

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

Untersuchung des tatsächlichen Einflusses häufig angewandter nichtsteroidaler  
Antiphlogistika auf die Thrombozytenfunktion. Vergleich der angewandten  
Methoden Durchflusszytometrie, Aggregometrie, Thrombelastographie und des  
Platelet Function Analyser - 100 hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit und  
Praktikabilität.

**Dissertation**

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Stephan Brandl  
aus Stuttgart  
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. E. Hiller

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. A. J. Reiningger  
Prof. Dr. W. Schramm

Betreuung durch den  
habilitierten Mitarbeiter: PD. Dr. med. R. Pihusch

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2006

## **Meinen Eltern**

## Inhaltsübersicht

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
2.1	Probandenkollektiv .....	18
2.2	Wahl der Messzeitpunkte.....	18
2.3	Die Medikamente.....	18
2.4	Die Durchflußzytometrie .....	19
2.5	Die thrombozytären Glykoproteine und ihre markierenden Antikörper .....	27
2.6	PFA-100.....	37
2.7	Die Aggregometrie .....	39
2.8	Die Thrombelastographie .....	41
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>43</b>
3.1	Statistisch signifikante Ergebnisse aus der FACS-Analyse .....	43
3.2	Statistisch signifikante Ergebnisse aus der PFA-100-Analyse.....	58
3.3	Statistisch signifikante Ergebnisse aus der Aggregometrie-Analyse .....	63
3.4	Statistisch signifikante Ergebnisse aus der Thromb-elastographie .....	66
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>74</b>
4.1	Durchflusszytometrie.....	74
4.2	PFA-100.....	78
4.3	Aggregometrie .....	79
4.4	Thrombelastographie .....	80
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>83</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>86</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS UND ANHANG .....</b>	<b>87</b>

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
2.1	Probandenkollektiv .....	18
2.2	Wahl der Messzeitpunkte.....	18
2.3	Die Medikamente.....	18
2.4	Die Durchflußzytometrie .....	19
2.4.1	Prinzip der Durchflußzytometrie bei Thrombozyten.....	19
2.4.2	Probenansätze .....	20
2.4.3	Geräteeinstellungen .....	20
2.4.4	Auswertung der Messungen.....	22
2.5	Die thrombozytären Glykoproteine und ihre markierenden Antikörper .....	27
2.5.1	Markierung der Thrombozytenoberflächenrezeptoren .....	27
2.5.1.1	Thrombozytenidentifikation: CD 41 .....	27
2.5.1.2	GPIb/V/IX.....	28
2.5.1.3	GpIIb/IIIa.....	29
2.5.1.4	CD154.....	31
2.5.1.5	GP Ia/IIa, GP Ic/IIa, GP Ic´/IIa.....	32
2.5.1.6	GP IIIb (CD36) .....	32
2.5.2	Detektion der Thrombozytengranula .....	33
2.5.2.1	$\alpha$ -Granula.....	33
2.5.2.2	Lysosomen.....	34
2.5.2.3	$\delta$ -Granula .....	34
2.5.3	Aktivatoren der Thrombozyten.....	35
2.5.3.1	ADP (Adenosindiphosphat).....	35
2.5.3.2	TRAP-6 (Thrombinrezeptor-Aktivator-Protein-6) .....	35
2.5.3.3	Adrenalin .....	36
2.5.4	Vorbereitung der Blutproben für die FACS-Analyse .....	36
2.6	PFA-100.....	37
2.6.1	Meßprinzip.....	37

---

2.6.2	Vorbereitung der Blutproben zur Bestimmung der PFA-100-Verschlusszeit .....	38
2.6.3	Durchführung der PFA-100-Analyse .....	38
2.7	Die Aggregometrie .....	39
2.7.1	Das Messprinzip .....	40
2.7.2	Durchführung.....	40
2.8	Die Thrombelastographie .....	41
2.8.1	Meßprinzip.....	41
2.8.2	Durchführung.....	42
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>43</b>
3.1	Statistisch signifikante Ergebnisse aus der FACS-Analyse .....	43
3.1.1	Statistisch signifikante Ergebnisse aus der FACS-Analyse, zum Rezeptor P-Selektin mit dem Antikörper anti-CD 62p, ohne Stimulation durch ADP oder TRAP, nach Einnahme der untersuchten Medikamente.....	43
3.1.1.1	FACS, ASS, anti-CD-62p, ohne Stimulation .....	43
3.1.1.2	FACS, Ibuprofen, anti-CD-62p, ohne Stimulation.....	44
3.1.1.3	FACS, Diclofenac, anti-62p, ohne Stimulation.....	45
3.1.2	Statistisch signifikante Ergebnisse aus der FACS-Analyse zum Rezeptor P-Selektin, nach Stimulation der Thrombozyten durch ADP, nach Einnahme der untersuchten Medikamente.....	47
3.1.2.1	FACS, Diclofenac, anti-62p, nach Stimulation durch ADP.....	47
3.1.3	Statistisch signifikante Ergebnisse aus der FACS-Analyse zum Rezeptor CD-63, ohne Stimulation der Thrombozyten durch ADP oder TRAP, nach Einnahme der untersuchten Medikamente.....	49
3.1.3.1	FACS, Paracetamol, anti-CD-63, ohne Stimulation.....	49
3.1.3.2	FACS, Diclofenac, anti-CD-63, ohne Stimulation .....	50
3.1.4	Statistisch signifikante Ergebnisse aus der FACS-Analyse zum Rezeptor CD 63, mit Stimulation durch TRAP, nach Einnahme der untersuchten Medikamente .....	51
3.1.4.1	FACS, Diclofenac, anti-CD-63, Stimulation mit TRAP .....	51
3.1.5	Statistisch signifikante Ergebnisse aus der FACS-Analyse zum Rezeptor CD 41, mit Stimulation durch TRAP, nach Einnahme der untersuchten Medikamente .....	53

