworbene und medikamenteninduzierte Störungen der Thrombozytenfunktion (Thrombozytopathien) in Patienten- und Patientinnenvollblut detektieren kann.⁵¹ Daher dient das Gerät nicht nur als Screeningmethode für Thrombozytenfunktionsstörungen, sondern auch dem präoperativen Monitoring (v.a. in der Herzchirurgie, bei Lebertransplantationen und in

der Geburtshilfe) und der Forschung.⁵¹ Untersucht wird am PFA-200 ausschließlich die primäre Hämostase. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde mit dem Model Innovance PFA-200 von der Firma Siemens (Berlin und München, Deutschland) gearbeitet.⁴⁵

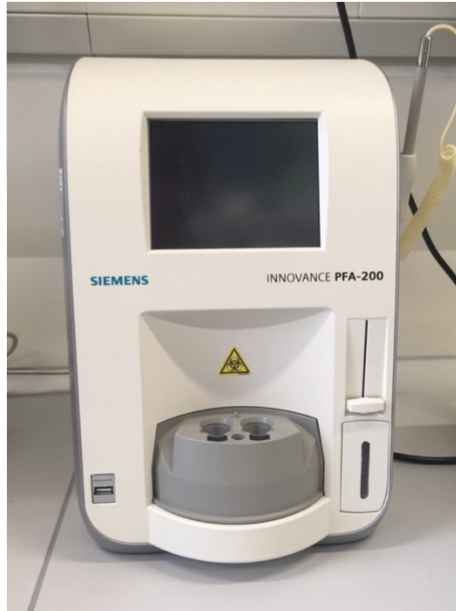


Abbildung 17: Innovance PFA-200

Das Prinzip des PFA-200 basiert darauf, dass das verwendete Vollblut durch eine Kapillare gesaugt wird, um am Ende des Röhrchens mit einer beschichteten Membran in Kontakt zu kommen.^{52,51} Diese Membran ist entweder mit Kollagen/ Epinephrin oder Kollagen/ ADP beschichtet.⁵² Somit werden die Thrombozyten durch unterschiedliche Stoffe stimuliert, was in vielen Fällen einen ätiologischen Rückschluss auf verschiedene Gerinnungsstörungen erlaubt.⁵² Der wichtigste Wert, welchen das Gerät misst, ist die *closure time* (Verschlusszeit der Kapillare).⁵² Die Zeitmessung beginnt sobald die Vollblutprobe in Kontakt mit den Plättchenaktivatoren Kollagen/ Epinephrin oder Kollagen/ ADP kommt und endet mit Verschluss des Kapillarröhrchens.⁵²

Die Interpretation der Testergebnisse könnte folgendermaßen aussehen: Ist zum Beispiel die *closure time* ausschließlich bei der mit Kollagen/ Epinephrin beschichteten Membran verlängert (>180 s), weist dies auf eine Plättchenhemmung durch Aspirin hin.⁵² Eine Verlängerung der Verschlusszeit bei beiden Membranen können auf eine von-Willebrand-Syndrom oder eine der selteneren Thrombozytopathien (wie z.B. hereditäre Rezeptor-Defekte wie das Bernard-Soullier

Syndrom oder die Thrombastenie Glanzmann) hinweisen.⁵³ Somit können die Testergebnisse des PFA-200 die möglichen Ursachen der zugrunde liegenden Gerinnungsstörungen eingrenzen oder sogar genau detektieren. Dieser Test dient als vielseitiger Globaltest für die Plättchenfunktion, weshalb er sich für die Untersuchung des Effekts von EP auf die primäre Hämostase gut eignet.

2.6 Blutbild

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde das Model KX-21N von der Firma Sysmex (Mundelein, Illinois, USA) verwendet.⁴⁵



Abbildung 18: Sysmex KX-21N Automated Hematology Analyzer

Das hier verwendete Messprinzip, auch Coulter-Zähler genannt, ist ein durchflusszytometrisches Verfahren.^{54,55} Es basiert auf der Widerstandsänderung, welche von Elektroden in einer hauchdünnen Kapillare während des Durchflusses unterschiedlich großer Blutzellen gemessen wird.^{54,55} Die Widerstandsänderung ist dabei abhängig von der Größe der durchfließenden Zelle und proportional zur Spannungsänderung an den Elektroden.^{54,55}

Diese Technik liefert die Basisform des Blutbildes, das sogenannte kleine Blutbild.⁵⁶ Hierbei wird die relative Anzahl der einzelnen Blutzellen (Anzahl der Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten pro Volumen), der Hämatokrit, die Hämoglobinkonzentration und die Erythrozyten-Indices (MCV, MCH und MCHC) im

untersuchten Blut gemessen.⁵⁶ Im Unterschied dazu werden beim Differenzialblutbild die Unterformen der Leukozyten (z.B. stabkernige, segmentkernige neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, etc.) differenziert und abgemessen.⁵⁷ Die Summe aus Differentialblutbild und kleinem Blutbild wird großes Blutbild genannt und sollte in keinem Fall synonym für das Differentialblutbild verwendet werden.⁵⁶

2.7 Thrombingeneration

Mithilfe des *calibrated automated thrombography* (CAT) ist es möglich, die Generation und Inaktivierung von Thrombin in einer gegebenen Plasmaprobe (in dieser Arbeit PPP) zu quantifizieren.⁵⁸ Durch die Messung der Thrombingeneration können alle Faktorenmängel (mit Ausnahme von Faktor XIII) und auch die Wirksamkeit gängiger Antikoagulantien (Vitamin-K-Antagonisten, Heparine und direkte orale Antikoagulantien) detektieren werden.⁵⁹

Für die Gerinnungsaktivierung des Testplasmas werden kleine Mengen von TF und Phospholipiden der Probe hinzugefügt.⁵⁸ Um die Menge an Thrombin zu quantifizieren, wird ein fluoreszierendes, Thrombin-spezifisches Substrat (Z-Gly-Gly-Arg-AMC) eingesetzt.⁵⁹ Dieses Substrat wird vom entstehenden Thrombin zu fluoreszierendem AMC (amido-4-methylcoumarin) gespalten.⁵⁹ Somit entsteht ein fluoreszierender Farbstoff, dessen Licht-Emission kontinuierlich gemessen wird.⁶⁰ Die Menge des emittierten Lichtes erlaubt somit einen Rückschluss auf das entstandene Thrombin, welches graphisch als Funktion der Zeit dargestellt werden kann (Thrombogramm).⁶⁰

Die wichtigsten Parameter des Thrombogramms sind in Abbildung 15 dargestellt. Dabei bezeichnet die *lag time* (LT) die Zeit zwischen der Gerinnungsaktivierung und dem Beginn der Thrombingeneration.⁵⁸ Der Thrombin-Peak ist die maximale, über die beobachtete Zeit gemessene Thrombinkonzentration. Die *time to peak* (ttPeak) beschreibt die bis zur maximalen Thrombinkonzentration verstrichene Zeit. Die Geschwindigkeit der Thrombingeneration (*VelIndex*, *velocity index*) erlaubt Rückschlüsse auf eine Hyper- oder Hypokoagulation. Um die Gesamtmenge des gebildeten Thrombins zu messen, eignet sich das *endogenous thrombin potential* (ETP), welches der Fläche unter der Thrombogramm-Kurve während der gesamten Beobachtungszeit (*area under the curve*, AUC) entspricht.⁵⁹ Unter *start tail* versteht

man den Zeitpunkt, ab welchem kein freies Thrombin mehr in der Probe vorhanden ist.

2.8 ATP-Messung

Die thrombozytäre ATP-Exozytose dient als quantitativer Marker für die Thrombozytenaktivierung und erlaubt Rückschlüsse auf die physiologische Freisetzung der dichten Granula der Blutplättchen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde das extrazelluläre ATP mithilfe der Luciferin-Luciferase-Reaktion gemessen. Die Luciferin-Luciferase-Reaktion basiert auf einer Reaktion, die vom Enzym Luciferase katalysiert wird.⁶¹ Es kommt in vielen Organismen, wie zum Beispiel dem Glühwürmchen, welche Biolumineszenz betreiben, vor.⁶² Dabei wird Luciferin unter Anwesenheit von ATP von der Luciferase zu Oxyluciferin umgesetzt, wobei Licht emittiert wird (siehe Abbildung 19).⁶¹ Das emittierte Licht ist dabei direkt proportional zu dem in der Lösung vorhandenen ATP und ist daher eine gute Methode für die indirekte ATP-Messung.

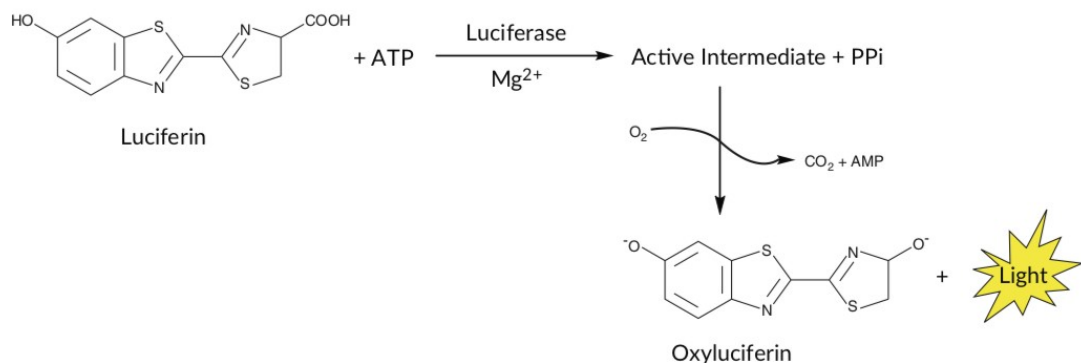


Abbildung 19: Luciferin-Luciferase Reaktion

2.9 Globaltests der plasmatischen Gerinnung (APTT und PT)

Als wichtige Globaltests des intrinsischen und extrinsische Gerinnungssystems stehen die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT) und Prothrombinzeit (PT) zu Verfügung.