---

3.1.5.1	FACS, Paracetamol, anti-CD-41, Stimulation mit TRAP .....	53
3.1.5.2	FACS, Rofecoxib, anti-CD-41, Stimulation mit TRAP .....	54
3.1.6	Statistisch signifikante Ergebnisse aus der FACS-Analyse zum Rezeptor PAC-1, ohne Stimulation, nach Einnahme der untersuchten Medikamente	
	56	
3.1.6.1	FACS, Rofecoxib, PAC-1, ohne Stimulation .....	56
3.2	Statistisch signifikante Ergebnisse aus der PFA-100-Analyse .....	58
3.2.1	Statistisch signifikante Veränderung der In-vitro-Verschlusszeit nach Einnahme von ASS bei Epinephrin beschichteter Kapillare .....	58
3.2.2	Statistisch signifikante Veränderung der In-vitro-Verschlusszeit nach Einnahme von Ibuprofen bei epinephrinbeschichteter Kapillare .....	59
3.2.3	Statistisch signifikante Veränderung der Verschlusszeit nach Einnahme von Paracetamol bei epinephrinbeschichteter Kapillare .....	60
3.2.4	Statistisch signifikante Veränderung der In-vitro-Verschlusszeit nach Einnahme von Diclofenac bei ADP-beschichteter Kapillare .....	61
3.3	Statistisch signifikante Ergebnisse aus der Aggregometrie-Analyse .....	63
3.3.1	Statistisch signifikante Veränderung der benötigten Agonistenmenge bis zum Erreichen einer Aggregation nach dreimaliger Einnahme von ASS .	63
3.3.1.1	Messung nach Einnahme von Aspirin, Stimulation mit ADP .....	63
3.3.1.2	Messung nach Einnahme von ASS, Stimulation mit Collagen ....	64
3.4	Statistisch signifikante Ergebnisse aus der Thromb-elastographie .....	66
3.4.1	Statistisch signifikante Veränderungen der R-Zeit, K-Zeit und MA-Zeit nach dreimaliger Einnahme von ASS .....	66
3.4.1.1	Messung der R-Zeit nach Einnahme von ASS .....	66
3.4.1.2	Messung der K-Zeit nach Einnahme von ASS .....	67
3.4.1.3	Messung der MA-Zeit nach Einnahme von ASS .....	68
3.4.2	Statistisch signifikante Veränderung der R-Zeit nach dreimaliger Einnahme von Diclofenac .....	69
3.4.2.1	Messung der R-Zeit nach Einnahme von Diclofenac .....	69
3.4.3	Statistisch signifikante Veränderung der R-Zeit, der K-Zeit und der MA-Zeit nach dreimaliger Einnahme von Rofecoxib .....	70
3.4.3.1	Messung der R-Zeit nach Einnahme von Rofecoxib .....	70
3.4.3.2	Messung der K-Zeit nach Einnahme von Rofecoxib .....	71
3.4.3.3	Messung der MA-Zeit nach Einnahme von Rofecoxib .....	72