Um die APTT zu messen wird in einer durch Citrat ungerinnbar gemachten Blutprobe die Gerinnung wieder in Gang gesetzt.⁶³ Durch Zugabe von Phospholipiden, Ca²⁺ und einer oberflächenaktiven Substanz (z.B. Kaolin) in das

PPP kommt es zur Initiation des intrinsischen Gerinnungssystems.⁶³ Das PPP erhält man durch Zentrifugation des Citratblutes. Die Zeit, welche nach Gerinnungsaktivierung bis zum Eintreten der Gerinnung vergeht, entspricht der APTT.⁶³ Sie wird in der Klinik zur Kontrolle einer Heparin- oder Thrombolysetherapie, sowie zur Erkennung von Gerinnungsstörungen verwendet.⁶³

Die Messung der PT erfolgt durch die Gerinnungsaktivierung von PPP. Zur Aktivierung des extrinsischen Systems wird dem PPP Ca^{2+} und TF hinzugefügt und im Anschluss die Zeit bis zum Auftreten von Fibrinfäden gemessen.⁶⁴ Unter physiologischen Bedingungen beträgt die PT 11-16 Sekunden.⁶⁴ Die PT wird zur Monitorisierung von oralen Antikoagulantien, wie zum Beispiel Vitamin-K-Antagonisten, verwendet, aber auch um die Gerinnung bei schweren Lebererkrankungen zu überwachen.⁶⁴ Während die PT eine zeitliche Messung darstellt, kann das extrinsische Gerinnungssystem auch prozentuell mit Hilfe des Quick-Wertes angegeben werden. Dieser Wert gibt die Verdünnung des Normplasmas (gepooltes Blutplasma vieler Personen mit normaler Gerinnung) an, welche man herstellen müsste, um die gleiche PT wie die Untersuchte Blutprobe zu erhalten.⁶⁴ Die Prozentangabe bezieht sich dabei auf die Konzentration der Gerinnungsfaktoren im Vergleich zur Ursprungskonzentration.⁶⁴ Eine 1:1 Verdünnung (1 Teil Plasma, 1 Teil Wasser) des Normplasmas hätte somit eine halb so große Konzentration der Gerinnungsfaktoren und würde einen Quick-Wert von 50% erhalten, wobei die PT dieser Verdünnung 21 Sekunden dauern würde. Zur Internationalen Standardisierung der PT wurde die INR eingeführt. Diese gibt das Verhältnis der PT der zu testenden Probe und PT einer international standardisierten Probe an.³¹

2.10 Statistische Methode

Die gesamte statistische Auswertung der Untersuchungsdaten wurde mithilfe des Programmes GraphPad 7.0 Prism durchgeführt. Der Einfluss steigender EP-Konzentrationen auf die Gerinnungsvariablen wurde mithilfe der linearen Regression oder mittels *one way ANOVA (one way analysis of variance)* untersucht. Anschließend wurde der Bonferroni *post hoc*-Test durchgeführt. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

Alle Messungen im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden in Vollblut oder PPP von gesunden Probanden durchgeführt. Die Zellzahl und die Konzentrationen der Faktoren II, VII und VIII der untersuchten Blutproben waren im Normbereich. Dem Blut wurden steigende Mengen an EP zugesetzt, sodass die Konzentrationen von EP 0, 250, 500 und 1000 $\mu\text{g/ml}$ betragen.

3.1 Einflüsse von EP auf die Thrombozytenaggregation

Die Impedanzaggregometrie-Messungen in Vollblut ($n=35$) zeigten einen plättchenhemmenden Effekt von EP. Dabei wurde Folgendes beobachtet: Die Amplitude sank dosisabhängig durch den Zusatz von EP ($p<0,0001$; siehe Abbildung 20). Außerdem wurde die LT durch steigende EP-Dosen in konzentrationsabhängiger Weise verlängert ($p<0,0001$; siehe Abbildung 21). Die *slope* konnten durch EP nicht signifikant beeinflusst werden ($p=0,1637$; Daten nicht gezeigt).

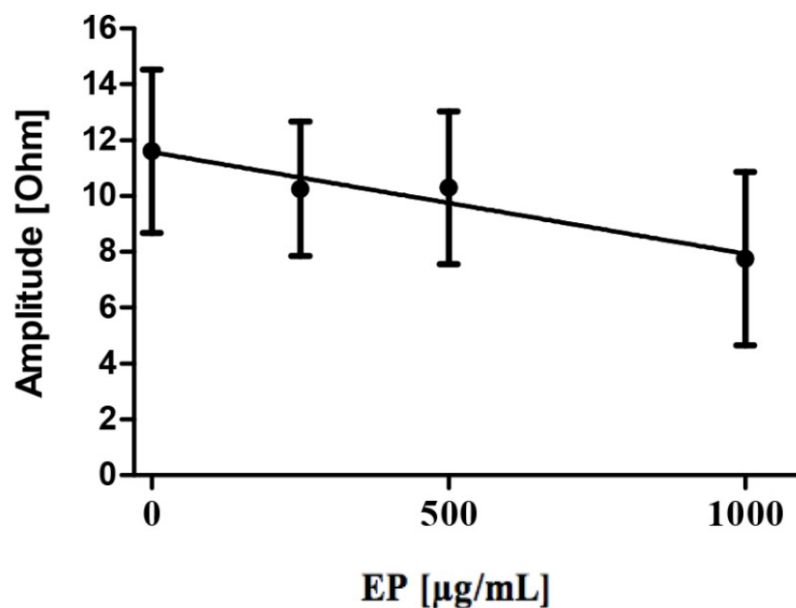


Abbildung 20: Der Einfluss steigender EP-Konzentrationen auf die Amplitude

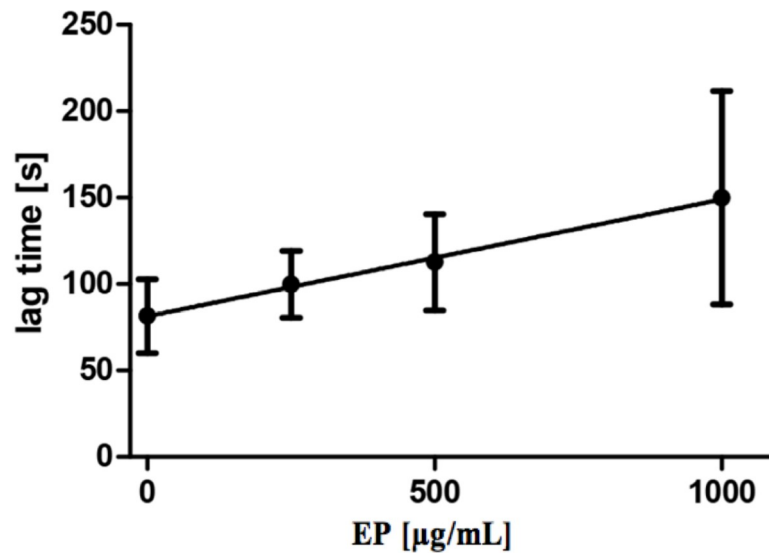


Abbildung 21: Der Einfluss steigender EP-Konzentrationen auf die *lag time*

3.2 Einflüsse von EP auf die ATP-Exozytose

In Gegenwart steigender Konzentrationen von EP kam es zu einer dosisabhängigen Abnahme der ATP-Exozytose in Vollblut (n=10) (p=0,0002, siehe Abbildung 22).

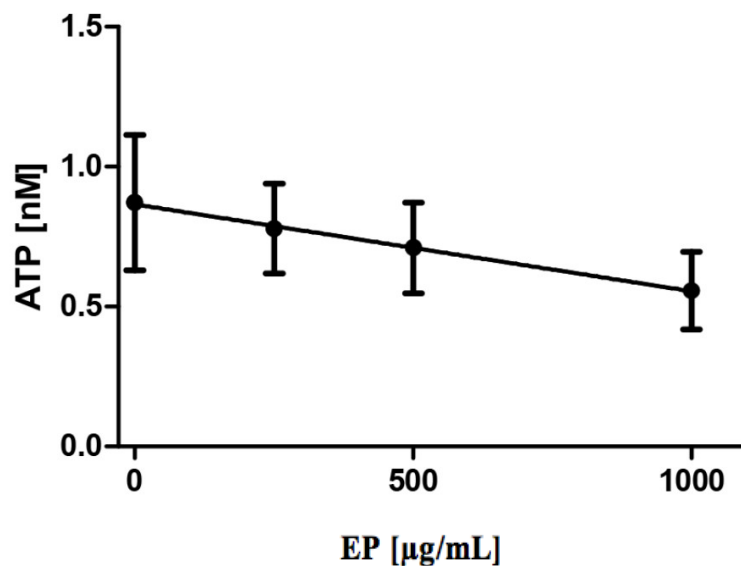


Abbildung 22: Der Einfluss steigender ATP-Konzentrationen auf die ATP-Exozytose

3.3 Einflüsse von EP auf den Verlauf der Gerinnselbildung (Thrombelastometrie)

Steigende EP-Konzentrationen verlängerten die CT in einer konzentrationsabhängigen Weise. Auf die anderen Messgrößen der Thrombelastometrie hatte EP keinen Einfluss in den untersuchten Vollblutproben (n=42). Für die interessierenden Messparameter ergab die statistische Analyse folgende Werte: CT: $p=0,0204$ (siehe Abbildung 23); CFT: $p=0,5436$ (siehe Abbildung 24); MCF: $p=0,9924$ (siehe Abbildung 25); alpha-Winkel: $p=0,4557$ (siehe Abbildung 26)

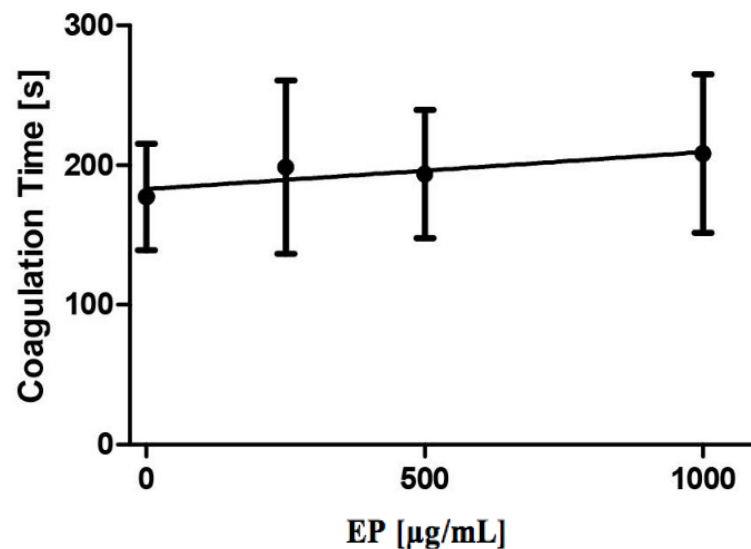


Abbildung 23: Der Einfluss steigender EP-Konzentrationen auf die *coagulation time*

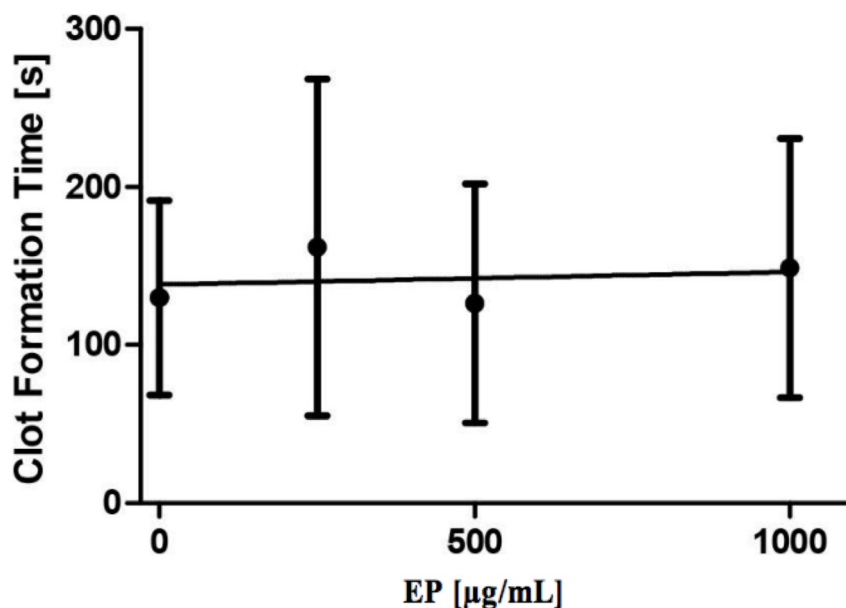


Abbildung 24: Der Einfluss steigender EP-Konzentrationen auf die *clot formation time*

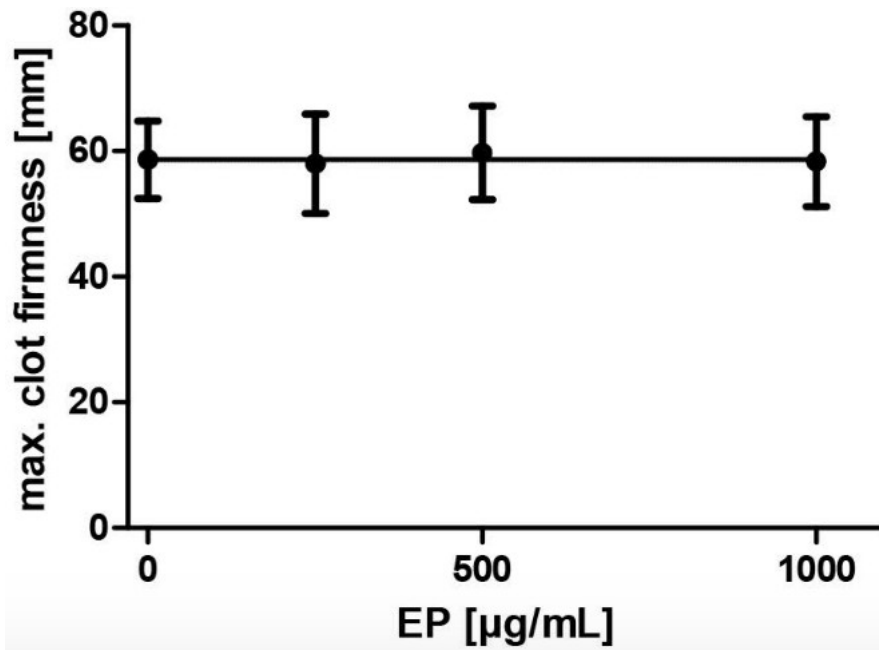


Abbildung 25: Der Einfluss steigender EP-Konzentrationen auf die *maximum clot firmness*

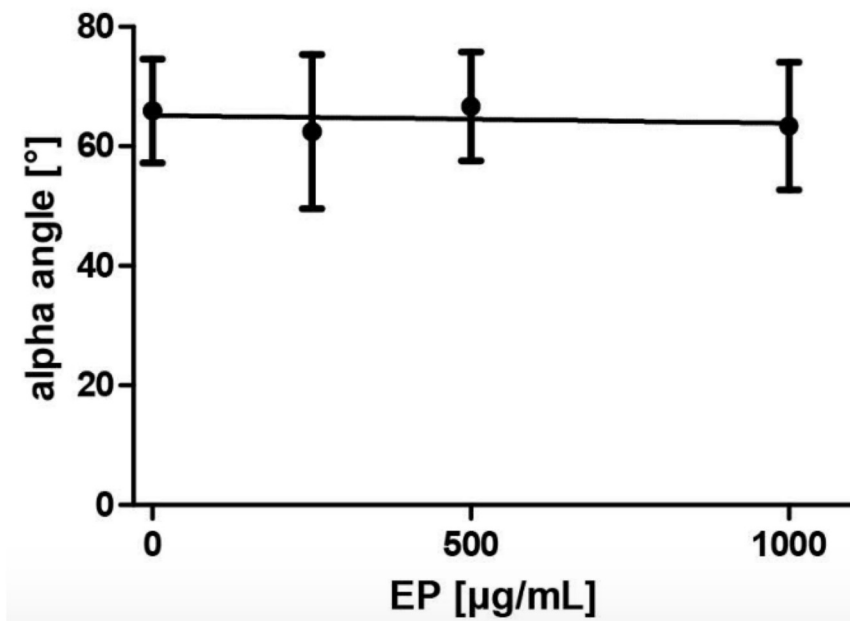


Abbildung 26: Der Einfluss steigender EP-Konzentrationen auf den Winkel α

3.4 Einflüsse von EP auf die Plättchenfunktion (PFA-200)

Die Messungen am PFA-200 zeigten ebenfalls einen konzentrationsabhängigen plättchenhemmenden Effekt von EP in den untersuchten Vollblutproben (n=28). In Gegenwart steigender Mengen von EP kam es zu einer konzentrationsabhängigen Verlängerung der *closure time*. Diese Effekte konnten sowohl unter Verwendung der Thrombozyten-Aktivatoren Kollagen/ADP ($p < 0,0001$; siehe Abbildung 27), als auch Kollagen/Epinephrin ($p < 0,0001$; siehe Abbildung 28) gezeigt werden.

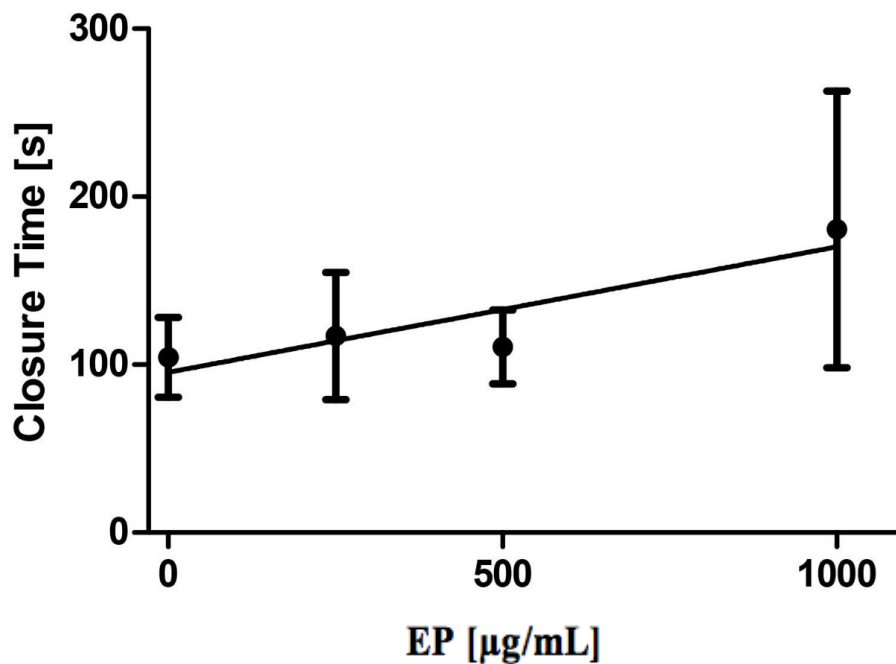


Abbildung 27: Der Einfluss steigender EP Konzentrationen auf die *closure time* unter Verwendung Kollagen/ADP-beschichteten Membranen

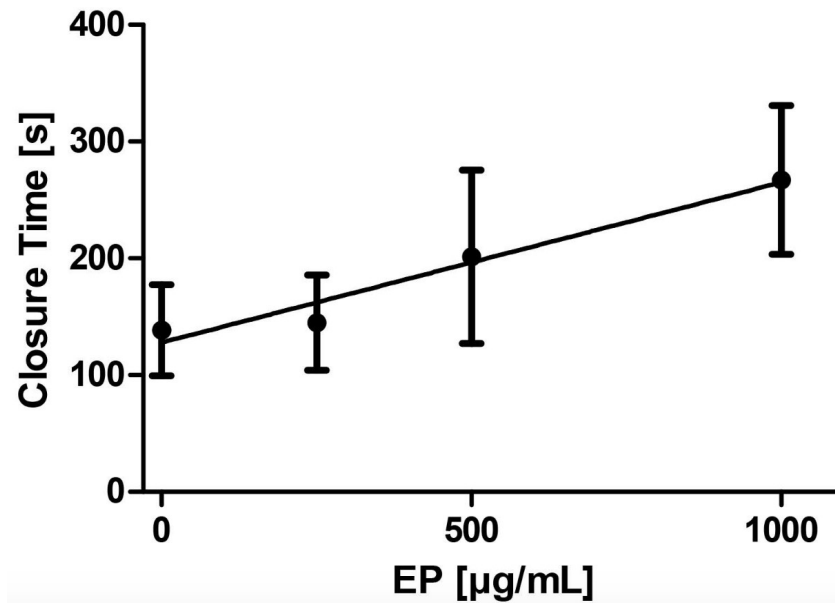


Abbildung 28: Der Einfluss steigender EP Konzentrationen auf die *closure time* unter Verwendung Kollagen/Epinephrin-beschichteten Membranen

3.5 Einflüsse von EP auf die Plättchenadhäsion (Impact R)

Die Messungen am Impact R zeigten, dass es in Gegenwart steigender Konzentrationen an EP in Vollblut (n=10) zu einer deutlichen Hemmung der Thrombozytenadhäsion kommt. Sowohl die SC (p=0,0006; siehe Abbildung 29) als auch AS (p=0,0056; siehe Abbildung 30) nahmen in Anwesenheit von steigenden EP-Mengen in einer konzentrationsabhängigen Weise ab.

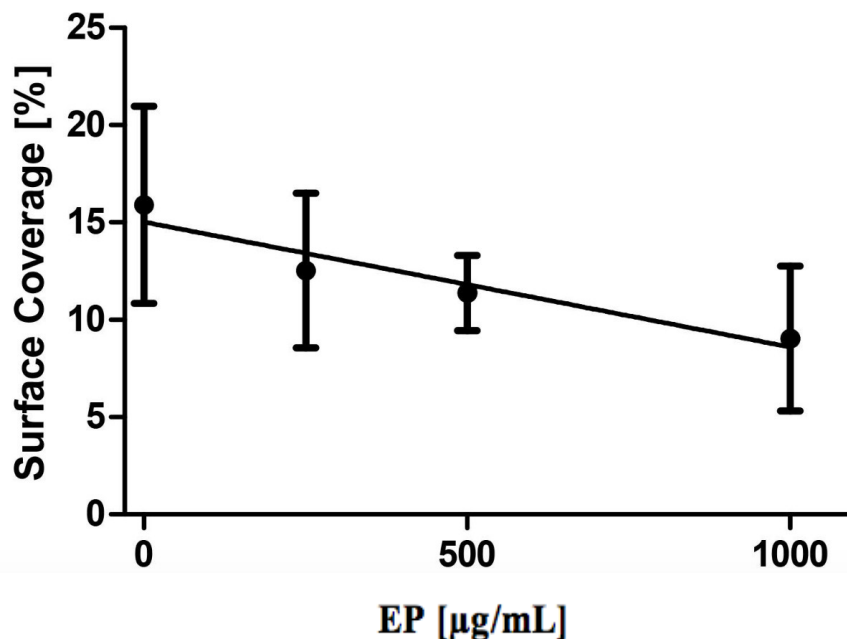


Abbildung 29: Der Einfluss steigender EP Konzentrationen auf die *surface coverage*