---

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>74</b>
4.1	Durchflusszytometrie.....	74
4.2	PFA-100.....	78
4.3	Aggregometrie .....	79
4.4	Thrombelastographie .....	80
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>83</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>86</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS UND ANHANG</b> .....	<b>87</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1: Der Arachidonsäurestoffwechsel .....	15
Abbildung 2: SSC-Fl 2-Diagramm zur Auswertung der Probenansätze .....	21
Abbildung 3: Fl 1-Histogramm .....	22
Abbildung 4: Differenzierung der Thrombozytenaggregate im SSC-Fl1-Diagramm ..	23
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Thrombozyten .....	25
Tabelle 1: Rezeptorklassifikation thrombozytärer Glykoproteine .....	26
Abbildung 6: Bindungskurve des Anti-CD 41,PE - Antikörpers .....	28
Abbildung 7: Das Glykoprotein IIb/IIIa.....	30
Abbildung 8: Schematischer Aufbau zur Messung der in-vitro-Blutungszeit .....	39
Abbildung 9: Meßprinzip und Auswertung eines Thrombelastogramms .....	42
Abbildung 10: P-Selektin-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-CD62p-Antikörpers ohne Stimulation durch ADP oder TRAP, nach Einnahme von ASS. ....	44
.....	44
Abbildung 11: P-Selektin-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-CD62p-Antikörpers ohne Stimulation, nach Einnahme von Ibuprofen .....	44
Abbildung 12: P-Selektin-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-CD62p-Antikörpers ohne Stimulation, nach Einnahme von Diclofenac.....	45
Tabelle 2: Auswirkungen der untersuchten Medikamente auf die P-Selektin- Expression ohne Stimulation der Thrombozyten mittels ADP und PAF; + Mehrexpression, 0 kein signifikanter Unterschied, - verminderte Expression.....	46
.....	47
Abbildung 13: P-Selektin-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-CD62p-Antikörpers mit Stimulation der Thrombozyten durch ADP, nach Einnahme von Diclofenac.....	47
Tabelle 3: Auswirkungen der untersuchten Medikamente auf die P-Selektin- Expression mit Stimulation der Thrombozyten mittels ADP; + Mehrexpression, 0 kein signifikanter Unterschied, - verminderte Expression. ....	48

.....	49
Abbildung 14: GP-53-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-CD63-Antikörpers ohne Stimulation der Thrombozyten durch ADP oder TRAP, nach Einnahme von Paracetamol.....	49
Abbildung 15: GP-53-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-CD63-Antikörpers ohne Stimulation der Thrombozyten durch ADP oder TRAP nach Einnahme von Diclofenac.....	50
Tabelle 4: Auswirkungen der untersuchten Medikamente auf die Expression des GP-53 ohne Stimulation der Thrombozyten mittels ADP oder TRAP; + Mehrexpression, 0 kein signifikanter Unterschied, - verminderte Expression.....	51
Abbildung 16: GP-53-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-CD63-Antikörpers mit Stimulation der Thrombozyten durch TRAP nach Einnahme von Diclofenac.....	51
Tabelle 5: Auswirkungen der untersuchten Medikamente auf die Expression des GP-53 nach Stimulation der Thrombozyten mittels TRAP; + Mehrexpression, 0 kein signifikanter Unterschied, - verminderte Expression.....	52
Abbildung 17: GP IIb-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-CD41-Antikörpers mit Stimulation der Thrombozyten durch TRAP nach Einnahme von Paracetamol.....	53
Abbildung 18: GP IIb-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-CD41-Antikörpers mit Stimulation der Thrombozyten durch TRAP nach Einnahme von Rofecoxib.....	54
Tabelle 6: Auswirkungen der untersuchten Medikamente auf die Expression des GP-IIb nach Stimulation der Thrombozyten mittels TRAP; + Mehrexpression, 0 kein signifikanter Unterschied, - verminderte Expression.....	55
Abbildung 19: GP-IIb/IIIa-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-PAC-1-Antikörpers ohne Stimulation der Thrombozyten durch ADP oder TRAP nach Einnahme von Rofecoxib.....	56
Tabelle 7: Auswirkungen der untersuchten Medikamente auf die Expression des GP-IIb/IIIa ohne Stimulation der Thrombozyten mittels TRAP; +	

Mehrexpression, 0 kein signifikanter Unterschied, - verminderte Expression. ....	57
Abbildung 20: Veränderungen der In-vitro-Verschlusszeit nach Einnahme von ASS, gemessen in Sekunden, bei epinephrinbeschichteter Kapillare. ....	58
Abbildung 21: Veränderungen der In-vitro-Verschlusszeit nach Einnahme von Ibuprofen, gemessen in Sekunden, bei epinephrinbeschichteter Kapillare. ....	59
Abbildung 22: Veränderungen der In-vitro-Verschlusszeit nach Einnahme von Paracetamol, gemessen in Sekunden, bei epinephrinbeschichteter Kapillare. ....	60
Abbildung 23: Veränderungen der In-vitro-Verschlusszeit nach Einnahme von Diclofenac, gemessen in Sekunden, bei ADP-beschichteter Kapillare.	61
Tabelle 8: Auswirkungen der untersuchten Medikamente auf die In-vitro-Verschlusszeit bei Epinephrin- und ADP-beschichteter Kapillare; + Verlängerung der Verschlusszeit, 0 kein signifikanter Unterschied, - verkürzte Verschlusszeit. ....	62
	63
Abbildung 24: Anstieg der benötigten Menge ADP, um eine vergleichbare Aggregation nach Einnahme von ASS auszulösen .....	63
Abbildung 25: Anstieg der benötigten Menge Collagen, um eine vergleichbare Aggregation nach Einnahme von ASS auszulösen .....	64
Tabelle 9: Auswirkungen der untersuchten Medikamente auf die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten anhand der Aggregometrie im Sinne einer signifikant erhöhten Agonistendosis, + signifikante Erhöhung der benötigten Agonistendosis; 0 kein signifikanter Unterschied; - signifikante Verminderung der benötigten Agonistendosis. ....	65
Abbildung 26: Verlängerung der Dauer bis zum Beginn der plasmatischen Gerinnung nach Einnahme von ASS .....	66
Abbildung 27: Verlängerung der Koagelbildungsdauer nach Einnahme von ASS .....	67
Abbildung 28: Signifikante Verlängerung der Zeitdauer bis zum Erreichen des festmöglichen Blutgerinnsels nach Einnahme von ASS. ....	68
Abbildung 29: Verlängerung der Dauer bis zum Beginn der plasmatischen Gerinnung nach Einnahme von Diclofenac.....	69