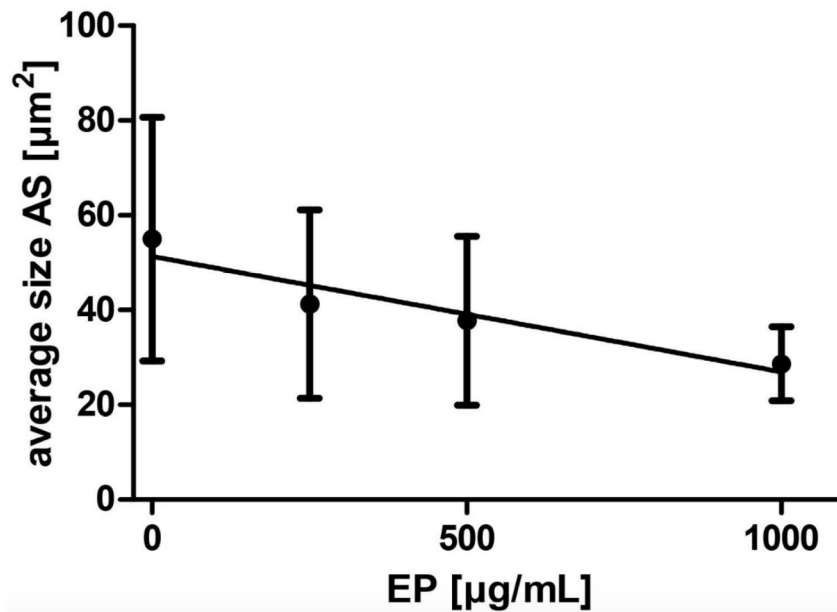


Abbildung 30: Der Einfluss steigender EP Konzentrationen auf die *average size*

3.6 Einflüsse von EP auf die Thrombingeneration

Die Messungen der Thrombingeneration zeigten, dass es in Gegenwart steigender EP-Konzentrationen in plättchenfreiem Plasma (n=10) zu keiner Änderung der LT (p=0,9529, Daten nicht gezeigt) und des ETP (p=0,2237; Daten nicht gezeigt) kam. Allerdings kam es zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme des Peaks (p=0,0287; siehe Abbildung 31) und des VelIndex (p=0,0099; siehe Abbildung 34). Die Parameter ttPeak (p=0,0271; siehe Abbildung 32) und start tail (p=0,0265; siehe Abbildung 33) nahmen beide unter dem Einfluss von EP in einer konzentrationsabhängigen Weise ab.

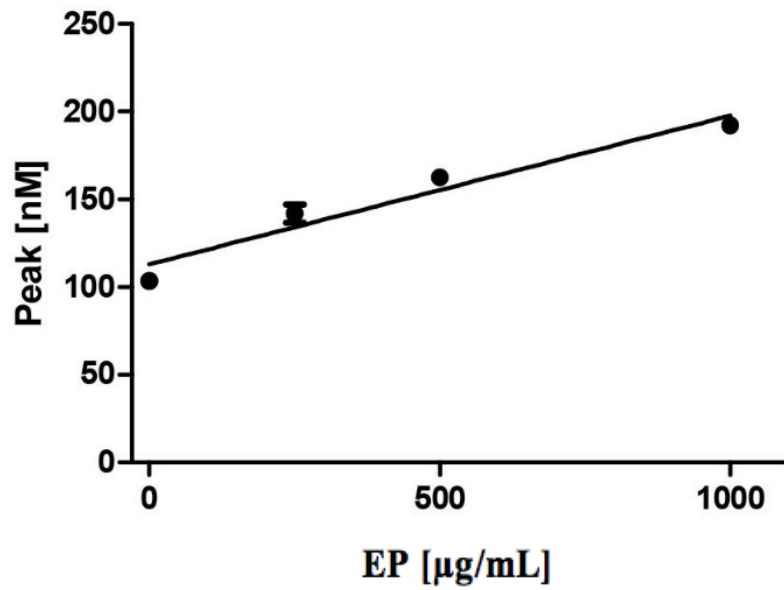


Abbildung 31: Der Einfluss steigender EP-Konzentrationen auf den *peak* der Thrombingeneration

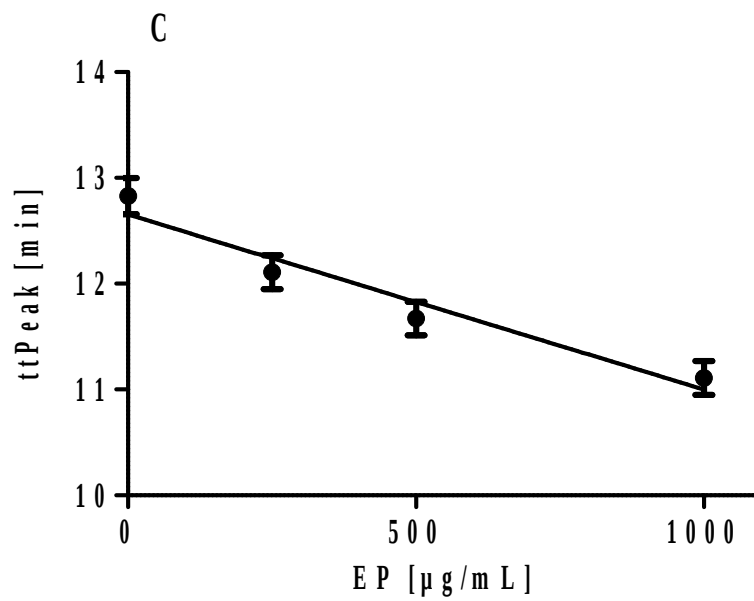


Abbildung 32: Der Einfluss steigender EP-Konzentrationen auf die *time to peak*

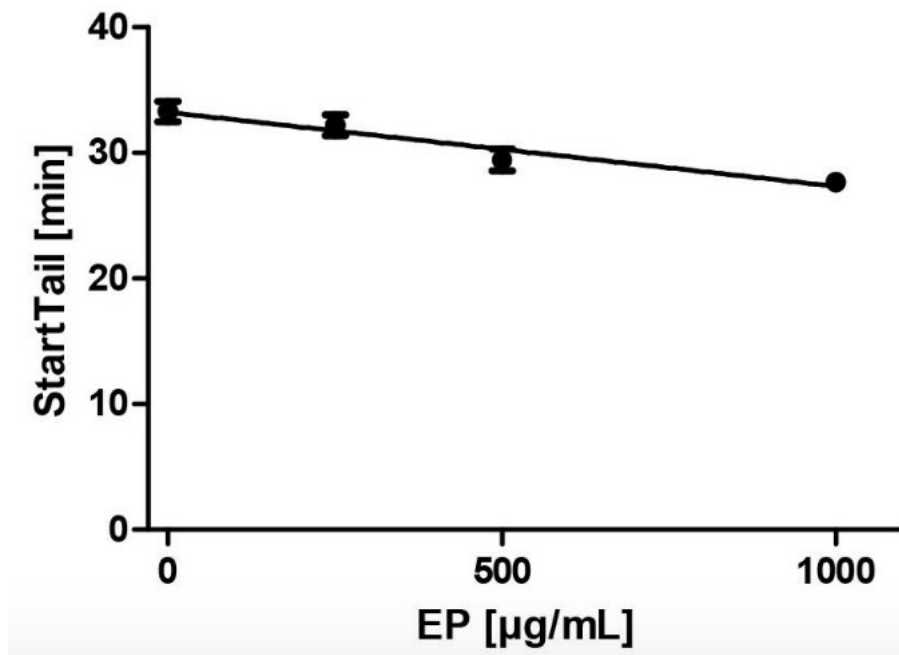


Abbildung 33: Der Einfluss steigender EP-Konzentrationen auf die *start tail*

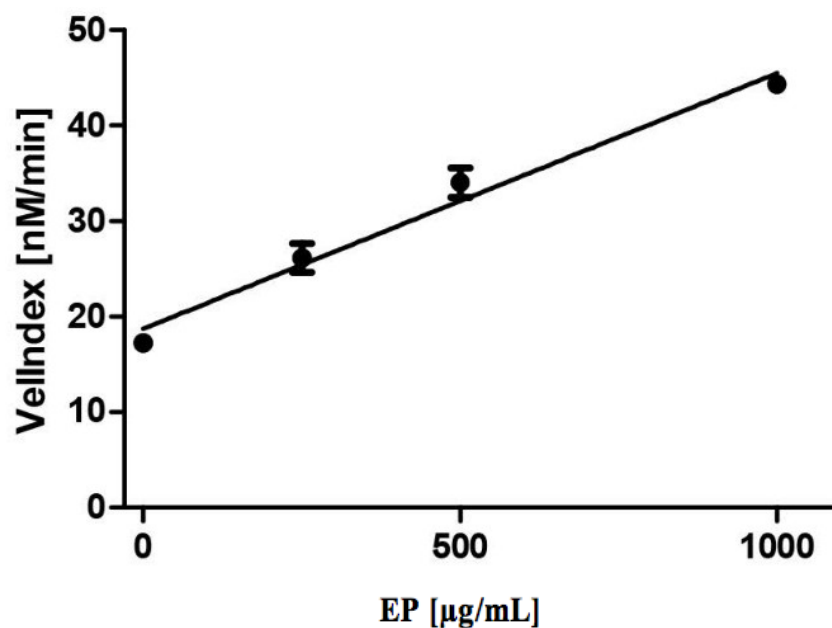


Abbildung 34: Der Einfluss steigender EP-Konzentrationen auf den VelIndex

3.7 Einflüsse von EP auf die Gerinnungszeiten APTT und PT

Die Messung der Gerinnungszeiten APTT und PT an PPP (n=8) zeigten, dass es in Anwesenheit von EP zu einer dosisabhängigen Verlängerung der APTT ($p=0,004296$; siehe Abbildung 35) und der PT (gemessen als INR in %) ($p < 0,0001$; siehe Abbildung 36) kam.

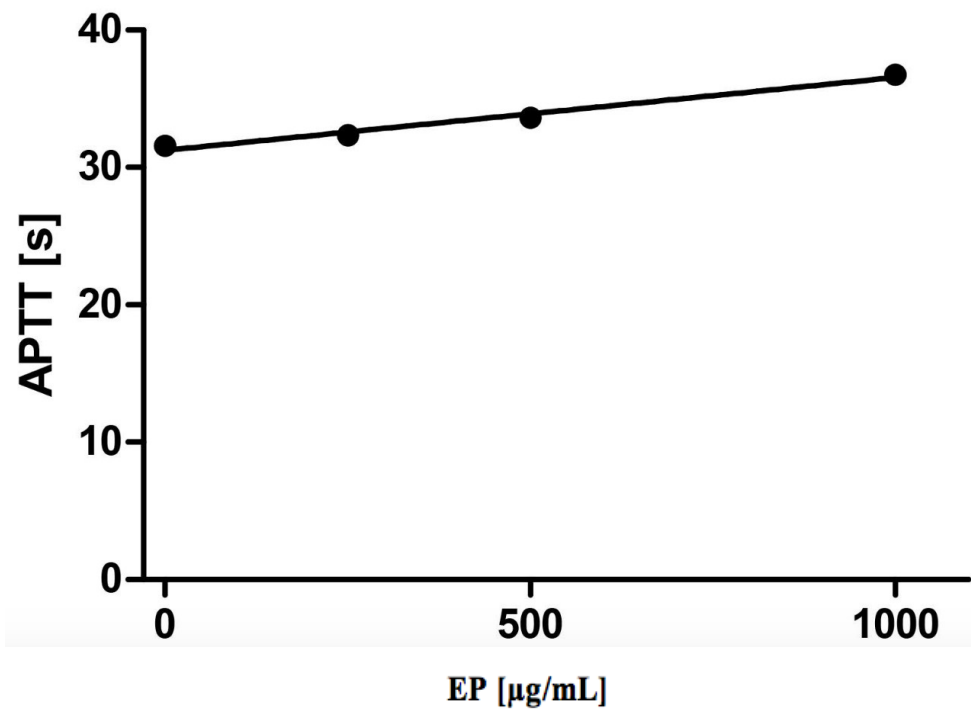


Abbildung 35: Der Einfluss steigender EP-Konzentrationen auf die APTT

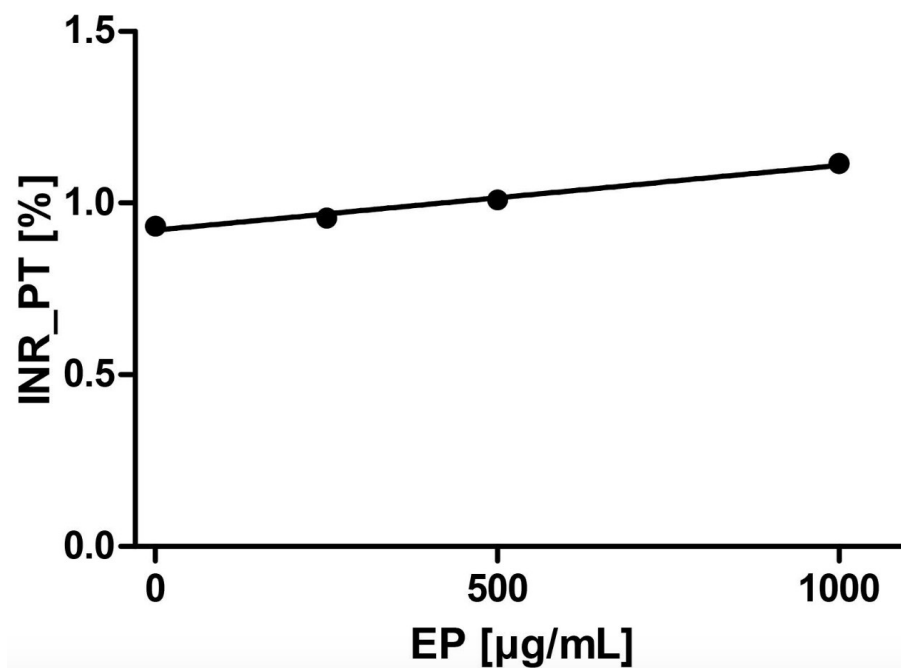


Abbildung 36: Der Einfluss steigender EP-Konzentrationen auf die INR (%)

4 Diskussion

EP hat erwiesenermaßen antiinflammatorische und antioxidative Eigenschaften.^{65,37} Bisherige Untersuchungen weisen darauf hin, dass EP auch antithrombotisch wirken kann.³ Wir haben dies in Vollblutproben und PPP bestätigt. Die Untersuchungen dieser Diplomarbeit zeigen, dass EP plättchenfunktionshemmende Eigenschaften besitzt. Unseren Ergebnissen zu Folge ist EP in der Lage, sowohl die Aggregation als auch Adhäsion der Thrombozyten zu hemmen. Des Weiteren legen die Beobachtungen dieser Diplomarbeit nahe, dass EP einen hemmenden Einfluss auf die sekundäre Gerinnung hat.

Eine Limitation dieser Diplomarbeit ist die Tatsache, dass zur Zeit sehr wenig bekannt ist über die molekularen Mechanismen der Interaktion von EP mit den Thrombozyten und der Gerinnungskaskade. Folgende Zusammenhänge sind zur Zeit bekannt:

4.1 EP hemmt die Plättchenfunktion

4.1.1 Hemmung der Thrombozytenaktivierung durch EP

Li *et al.* konnten in ihren Untersuchungen feststellen, dass EP zu einer verminderten Phosphorylierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und Protein Kinase C (PKC) führt.⁶⁶ Diesen beiden Enzymen wird eine zentrale Rolle in der Thrombozyten-Aktivierung beigemessen.⁶⁶ Für die erfolgreiche Thrombozytenggregation ist die vorherige Thrombozytenaktivierung eine Voraussetzung.^{4, 5}

Die von Li *et al.* beschriebene Inhibierung dieser Schlüsselenzyme könnte eine Erklärung für die in dieser Diplomarbeit beobachteten Hemmung der Thrombozytenaggregation, -aktivierung und -adhäsion sein.

4.1.2 Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation durch EP

Die Ergebnisse dieser Diplomarbeit weisen auf eine Hemmung der Thrombozytenadhäsion durch EP hin: So konnte mithilfe des Impact-R (Thrombozytenadhäsion) eine Verminderung der *surface coverage* und *average size* in Gegenwart steigender EP-Dosen gezeigt werden. Die Verwendung von Vollblut erweist sich für die Untersuchung der Plättchen-Aggregation und -Adhäsion als besonders günstig, da sie die physiologischen Gerinnungsvorgänge im menschlichen

Körper gut abbilden kann. Vollblut enthält nicht nur die direkt an der Gerinnung beteiligten Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren, sondern auch Leukozyten, die mit Plättchen interagieren und somit eine wichtige Rolle in der Gerinnung und Fibrinolyse spielen.⁶⁷

Die Messungen am PFA 200 und dem Impedanz-Aggregometer (Chrono-log) unterstützen die Annahme, dass EP aggregationshemmende Eigenschaften besitzt: Dort konnte durch steigende EP-Konzentrationen eine dosisabhängige Zunahme der CT und eine Abnahme der Plättchenaggregation erzielt werden.

Die Ergebnisse dieser Diplomarbeit stehen im Einklang mit einer früheren Studie, in der die Plättchenaggregation und -adhäsion in PRP und im plasmafreien Thrombozytenkonzentrat von Menschen und Mäusen untersucht wurde.⁶⁶ Li *et al.* untersuchten das Zelladhäsionsmolekül P-Selektin, welches nach Aktivierung der Thrombozyten in deren Zellmembran integriert wird und dort als wichtiges Protein der Plättchenaggregation und -adhäsion dient.^{66,68} Im Rahmen der Plättchenaktivierung durch Thrombin, Kollagen oder ADP wird P-Selektin aus den thrombozytären α -Granula freigesetzt und anschließend in die Außenseite der Zellmembran integriert.⁶⁸ Dort dient es als Ankerprotein, welches die Aggregation durch eine direkte Plättchen-Plättchen-Bindung oder eine Plättchen-Fibrin-Bindung unterstützt.⁶⁸ Li *et al.* konnten zeigen, dass EP die durch Kollagen und Thrombin induzierte P-Selektin-Expression dosisabhängig unterdrücken kann.⁶⁶

Ein weiterer Marker zur Bestimmung der Stärke der Thrombozytenaggregation ist der monoklonale Antikörper PAC-1. Dieser bindet selektiv an das GP-IIb/IIIa von aktivierten Thrombozyten.⁶⁹ Li *et al.* konnten in diesem Zusammenhang demonstrieren, dass EP die Bindung von PAC-1 an die Thrombozyten signifikant unterdrücken kann, nachdem sie mit Kollagen und Thrombin aktiviert wurden.⁶⁶

4.1.3 Hemmung der ATP-Exozytose von Thrombozyten durch EP

Die Untersuchungen dieser Diplomarbeit zeigen, dass die ATP-Freisetzung aus den Thrombozyten durch EP unterdrückt werden kann. Die thrombozytäre ATP-Exozytose ist ein wichtiger Prozess der Plättchen-Aggregation.⁶⁷ Stafford *et al.* konnten zeigen, dass ATP zuerst von leukozytären ATPasen zu ADP konvertiert werden muss, bevor es seine aggregationsfördernde Wirkung über den ADP-Rezeptor entfalten kann.⁶⁷ Im PRP war eine Zunahme der Plättchenaggregation

durch Zusatz von ATP nicht möglich.⁶⁷ Diese Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten demonstriert einmal mehr warum sich Vollblut besonders gut für die Untersuchung der Blutgerinnung unter physiologischen Bedingungen eignet.

Eine Thrombozytenaggregationshemmung kann auch über eine direkte Blockade des ADP-Rezeptors erfolgen. Mithilfe von ADP-Rezeptor-Antagonisten (z.B. Clopidogrel) wird selektiv die Bindung von ADP an den ADP-Rezeptor P2Y₁₂ verhindert, wodurch es zu einer Hemmung der ADP-abhängigen Thrombozytenaggregation, Freisetzung von Plättcheninhaltsstoffen und Produktion von TXA₂ kommt.⁷⁰ Es konnte also in Studien gezeigt werden, dass ADP und ATP wichtige Mediatoren für die Thrombozytenaggregation sind. Unsere Messungen weisen darauf hin, dass die Hemmung der Thrombozytenaggregation, welche durch EP induziert wird, auch auf die Unterdrückung der thrombozytären ATP-Exozytose zurückzuführen ist.

4.2 Antiinflammatorische und Antioxidative Eigenschaften von EP

Die bisher durchgeführten *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen von EP legen nahe, dass EP antiinflammatorische Wirkungen hat.^{71,72} Kao *et al.* versuchten in einer Übersichtsarbeit bisheriger Studienergebnisse mögliche Gründe für die antiinflammatorische Wirkung von EP zu finden.³⁷ In diesem Zusammenhang kommt dem Transkriptionsfaktor NF-κB eine besonders wichtige Rolle zu, welcher an der Immunantwort, Zellproliferation und Apoptose beteiligt ist.^{1,37}

Ein Mechanismus, welcher die Inhibierung von NF-κB durch EP erklärt, geht auf die Hemmung des in fast allen Zellen vorkommenden Antioxidans Glutathion (GSH) zurück.³⁷ Dieses stellt unter normalen Bedingungen in der Zelle ein Redox-Millieu her, welches die Bindung des aktivierten NF-κB-Komplexes an die DNA begünstigt.³⁷ Nach der Verabreichung von EP wird dieser von GSH unterstützte Mechanismus jedoch unterbunden, wie die Forschungsgruppe um Song *et al.* beobachtete.³⁷ Spätere Studienergebnisse unterstützen diese These experimentell und machen sie auf molekularer Ebene plausibel.³⁷