---

Abbildung 30: Verlängerung der Dauer bis zum Beginn der plasmatischen Gerinnung nach Einnahme von Rofecoxib. ....	70
Abbildung 31: Verlängerung der Koagelbildungsdauer nach Einnahme von Rofecoxib	71
Abbildung 32: Signifikante Verlängerung der Zeitdauer bis zum Erreichen des festmöglichen Blutgerinnsels nach Einnahme von Rofecoxib. ....	72
Tabelle 10: Auswirkungen der untersuchten Medikamente auf die Thrombelastographie. + Verlängerung der Messzeit, 0 keine statistisch signifikante Veränderung der Messzeit. ....	73
Tabelle 11: Zusammenfassende Tabelle der angewandten Methoden und der aufgetretenen Veränderungen der Thrombozytenfunktion nach Einnahme der untersuchten Medikamente. + statistisch signifikante Veränderungen; 0 = keine statistisch signifikanten Veränderungen...	82

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
Ca	Kalzium
Coll	Kollagen
COX	Cyclooxygenase
FITC	Fluoreszin-Isothiocynat
FSC	Forward-Scatter
GP	Glykoprotein
NSAID	Non-steroidal-anti-inflammatory-drugs
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-a- und Protein
PFA-100	Platelet-Function-Analyser-100
PRP	Plättchenreiches Plasma
SSC	Side-Scatter
TRAP	Thrombin-Rezeptor-Aktivator-Protein
vWF	von Willebrand-Faktor
µl	Mikroliter

# 1 Einleitung

Die Bestimmung der Thrombozytenfunktion ist aufgrund der Entwicklung neuer Medikamente, die in der Lage sind, die Thrombozytenfunktion zu beeinflussen, immer bedeutsamer geworden. Vier Methoden zur Bestimmung der Thrombozytenfunktion, mit ihren Vor- und Nachteilen, sollen in der hier vorliegenden Arbeit verglichen werden. Sie beschäftigt sich mit dem tatsächlichen Einfluss von häufig eingesetzten nichtsteroidalen Antiphlogistika (Acetylsalicylsäure, Ibuprofen, Paracetamol, Diclofenac, Rofecoxib) auf die Thrombozytenfunktion. Außerdem sollte festgestellt werden, welche der hier angewandten Methoden (Durchflusszytometrie, Aggregometrie, Thrombelastographie und Platelet Function Analyser-100) zur Darstellung der Thrombozytenfunktion nach Einnahme von NSAIDs die empfindlichste und praktikabelste ist.

## Die Bedeutung der Thrombozytenfunktion

Die Thrombozyten sind kernfreie Zellen, die bei Gefäßverletzungen innerhalb kürzester Zeit aggregieren und den ersten Wundverschluss erzielen. Bei einer Gefäßverletzung werden endotheliale Kollagenfasern freigelegt, an die sich die Thrombozyten sofort anheften. Dies geschieht durch das von den Endothelzellen gebildete Protein von Willebrand-Faktor. Der von Willebrand-Faktor bildet eine Brücke zwischen den Kollagenfasern des Endothels und dem für den vWF spezifischen Rezeptor GPIb auf der Thrombozytenmembran. Die Aktivierung der plasmatischen Gerinnung führt dann zu einer Konsolidierung des Wundverschlusses durch Fibrin. Den Abbau des Fibringerinnsels übernimmt das fibrinolytische Plasminsystem des Plasmas. Die Wundheilung erfolgt durch lokal freigesetzte Wachstumsfaktoren, die von Thrombozyten, Makrophagen und Endothelzellen abgegeben werden.

## Der Thrombozyt

Die Thrombozyten entstehen durch Abschnürung aus den Megakaryozyten des Knochenmarks. Aus jedem Megakaryozyt entstehen bis zu 500 Thrombozyten. Die normale Thrombozytenzahl liegt zwischen 150.000-300.000/ $\mu$ l Blut. Fällt die

Thrombozytenzahl unter 50.000/ $\mu$ l Blut, muss mit Störungen in der initialen Blutstillung gerechnet werden.