Um die folgenden Hypothesen für die Inhibierung von NF-κB durch EP verstehen zu können, ist es unerlässlich, kurz auf die NF-κB-Aktivierungs-Kaskade einzugehen (siehe Abbildung 4): In fast allen Zellen liegt NF-κB in seiner inaktiven, hetero- oder homodimeren Form im Zytoplasma vor, wo es an sein inhibierendes Bindeprotein IκB

gekoppelt ist.^{1,37} Nach der Stimulierung durch proinflammatorische Faktoren (wie z.B. TNF oder LPS) kommt es zu einer Phosphorylierung und dem konsekutiven Abbau von I κ B im Proteasom.³⁷ Dadurch wird NF- κ B in den Zellkern entlassen, wo es an seine Promotorregionen binden kann, um eine Reihe von NF- κ B-abhängigen Genen zu aktivieren.^{1,37} Beispiele für solche Gene sind die Gene, welche für IL-6 oder die Cyclooxygenase-2 (COX-2) codieren.⁷³

Han *et al.* konnten mit Hilfe von RAW 264.7 Zellen, welche sie mit LPS stimulierten, folgendes beobachten: Bei stimulierten RAW 264.7 Zellen kam es zu einem Verschwinden des inhibierenden Bindeprotein I κ B, gemäß der normalen Aktivierungskaskade von NF- κ B.³⁷ Die Tatsache, dass sich die Konzentration von I κ B nicht durch die Verabreichung von EP beeinflussen ließ, legte die Vermutung nahe, EP müsse an einem späteren Punkt der Kaskade seine Wirkung entfalten.³⁷ Diese Hypothese konnte tatsächlich durch eine Reihe von Versuchen unterstützt werden:³⁷ Han *et al.* kamen schließlich zu der Erkenntnis, dass EP die NF- κ B-Untereinheit p65 mittels einer kovalenten Bindung modifiziert.³⁷ Dies habe zur Folge dass NF- κ B nicht ordnungsgemäß an die DNA binden könne.^{37,72} Diese zwei Hypothesen sind heutzutage gute Erklärungsmodelle für die anti-inflammatorischen Eigenschaften von EP.

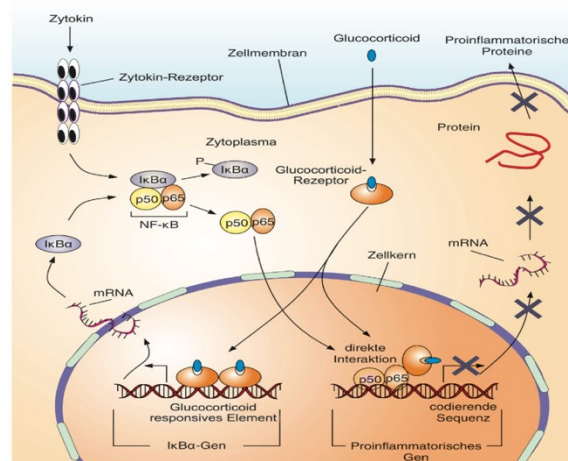


Abbildung 37: Schematische Darstellung der NF- κ B-Aktivierungskaskade

Rossmann *et al.* konnten zeigen, dass EP die Oxidierbarkeit von LDL herabsetzen und gleichzeitig die zytotoxischen Auswirkungen von stark oxidiertem LDL eindämmen kann.⁶⁵ Diese Erkenntnisse liefern einen Hinweis dafür, dass EP

anti-atherosklerotische Eigenschaften hat, da die LDL-Oxidation einen wichtigen Schritt in der Atheroskleroseentstehung (Atherogenese) darstellt.^{65,74}

4.3 Einfluss von EP auf die Apoptose und den Zellmetabolismus

In den letzten beiden Abschnitten der Arbeit von Kao *et al.* beschäftigen sich die Forscher und Forscherinnen mit dem Einfluss von EP auf die Apoptose und den Zellmetabolismus.³⁷ Dabei wurden, abhängig vom verwendeten Modell, sowohl anti- als auch pro-apoptotische Wirkungen von EP gezeigt.³⁷ Auf einer metabolischen Ebene wirkt EP ähnlich wie sein strukturverwandter Stoff Pyruvat, indem er eine Steigerung der ATP-Synthese bewirkt, vor allem bei Zellen auf die ein Redox-Stress wirkt.^{37,75} Dies konnte von Woo *et al.* anhand eines Hypoxie-Reperfusion-Modell an Ratten gezeigt werden.⁷⁵ Dort konnte durch die Applikation von EP nach dem Myokardinfarkt eine vermehrte ATP-Synthese der Myokardzellen erreicht werden.⁷⁵ Diese beobachtete Wirkung steht jedoch nicht im Einklang mit der in dieser Diplomarbeit gezeigten Wirkung von EP auf Thrombozyten. Dort supprimiert EP die ATP-Exozytose der Thrombozyten. Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte zum einen ein anderes Testsystem, zum anderen aber unterschiedliche Wirkungen von EP bei den unterschiedlichen Zellarten sein.

4.4 EP als potentiell Medikament gegen Atherosklerose

EP hat theoretisch das Potential, als wirksames Medikament gegen die Entstehung und/oder das Voranschreiten von Atherosklerose eingesetzt zu werden.⁶⁵

Die Tatsache, dass EP in Experimenten sowohl antikoagulatorische als auch anti-atherosklerotische Eigenschaften besitzt, ist für die Prävention von kardiovaskulären Ereignissen (z.B. Schlaganfall, Herzinfarkt) von besonderem Interesse. Die Atherosklerose, welche die Hauptursache vieler kardiovaskulärer Erkrankungen darstellt, geht sehr häufig mit einem erhöhten Thromboserisiko einher. Des Weiteren könnte durch die entzündungshemmende Wirkung von EP, ganz speziell die Unterdrückung der IL-6-Produktion, die Entstehung und das Voranschreiten von Atherosklerose eingedämmt werden.³⁷ IL-6 wurde bereits in mehreren Studien eine wichtige Rolle für die Entstehung von Atherosklerose zugeschrieben, da es zu einer Produktion des C-reaktiven Proteins (CRP) in der Leber, einer Aktivierung von Endothelzellen, der Proliferation und Differenzierung

von Lymphozyten und einer vermehrten Gerinnung führt.⁷⁶ Außerdem wurde von Wang *et al.* gezeigt, dass der antiinflammatorische Effekt von EP auf einen vermehrten Stress des Endoplasmatischen Retikulums der Endothelzellen zurückzuführen ist.⁷⁷

Obwohl EP bereits in vielen präklinischen Studien untersucht wurde, hält sich das Ausmaß der klinischen Untersuchungen von EP bis dato noch in Grenzen. Die einzige klinische Studie über EP wurde 2009 von Bennett-Guerrero *et al.* im *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* veröffentlicht.⁷⁸ Dabei handelt es sich um eine doppelblinde, placebokontrollierte Studie an Hochrisikopatienten und -Patientinnen, an denen Herzoperation durchgeführt wurden.⁷⁸ Anhand einer Reihe von Kriterien wurden 102 PatientInnen mit erheblichem Mortalitätsrisiko (Parsonnet Risk Score >15) ausgewählt und in zwei Gruppen aufgeteilt.⁷⁸ Die eine Gruppe wurde mit Placebo (n=53) behandelt, die andere erhielt als Verum EP (n=49).⁷⁸ Nach Auswertung der Studienergebnisse konnten Folgendes beobachtet werden:

Die Entzündungsmarker CRP und IL-6 stiegen infolge der Herzoperation in beiden Gruppen an.⁷⁸ Durch die Verabreichung von EP ließ sich allerdings keine signifikante Senkung des durchschnittlichen Anstieges der untersuchten Entzündungsparameter erzielen.⁷⁸ Eine Reihe anderer Parameter, wie zum Beispiel der relative Anteil von Thrombozyten und Erythrozyten im Blut (Messungen erfolgten intraoperativ und 24 Stunden postoperativ), die Dauer der postoperativen Sauerstoffbeatmung und die Menge der mittels Thoraxdrainage abgesaugten Flüssigkeit, wurde erhoben.⁷⁸ Auch in Bezug auf diese Messgrößen konnten durch die Verabreichung von EP keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden.⁷⁸ Der einzige Parameter, welcher sich, wenn auch ohne statistische Signifikanz ($p=0,06$), in der EP-Gruppe unterschied, war der Unterschied im Verhältnis PaO_2/FiO_2 vor und nach der Operation.⁷⁸ Anschließend wurden potentielle Gründe für das Fehlen einer klinischen Wirkung von EP in diesen Untersuchungen diskutiert:⁷⁸

Eine Erklärung für die fehlende Effizienz von EP in dieser Studie war, dass das Ausmaß der Entzündungsreaktion bei den untersuchten Patienten und Patientinnen nicht groß genug war.³² Da der postoperative Anstieg der gemessenen Entzündungsparameter (IL-6 und CRP) im Vergleich zu Patienten und Patientinnen im septischen Schock relativ gering ausfiel, war es laut den Autoren schwierig, eine signifikante Unterdrückung der Entzündungsreaktion durch die perioperative

Verabreichung von EP zu bewirken.⁷⁸ Die paradoxe Diskrepanz zwischen den Ergebnissen dieser Studie und jenen präklinischer Tierversuche (z.B. von der Forschungsgruppe um Kung CW, Lee YM, Yen MH *et al.*, siehe Kapitel 1.9.1) lässt sich am ehesten durch den erheblichen Unterschied der systemischen Entzündungsreaktion bei den untersuchten Krankheitsbildern erklären.^{3,78} Die postoperative IL-6-Konzentration betrug durchschnittlich 131 pg/mL im beobachteten Patienten- und Patientinnenkollektiv der Studie von Bennett-Guerrero *et al.*⁷⁸ Im Vergleich dazu sei die durchschnittliche IL-6-Konzentration bei Patienten und Patientinnen mit septischen Zustandsbildern oder hochgradigen Verbrennungen mit 1 ng/mL ungefähr 100 mal so groß.⁷⁸

Zwei weitere, potenzielle Gründe für die fehlende Wirksamkeit von EP in der Studie von Bennett-Guerrero *et al.* seien eine zu niedrige Gesamtdosis und/oder eine zu kurze Applikationsdauer von EP:⁷⁸

Die zu verabreichende Dosis von EP wurde im Vorfeld mithilfe von präklinischen Versuchen festgelegt, um möglichst wirksame, jedoch nicht toxische Spiegel zu erreichen.⁷⁸ Trotzdem ist es möglich, dass die verabreichte Standarddosis des Stoffes (7500 mg intravenös) für einen signifikanten Nutzen für die Patienten und Patientinnen nicht ausreichend war.⁷⁸ Letztlich ist es schwierig, die effektiven Wirkspiegel von EP im Blut zu messen, da der Stoff bereits Minuten nach der Verabreichung unter die Nachweisgrenze abfällt.⁷⁸ Eine mögliche Lösung dieses Problems könnte die Verabreichung von EP als Dauerinfusion mittels Perfusor sein.

Die chronische Verabreichung sehr kleiner Mengen an EP über einen langen Zeitraum könnte geeignet sein, um Atherosklerose zu dämpfen. Da die Atherosklerose eine irreversible, chronisch entzündliche Erkrankung der Gefäße ist, scheint es sinnvoll EP über einen längeren Zeitraum zu verabreichen. Erst dadurch könnten Patienten und Patientinnen von seinen anti-atherosklerotischen und antikoagulatorischen Effekten profitieren. Um die klinische Anwendung von EP bei Atherosklerose und anderen Erkrankungen mit erhöhter Gerinnungsneigung zu überprüfen sind weitere klinische Studien notwendig.

Literaturverzeichnis

1. Klinikum CV-. Habilitationsschrift Klinische Prüfung von immunologischen Strategien zur Therapie von Patienten mit schwerer Sepsis / septischem Schock. 2010:1-46.
2. Böcker W, Helmut D, Philipp HU, Moch H, Höfler G, Kreipe H. Pathologie. *Elsevier*. 2008.
3. Kung CW, Lee YM, Yen MH. In vivo anticoagulant effect of ethyl pyruvate in endotoxemic rats. *Thromb Res*. 2011;127(6):582-588.
doi:10.1016/j.thromres.2011.01.017
4. Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. Physiologie. *Thieme*. 2019
5. Stotz T. Diplomarbeit: Der Einfluss körperlicher Aktivität auf die primäre Hämostase. 2017
6. Antwerpes F, Garcia JC. Gerinnungsfaktor - DocCheck Flexikon.
<http://flexikon.doccheck.com/de/Gerinnungsfaktor>. Accessed June 22, 2018.
7. Horn F. Biochemie Des Menschen. *Thieme*.2018
8. Hämostase - DocCheck Flexikon. <http://flexikon.doccheck.com/de/Hämostase>. Accessed June 22, 2018.
9. Hämophilie. Amboss.miamed.de.
<https://www.amboss.com/de/library#xid=uT0ps2&anker=Z4d51e4cb018e4cd467655868411bcd37>. Accessed July 1, 2018.
10. Walzog B, Fandrey J. Blutgerinnung. In: Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, eds. 9., vollst. Georg Thieme Verlag; 2019. doi:10.1055/b-006-163285
11. Hämatopoetische Stammzelle - DocCheck Flexikon.
http://flexikon.doccheck.com/de/Hämatopoetische_Stammzelle. Accessed July 1, 2018.
12. Müller-Berghaus G, Pötzsch B. *Hämostaseologie- Molekulare Und Zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie Und Klinik.*; 1998.

13. Müller-Berghaus G. *Hämostaseologie- Grundlagen, Diagnostik Und Therapie*. Springer Medizin; 2010.
14. Glykoprotein IIb/IIIa - DocCheck Flexikon.
https://flexikon.doccheck.com/de/Glykoprotein_IIb/IIIa. Accessed February 25, 2020.
15. Morbus Glanzmann-Naegeli - DocCheck Flexikon.
http://flexikon.doccheck.com/de/Morbus_Glanzmann-Naegeli. Accessed July 1, 2018.
16. Bernard-Soulier-Syndrom - DocCheck Flexikon.
<http://flexikon.doccheck.com/de/Bernard-Soulier-Syndrom>. Accessed July 7, 2018.
17. Lüllman-Rauch R, Asan E. *Histologie*. 5., vollst. Stuttgart ; New York : Georg Thieme Verlag. 2015
18. Nitroglycerin - DocCheck Flexikon.
<http://flexikon.doccheck.com/de/Nitroglycerin>. Accessed July 7, 2018.
19. Lamprecht M, Moussalli H, Ledinski G, et al. Effects of a single bout of walking exercise on blood coagulation parameters in obese women. *J Appl Physiol*. 2013;115:57-63. doi:10.1152/jappphysiol.00187.2013
20. O’Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, et al. 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction. *Circulation*. 2013;127(4). doi:10.1161/CIR.0b013e3182742cf6
21. Faktor-V-Leiden-Mutation - DocCheck Flexikon.
<http://flexikon.doccheck.com/de/Faktor-V-Leiden-Mutation>. Accessed June 25, 2018.
22. Heparin - DocCheck Flexikon.
<http://flexikon.doccheck.com/de/Heparin#Vorkommen>. Accessed June 27, 2018.

23. Eicosanoid - DocCheck Flexikon. <http://flexikon.doccheck.com/de/Eicosanoid>. Accessed June 27, 2018.
24. Cyclooxygenase - DocCheck Flexikon. <http://flexikon.doccheck.com/de/Cyclooxygenase>. Accessed June 27, 2018.
25. MedR Dr. Johannes Bauer - Labors.at. <https://www.labors.at/ueber-uns/laborleitung/mr-dr-johannes-bauer/>. Accessed February 19, 2020.
26. Amadeus H. *Pharmakologie.*; 2015. Accessed February 27, 2020.
27. Gerinnungshemmer - Nextdoc.at. <https://www.nextdoc.at/forums/topic/antikoagulantien-vs-thrombozytenaggregationshemmer/>. Accessed February 27, 2020.
28. P2Y12-Antagonist - DocCheck Flexikon. <http://flexikon.doccheck.com/de/P2Y12-Antagonist>. Accessed June 20, 2018.
29. Thrombozytenaggregationshemmer - DocCheck Flexikon. <https://flexikon.doccheck.com/de/Thrombozytenaggregationshemmer>. Accessed February 19, 2020.
30. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, et al. *Allgemeine Und Spezielle Pharmakologie Und Toxikologie.*; 2013. doi:10.1016/B978-3-437-42523-3.01002-2
31. International Normalized Ratio – Wikipedia. https://de.wikipedia.org/wiki/International_Normalized_Ratio. Accessed February 27, 2020.
32. Cowell RPW. Direct oral anticoagulants: integration into clinical practice. *Postgrad Med J.* 2014;90(1067):529-539. doi:10.1136/postgradmedj-2013-132474
33. Faktor-Xa-Hemmer - DocCheck Flexikon. <http://flexikon.doccheck.com/de/Faktor-Xa-Hemmer>. Accessed June 24, 2018.

34. Blutungen unter Xarelto und Eliquis: Das erste Antidot für Apixaban und Rivaroxaban kommt nach Europa. <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/news/artikel/2019/03/04/das-erste-antidot-fuer-apixaban-und-rivaroxaban-kommt-nach-europa>. Accessed February 27, 2020.
35. Brenztraubensäureethylester. <https://de.wikipedia.org/wiki/Brenztraubensäureethylester>. Accessed August 30, 2019.
36. Pyruvate – Wikipedia. <https://de.wikipedia.org/wiki/Pyruvate>. Accessed March 23, 2020.
37. Kao KK, Fink MP. The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(2):151-159. doi:10.1016/j.bcp.2010.03.007
38. Sims CA, Wattanasirichaigoon S, Menconi MJ, Ajami AM, Fink MP. Ringer's ethyl pyruvate solution ameliorates ischemia/reperfusion- induced intestinal mucosal injury in rats. *Crit Care Med.* 2001;29(8):1513-1518.
39. Yang R, Gallo DJ, Baust JJ, et al. Ethyl pyruvate modulates inflammatory gene expression in mice subjected to hemorrhagic shock. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283(1 46-1):212-221. doi:10.1152/ajpgi.00022.2002
40. Ulloa L, Ochani M, Yang H, et al. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(19):12351-12356. doi:10.1073/pnas.192222999
41. Thakur M, Ahmed AB. A review of thromboelastography. *Int J Perioper Ultrasound Appl Technol.* 2012;1(1):25-29. doi:10.5005/jp-journals-10027-1006
42. Impedanz-Aggregometrie zur Thrombozytenfunktion - Thrombozyten. <http://www.thrombozyten-info.de/impedanzaggregometrie.html>. Accessed August 30, 2018.

43. Wikipedia Thrombozytenaggrometrie.
<https://de.wikipedia.org/wiki/Thrombozytenaggrometrie>. Accessed August 30, 2018.
44. Thrombozytenaggrometrie.
<http://www.wikiwand.com/de/Thrombozytenaggrometrie>. Published 2005.
45. Moussalli H, Cvirn G. Diplomarbeit: Vollblut – Gerinnungsanalysen : Ermittlung von Referenzwerten anhand gesunder Probanden. 2014
46. Zentralinstitut für med. u chem. Labordiagnostik • Parameterdetails.
<https://zimcl.tirol-kliniken.at/page.cfm?vpath=parameterdetails&genericpageid=325>. Accessed September 1, 2018.
47. Leistungsverzeichnis | Universitätsklinikum Ulm.
<https://www.uniklinik-ulm.de/zentrale-einrichtung-klinische-chemie/leistungsverzeichnis.html>. Accessed September 1, 2018.
48. Goethe-universität DJW. Stellenwert der Thrombelastometrie für das Monitoring von Faktor XIII. 2015.
49. Kärntner Landeskrankenanstalt-Betriebsgesellschaft. Thrombelastogramm (ROTEM 05). <http://service.kabeg.at/labor/detail.php?id=718>. Accessed September 5, 2018.
50. Thrombelastometrie – Wikipedia.
<https://de.wikipedia.org/wiki/Thrombelastometrie>. Accessed September 5, 2018.
51. INNOVANCE PFA-200 System*.
<https://www.healthcare.siemens.at/hemostasis/systems/innovance-pfa-200>. Accessed September 5, 2018.
52. PFA-100. <https://en.wikipedia.org/wiki/PFA-100>. Accessed September 1, 2018.

53. Thrombozytenfunktionstest - MDI Labor Berlin. <https://www.mdi-labor.de/fuer-aerzte/laborinformationen/thrombozytenfunktionstest/>. Accessed September 6, 2018.
54. DeBlois RW, Bean CP. Counting and Sizing of Submicron Particles by the Resistive Pulse Technique. *Rev Sci Instrum.* 1970;41(7):909-916. doi:10.1063/1.1684724
55. Kx-. *Muster-Standardarbeitsanweisung SYSMEX Hämatologie-System KX-21N*
Muster-Standardarbeitsanweisung Für Den Sysmex Hämatologieanalysator.
https://www.sysmex.de/fileadmin/media/f101/Muster-Standardarbeitsanweisung/SOP_KX-21N.pdf. Accessed September 5, 2018.
56. Kleines Blutbild - DocCheck Flexikon.
http://flexikon.doccheck.com/de/Kleines_Blutbild. Accessed September 6, 2018.
57. Differentialblutbild - DocCheck Flexikon.
<http://flexikon.doccheck.com/de/Differentialblutbild>. Accessed September 6, 2018.
58. Tripodi A. Reviews Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. 2016;707. doi:10.1373/clinchem.2015.248625
59. Hemker HC, Al R, Regnault V. of Haemostasis Calibrated Automated Thrombin Generation Measurement in Clotting. 2003:4-15. doi:10.1159/000071636
60. Technothrombin® TGA - Diapharma.
<https://diapharma.com/product/hemostasis/technothrombin-thrombin-generation-assay-tga/#!measurementprinciple>. Accessed November 17, 2018.
61. *TABLE OF CONTENTS GENERAL INFORMATION 3 Materials Supplied 4 Safety Data 4 Precautions 4 If You Have Problems.*
<https://www.caymanchem.com/pdfs/700410.pdf>. Accessed May 22, 2019.