Aus den glatten, scheibenförmigen Thrombozyten werden bei Aktivierung kugelige Gebilde mit langen Fortsätzen, die es den aggregierten Thrombozyten ermöglichen, ein eng verzahntes Netz auszubilden. Bei der  $Ca^{2+}$  - vermittelten Formveränderung kommt es gleichzeitig zur Sekretion des Inhalts der  $\alpha$ -Granula.

### **Die Primäre Hämostase**

Bei einer Verletzung, z.B. der oberflächlichen Haut, kommt die Blutung im Allgemeinen nach wenigen Minuten zum Stillstand. Dies beruht auf einer regelrechten Vasokonstriktion der verletzten Gefäße, einer raschen Thrombozytenadhäsion und – aktivierung mit nachfolgender Thrombozytenaggregation an der Verletzungsstelle. Bei einem Defekt eines der genannten Systeme kommt es zu einer deutlich verlängerten Blutungszeit.

### **Die Thrombozytenadhäsion**

Die Thrombozyten adhären bereits kurze Zeit nach einer Gefäßläsion an der Verletzungsstelle. Dies ist bedingt durch den Kontakt der Plättchen mit subendothelialen Strukturen, wie zum Beispiel Kollagen. Die Thrombozytenadhäsion wird durch Glykoproteinrezeptoren der Familie der Integrine ermöglicht. Das Glykoprotein GP Ib ist der wichtigste Adhäsionsrezeptor der Thrombozyten für den Von-Willebrand-Faktor, der als Verbindung zwischen Thrombozyt und Subendothel dient.

### **Die Thrombozytenaggregation**

Unter Thrombozytenaggregation versteht man das Zusammenlagern der aktivierten Thrombozyten. Die Aggregation wird durch die aktivierten Glykoproteine GP IIb/IIIa, die Fibrinogen als Brücke zwischen den Thrombozyten binden, ermöglicht. Diese Vernetzung ermöglicht so die Bildung eines instabilen Plättchenpfropfens, z.B. an einer Verletzungsstelle. Die Aggregation kann über verschiedene Stoffwechselwege ausgelöst werden. Das geschieht zum einen über ADP aus stimulierten Thrombozyten, zum anderen über den plättchenaktivierenden Faktor und außerdem über das

Prostaglandin-Thromboxan-System sowie über Substanzen wie Adrenalin, Serotonin, Kollagen und Thrombin.

Die Aggregation ist zunächst reversibel, bevor es zur viskösen Metamorphose, einem Verschmelzen der Plättchen unter Membranverlust, kommt.

### **Wirkungsmechanismus der nichtsteroidalen Antiphlogistika**

Die nichtsteroidalen Antiphlogistika wirken analgetisch, antipyretisch und entzündungshemmend. Als Wirkprinzip der Entzündungshemmung wird die Hemmung der Cyclooxygenase (Isoenzyme COX-1 und COX-2) und damit der Prostaglandinsynthese (durch Hemmung des Arachidonsäurestoffwechsels) angesehen. Prostaglandine werden in geschädigten Geweben vermehrt freigesetzt und haben eine sensibilisierende Wirkung auf periphere Nozizeptoren; dies erklärt die analgetische Wirkung der NSAIDs. Die entzündungshemmende Wirkung beruht darauf, dass Prostaglandine wichtige Mediatoren der Entzündungsreaktion sind (Vasodilatation und Erhöhung der Gefäßpermeabilität). Auch bei der Vermittlung der Fieberreaktion sind Prostaglandine beteiligt, jedoch ist ihre genaue Funktion in der hypothalamischen Temperaturregulation noch nicht erklärt.

NSAIDs binden in der Nähe des aktiven Zentrums der Cyclooxygenase und hemmen dadurch den Zugang der Arachidonsäure und die Synthese von Prostaglandinen. In den letzten Jahren wurden verschiedene Isoenzyme der Cyclooxygenase mit unterschiedlicher Funktion und pharmakologischer Beeinflussbarkeit entdeckt. Das Isoenzym Cyclooxygenase COX-1, ein überwiegend konstitutiv exprimiertes Enzym, ubiquitär vorhanden, reguliert die Magenprotektion, die Bronchodilatation, die Nierendurchblutung und die Thrombozytenaggregation. Das Isoenzym COX-2 ist ein überwiegend induzierbares Enzym (durch Interleukine und Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ), vor allem in Makrophagen und Monozyten vorkommend, das wesentlich an der Vermittlung der Entzündungsreaktion beteiligt ist.

### **Der Arachidonsäurestoffwechsel**

Der Arachidonsäurestoffwechsel ist der zentrale Angriffspunkt der nichtsteroidalen Antiphlogistika. Arachidonsäure ist eine ungesättigte Fettsäure mit vier Doppelbindungen. Bedeutung besitzt die Arachidonsäure als Ausgangssubstanz für die

Synthese der Prostaglandine, der Leukotriene und von Thromboxan A<sub>2</sub>, die Funktionen als Gewebsmediatoren wahrnehmen.

Der Arachidonsäurestoffwechsel ist für das Prostaglandin-Thromboxansystem wichtig. Hier wird aus der Plättchenmembran durch die Phospholipase A<sub>2</sub> Arachidonsäure freigesetzt. Freie Arachidonsäure wird durch die Cyclooxygenase in die instabilen zyklischen Endoperoxide (PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>) überführt. Diese sind Ausgangsprodukte für eine Reihe antagonistisch wirkender Substanzen. In den Thrombozyten entsteht vor allem durch die Thromboxan-Synthetase das instabile Thromboxan A<sub>2</sub>, das spontan mit einer Halbwertszeit von 30 Sekunden zum stabilen, biologisch unwirksamen Thromboxan B<sub>2</sub> hydrolysiert wird. Thromboxan A<sub>2</sub>, das Hauptprodukt des Arachidonsäurestoffwechsels im Thrombozyten, kann die Thrombozytenaggregation und die Thrombozytensekretion sowie die Vasokonstriktion induzieren.

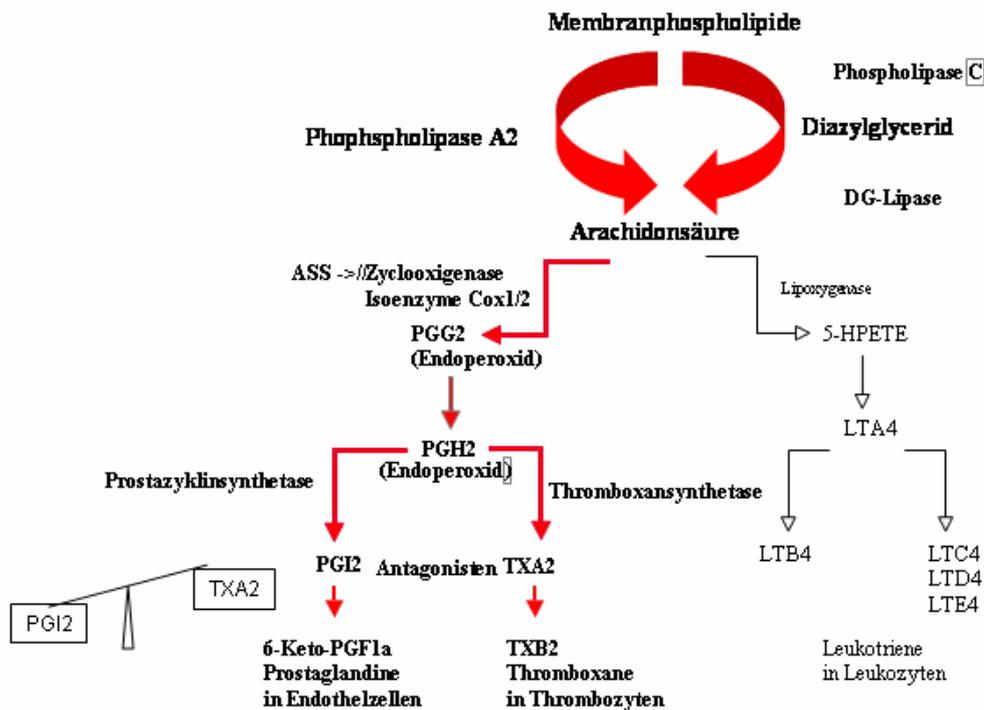
In Endothelzellen wird aus den im Arachidonsäurestoffwechsel gebildeten Endoperoxidasen vorrangig durch die Prostazyklinsynthetase Prostazyklin (Prostaglandin I<sub>2</sub>) gebildet.

Gewebeverletzung, oxidativer Stress, Zytokine, und Wachstumsfaktoren aktivieren die Phospholipase A<sub>2</sub>, die wiederum die Membranphospholipide zu freier Arachidonsäure hydrolysiert<sup>1</sup>. Die Cyclooxygenase, auch bekannt als Prostaglandin G/H Synthase, ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Metabolisierung von Arachidonsäure zu Prostanoiden (Prostaglandine und Thromboxane). Die Cyclooxygenase liegt in drei Isoenzymen vor. Die Enzyme katalysieren eine Cyclooxygenasereaktion, bei der Arachidonsäure zu Prostaglandin-G<sub>2</sub> oxygeniert wird, und eine Peroxidasereaktion, bei der Prostaglandin-G<sub>2</sub> zu Prostaglandin-H<sub>2</sub> reduziert wird. Gewebespezifische Synthetasen wandeln Prostaglandin-H<sub>2</sub> zu Prostaglandin-D<sub>2</sub>, Prostaglandin-E<sub>2</sub>, Prostaglandin-F<sub>2</sub>α, Prostaglandin-I<sub>2</sub> (Prostazyklin) oder Thromboxan-A<sub>2</sub> (in Thrombozyten) um<sup>2 3</sup>. Die Prostaglandine beeinflussen viele physiologische wie auch pathologische Vorgänge im Organismus. Sie stellen wichtige Mediatoren in Signaltransduktionskaskaden dar, beeinflussen Entzündungsreaktionen und regulieren den Gefäßtonus und die Durchblutung verschiedenster Organe<sup>4 5</sup>.