62. Nakatsu T, Ichiyama S, Hiratake J, et al. Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature*. 2006;440(7082):372-376. doi:10.1038/nature04542
63. Partielle Thromboplastinzeit – Wikipedia. https://de.wikipedia.org/wiki/Partielle_Thromboplastinzeit. Accessed March 8, 2020.
64. Quick-Wert – Wikipedia. <https://de.wikipedia.org/wiki/Quick-Wert>. Accessed March 8, 2020.
65. Rossmann C, Nusshold C, Paar M, et al. Ethyl pyruvate inhibits oxidation of LDL in vitro and attenuates oxLDL toxicity in EA. hy926 cells. *PLoS One*. 2018;13(1):1-19. doi:10.1371/journal.pone.0191477
66. Li W, Yang X, Peng M, Li C, Mu G, Chen F. Inhibitory effects of ethyl pyruvate on platelet aggregation and phosphatidylserine exposure. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;487(3):560-566. doi:10.1016/j.bbrc.2017.04.087
67. Stafford NP, Pink AE, White AE, Glenn JR, Heptinstall S. Mechanisms involved in adenosine triphosphate-induced platelet aggregation in whole blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(10):1928-1933. doi:10.1161/01.ATV.0000089330.88461.D6
68. P-Selectin. Wikipedia.com. <https://en.wikipedia.org/wiki/P-selectin>. Accessed September 1, 2018.
69. Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem*. 1985;260(20):11107-11114. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2411729>. Accessed February 12, 2019.
70. *P2Y12-Antagonist - DocCheck Flexikon*. <http://flexikon.doccheck.com/de/P2Y12-Antagonist>. Accessed June 20, 2018.

71. Wagner N, Dieteren S, Franz N, et al. Ethyl pyruvate ameliorates hepatic injury following blunt chest trauma and hemorrhagic shock by reducing local inflammation, NF-kappaB activation and HMGB1 release. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192171. doi:10.1371/journal.pone.0192171
72. Han Y, Englert J a, Yang R, Delude RL, Fink MP. Ethyl pyruvate inhibits nuclear factor-kappaB-dependent signaling by directly targeting p65. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312(3):1097-1105. doi:10.1124/jpet.104.079707.al.
73. NF-κB - DocCheck Flexikon. <https://flexikon.doccheck.com/de/NF-κB>. Accessed February 27, 2020.
74. Atherogenese - DocCheck Flexikon. <https://flexikon.doccheck.com/de/Atherogenese#Pathomechanismus>. Accessed September 21, 2018.
75. Joseph Woo Y, Taylor MD, Jeffrey Cohen Vasant Jayasankar BE, et al. Cardiopulmonary Support and Physiology Ethyl pyruvate preserves cardiac function and attenuates oxidative injury after prolonged myocardial ischemia 1262 The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery • *J Thorac Cardiovasc Surg*. 127:1262-1271. doi:10.1016/j.jtcvs.2003.11.032
76. Hartman J, Frishman WH. Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. *Cardiol Rev*. 2014;22(3):147-151. doi:10.1097/CRD.0000000000000021
77. Wang G, Liu K, Li Y, et al. Endoplasmic reticulum stress mediates the anti-inflammatory effect of ethyl pyruvate in endothelial cells. *PLoS One*. 2014;9(12):e113983. doi:10.1371/journal.pone.0113983
78. Bennett-Guerrero E, Swaminathan M, Grigore AM, et al. A Phase II Multicenter Double-Blind Placebo-Controlled Study of Ethyl Pyruvate in High-Risk Patients Undergoing Cardiac Surgery With Cardiopulmonary Bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2009;23(3):324-329. doi:10.1053/j.jvca.2008.08.005

Anhang

<p>(Arbeits-)Titel</p> <p><i>Das Thema der Diplomarbeit ist einem der im Curriculum festgelegten Prüfungsfächer zu entnehmen.</i></p>	<p>Die antikoagulatorischen Eigenschaften von Ethylpyruvat</p>
<p>Konzept erstellt von:</p> <p>Erstellt am:</p> <p>Revisionsdatum bei Änderungen:</p> <p>Version: <i>(Erste eingereichte Version ist „01“)</i></p> <p>Matrikelnummer:</p> <p>Studienkennzahl:</p>	<p>August Fiegl</p> <p>27.09.2017</p> <p>01</p> <p>01433214</p> <p>O202</p>
<p>Betreuer/in:</p> <p>Institut/Klinik:</p> <p>Kontakt: <i>(Adresse, Telefonnummer, E-Mail)</i></p> <p>Zweite/r Betreuer/in:</p> <p>Kontakt: <i>(Adresse, Telefonnummer, E-Mail)</i></p>	<p>Gerhard Cvirn</p> <p>Institut für Physiologische Chemie</p> <p>Neue Stiftingtalstraße 6, 385 72122, gerhard.cvirn@medunigraz.at</p> <p>Gerd Hörl</p> <p>Neue Stiftingtalstraße 6, 385 72127, gerd.hoerl@medunigraz.at</p>
<p>Kernfrage und Zielsetzung</p> <p><i>Wie lautet die Fragestellung?</i></p> <p><i>Warum ist diese Frage von Bedeutung?</i></p> <p><i>Welche Ergebnisse sind im Wesentlichen zu erwarten?</i></p> <p><i>Worin besteht der theoretische Kern der Arbeit?</i></p> <p>Sind die Forschungsfrage und die mit dem Projekt angestrebte Zielsetzung für Männer und Frauen gleichermaßen bedeutsam? Detaillierte Angaben!</p>	<p>Im Rahmen dieser Diplomarbeit soll der Einfluss von Ethylpyruvat (EP) auf die Blutgerinnung untersucht werden. Diese Diplomarbeit unterteilt sich in zwei Abschnitte.</p> <p>Im ersten soll eine intensive Literaturrecherche betrieben werden um alle bis jetzt bekannten gerinnungsrelevanten Eigenschaften von EP zu dokumentieren. So z.B., dass EP in der Lage ist, die Tissue Factor (TF)-Produktion, des wichtigsten "Starters" der Gerinnungskaskade, bereits auf mRNA-Ebene zu unterdrücken.</p> <p>Im zweiten Abschnitt soll der Einfluss von EP auf das Hämostasesystem im Vollblut untersucht werden. Es sollen sowohl die primäre Hämostase (Thrombozytenadhäsion, -aggregation</p>

	<p>und -funktion) aber auch die sekundäre Hämostase mittels Thrombelastometrie untersucht werden.</p> <p>Die Ergebnisse dieser Diplomarbeit sollen dabei helfen abzuschätzen, ob EP zukünftig als Antikoagulanzen eingesetzt werden könnte.</p>
<p>Kurzbeschreibung (max. 20 Zeilen) <i>Worin besteht der Neuigkeitswert?</i></p>	<p>Patienten mit Sepsis müssen meist intensivmedizinisch behandelt werden. In der Sepsis wird TF hochreguliert und führt nicht selten zu disseminated intravascular coagulation (DIC) mit darauffolgendem multiplen Organversagen.</p> <p>Ethylpyruvat, der Ethylester der Brenztraubensäure, ist ein neues, vielversprechendes Agens zur Behandlung von Sepsis, da es in der Lage ist, die Konzentration des TFs zu reduzieren. Dies lässt sich auf seine anti-inflammatorischen und anti-oxidativen Eigenschaften zurückführen.</p> <p>Der bei Sepsis hochregulierte TF spielt eine sehr wichtige Rolle in der Blutgerinnung. Im Komplex mit aktiviertem Faktor VII gilt er als "Starter" der Gerinnungskaskade. Da EP in der Lage ist die Konzentration des TFs zu regulieren, soll der mögliche Einfluss des EPs auf die Hämostase im Rahmen dieser Diplomarbeit untersucht werden.</p> <p>Thrombelastometrie, Thrombozytenaggregation und –adhäsion sollen zur Anwendung kommen. Die entsprechenden Messgeräte PFA 200, ROTEM 05, Chrono Log Modell 700 und Impact R Cone and Plate(let) Analyzer stehen am Institut für Physiologische Chemie zur Verfügung.</p> <p>Auf bereits vorhandenem Datenmaterial kann aufgebaut werden.</p>
<p>Methodenwahl <i>Welche Methoden stehen zur Beantwortung der Frage zur Verfügung?</i></p>	<p>Literaturrecherche, Labormethoden (Thrombelastometrie, Thrombozytenaggregometrie,</p>

<p>Wieso wählen Sie genau diese Methode?</p>	<p>Thrombozytenfunktion)</p>
<p>Ethikkommissionsvotum Ist ein Votum der Ethikkommission erforderlich? Siehe Informationsblatt „Genehmigung Ethikkommission“</p>	<p>Nicht erforderlich</p>
<p>Datenerhebung (falls zutreffend) Werden aufgrund der oben genannten Methodenwahl medizinische Daten benötigt? Wenn ja, welche? Mit welcher Fallzahl ist zu rechnen? Wie wurde die Fallzahl ermittelt? Wie ist das PatientInnenkollektiv zu beschreiben (Mindest-/Höchstalter, Geschlechtsverteilung, Begleiterkrankungen, etc.)? Bitte beachten Sie, dass eine Weitergabe der Daten an projektfremde Personen gemäß Datenschutzgesetz nicht zulässig ist. Das Bekanntwerden von PatientInnendaten ist durch Pseudonymisierung (Codierung mit fortlaufender Nummer) und ggf. Zugriffsbeschränkungen zu verhindern.</p>	<p>Nicht zutreffend</p>
<p>Datenauswertung Welche Hauptzielgröße wird analysiert (z.B. Alter bei Diagnosestellung/Alter bei Operation/Diagnose, etc.)? Wie wird die Hauptzielgröße analysiert? Welche Nebenzielparameter sollen betrachtet werden? Mit welchen Methoden erfolgt die Auswertung?</p>	<p>Hauptzielgröße: Verschlusszeiten im PFA200-Assay Nebenzielparameter: Maximum Clot Firmness im Thrombelastometrie-Assay Student's t-test bzw. Mann-Whitney U-Test</p>
<p>Zeitplan (grob strukturiert) Wann wird mit der Arbeit begonnen? Wann wird ein Antrag bei der Ethikkommission gestellt, sofern ein Votum erforderlich ist? Welche Meilensteine wurden zwischen dem/der Studierenden und den BetreuerInnen vereinbart? Wann ist voraussichtlich mit der Beendigung der Arbeit zu rechnen? Welche formalen Schritte sind für die Umsetzung der Diplomarbeit notwendig?</p>	<p>Start: 27.9.2020 Beendigung: 16.9.2020 Literatursuche, praktische Durchführung von Versuchen im Labor, Verfassen der Diplomarbeit, Präsentation der Resultate am Institut für Physiologische Chemie</p>

<p>Referenzen</p> <p>Welche Literatur ist relevant? Gibt es Vergleichsstudien?</p>	<p>Kao et al. (2010). The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds. <i>Biochemical Pharmacology</i> 89; 151-159; Kung et al. (2011). In vivo anticoagulant effect of ethyl pyruvate in endotoxemic rats. <i>Thromb Res</i> 127; 582-588.</p>
<p>Benötigte Ressourcen</p> <p><i>Werden Geld- oder Sachmittel von Einrichtungen der Med Uni Graz benötigt?</i> Die Vergabe ist nur zulässig, wenn die Leiterin/der Leiter dieser Einrichtung über die beabsichtigte Vergabe informiert wurde und diese nicht binnen eines Monats untersagt hat.</p>	<p>Keine</p>