Die Cyclooxygenase wird durch Acetylsalicylsäure und andere nicht-steroidale Antiphlogistika, sowie die neueren COX-2 spezifischen Blocker gehemmt<sup>6 7 8</sup>. Neben

dem Cyclooxygenase-Weg wird die Arachidonsäure außerdem durch die Lipogenase zu Leukotrienen umgewandelt<sup>9</sup>.

## Arachidonsäurestoffwechsel



*Abbildung 1: Der Arachidonsäurestoffwechsel*

Die Hauptprodukte des thrombozytären und endothelialen Arachidonsäuremetabolismus, das Thromboxan A<sub>2</sub> und das Prostaglandin I<sub>2</sub>, stellen zwei antagonistisch wirkende Substanzen dar. Das Thromboxan A<sub>2</sub> vermittelt die Thrombozytenaktivierung, während das Prostaglandin I<sub>2</sub> die Gefäßwand vor überschießender Aggregation und Thrombusbildung schützt.

Da in den kernlosen Thrombozyten eine irreversible Hemmung der Cyclooxygenase eine verminderte Thromboxanproduktion - und damit eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Thromboxan und Prostaglandinen - hervorruft, da die

Thrombozyten nicht wie andere Zellen Cyclooxygenase neu synthetisieren können, kommt es zu einer Hemmung der Thrombozyten (Abb. 1).

## **Die Methoden**

Die Durchflußzytometrie ermöglicht eine Untersuchung an Vollblut und eine Multiparameteranalyse einzelner Plättchen, so dass die Plättchengröße, Plättchengranularität und Glykoproteinexpression dargestellt werden können. Dadurch können heterozygote Merkmalsträger von Rezeptordefekten unterschieden werden.

PFA-100 ist ein Analysesystem, in dem der Prozess der Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation, der nach einer Gefäßverletzung einsetzt, in vitro simuliert wird. Dieses System ermöglicht das Erkennen von erbten, erworbenen oder durch Thrombozytenaggregationshemmer induzierte Thrombozytenfunktionsstörungen.

Bei der Aggregometrie wird plättchenreiches Plasma (PRP) in die Küvette eines Photometers gegeben und durch einen Magnetrührer in ständige Bewegung versetzt. Die Lichtdurchlässigkeit des PRP wird mit Hilfe eines angeschlossenen Schreibers kontinuierlich aufgezeichnet. Die Aggregation der Plättchen wird durch z.B. ADP und Kollagen induziert. Der angeschlossene Schreiber zeichnet die durch die Aggregation der Plättchen erhöhte Lichtdurchlässigkeit auf. Durch die Verwendung verschiedener Aggreganzien (ADP, Kollagen) in unterschiedlichen Konzentrationen sind wichtige Rückschlüsse auf die Ätiologie der Thrombozytopathie möglich.

Die Thrombelastographie ist in der Lage, die Geschwindigkeit der plasmatischen Gerinnung, der Koagelbildung und die Festigkeit des Blutgerinnsels zu messen.

## **Fragestellung**

Tumorpatienten benötigen aufgrund von Tumorschmerzen und/oder Fieber in erhöhtem Maße Analgetika bzw. Antiphlogistica. Während der gelegentliche Einsatz dieser Medikamente bei Nicht-Tumorpatienten in der Regel unproblematisch ist, besteht bei Tumorpatienten häufig eine krankheits- oder medikamentenbedingte Thrombozytopenie, darüber hinaus müssen die Substanzen oft prolongiert eingesetzt werden. Dies bedeutet wegen der möglichen thrombozytenfunktionshemmenden Effekte dieser Substanzen, dass die betroffenen Patienten einem erhöhten

Blutungsrisiko unterliegen. Während die Thrombozytenaggregationshemmung für Acetylsalicylsäure schon lange bekannt ist, sind Daten oder Aussagen zu einer Reihe von anderen als Mono- oder Kombinationssubstanz verwendeten Analgetika nach wie vor recht unklar. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es daher, anhand einiger wichtiger Thrombozytenfunktionstests zu untersuchen, ob und wie lange einige häufig verwendete Analgetika zur Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion führen. In diesem Zusammenhang interessierte besonders, inwieweit der Thrombozytenfunktionsanalyser PFA 100 für solche Fragestellungen als Screeningtest geeignet ist.

Die nachfolgenden Medikamente prüften wir an 25 gesunden Probanden.

Acetylsalicylsäure (Aspirin) 500mg p.o.

Ibuprofen 400mg p.o.

Paracetamol (Benuron) 500mg p.o.

Diclofenac dispers (Voltaren) 75mg p.o.

Rofecoxib (Vioxx) 25mg p.o.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Probandenkollektiv**

Bei 25 gesunden Probanden im Alter zwischen 22 und 58 Jahren (w:13, m:12) wurde der Einfluss von den häufig in der Hämatologie und Onkologie verabreichten nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID), Acetylsalicylsäure, Ibuprofen, Paracetamol, Diclofenac und Rofecoxib auf die Funktion der Thrombozyten untersucht. Die Probanden nahmen an drei aufeinander folgenden Tagen eine jeweils festgelegte Dosis der oben aufgeführten Medikamente ein. Die Thrombozytenfunktion der Probanden wurde mittels Durchflusszytometrie, PFA-100-Analyse, Aggregometrie und Thrombelastographie untersucht.

### **2.2 Wahl der Messzeitpunkte**

Von den Probanden wurde zunächst die Thrombozytenfunktion als Ausgangswert vor Einnahme der Medikamente untersucht. Die Medikamente wurden dann an drei aufeinander folgenden Tagen (Tag 1-3) eingenommen und am vierten, fünften und sechsten Tag jeweils mit den o.g. Methoden die Thrombozytenfunktion gemessen.

### **2.3 Die Medikamente**

Nichtsteroidale Antiphlogistika werden routinemäßig in der Schmerztherapie eingesetzt. Ihre analgetische, antipyretische und antiphlogistische Wirkung beruht auf einer Hemmung der Cyclooxygenase und infolgedessen auf einer verminderten Prostaglandinsynthese<sup>10</sup>. Da in Thrombozyten nur das Isoenzym COX-1 vorkommt und nicht das Isoenzym COX-2, interessierte uns, ob der spezifische COX-2 Hemmer Rofecoxib tatsächlich keinen Einfluss auf die Funktion der Thrombozyten hat.

## 2.4 Die Durchflußzytometrie

### 2.4.1 Prinzip der Durchflußzytometrie bei Thrombozyten

Die Durchflußzytometrie von Thrombozyten stellt eine in-vitro-Untersuchung dar, bei der mit Hilfe von Antikörpern<sup>11, 12</sup> und Farbstoffen<sup>13,14</sup> die Oberflächendichte von Membranproteinen auf einzelnen Blutplättchen analysiert wird und Aussagen über ihren Aktivierungsgrad gewonnen werden können. Darüber hinaus ist die direkte Messung des intrazellulären Kalziumspiegels<sup>15</sup> während der Plättchenstimulation sowie der Nachweis ribosomaler RNA-Bestandteile von jugendlichen Thrombozyten möglich.

Das Prinzip der Durchflußzytometrie besteht darin, dass Zellen beim einzelnen Passieren eines fokussierten Laserstrahls detektiert werden. Dabei können verschiedene Eigenschaften der Zellen erfasst werden. Die Zellgröße wird durch das Ausmaß der Vorwärtsstreuung des Laserlichtes (Forward-Scatter FSC) bestimmt, die Zellgranularität durch das Ausmaß der Seitwärtsstreuung (Side-Scatter SSC). Diese beiden Parameter ermöglichen im Vollblut bereits eine grobe Differenzierung zwischen Thrombozyten und Erythrozyten bzw. Leukozyten. Die Verwendung fluoreszierender Antikörper und Farbstoffe macht diese Differenzierung sensitiver und erlaubt außerdem eine Untersuchung von thrombozytären Membranproteinen und intrazellulären Granula. Die jeweilige Stärke des Fluoreszenzsignals gibt Aufschluss über die Häufigkeit der untersuchten Thrombozytenstrukturen. Das von uns verwendete Durchflußzytometer FACScan der Firma Becton Dickinson (Heidelberg) beinhaltet als zentrales Element einen Argonlaser mit einer fluoreszenzanregenden Wellenlänge von 488 nm. Dabei können bis zu drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe auf drei Kanälen gleichzeitig aufgezeichnet werden, sofern diese sich in ihren emittierenden Wellenlängen unterscheiden. Die Detektionswellenlänge von Kanal 1 liegt bei 530 nm, die von Kanal 2 bei 585 nm und die von Kanal 3 bei 650 nm. An Fluoreszenzfarbstoffen verwendeten wir Fluoreszein-Isocyanat (FITC, mittlere Emissionswellenlänge = 525 nm), Mepakrin (535 nm) und Annexin V (515 nm), die wir auf Kanal 1 maßen, sowie Phycoerythrin (PE, 575 nm), das wir auf Kanal 2 registrierten.

### 2.4.2 Probenansätze

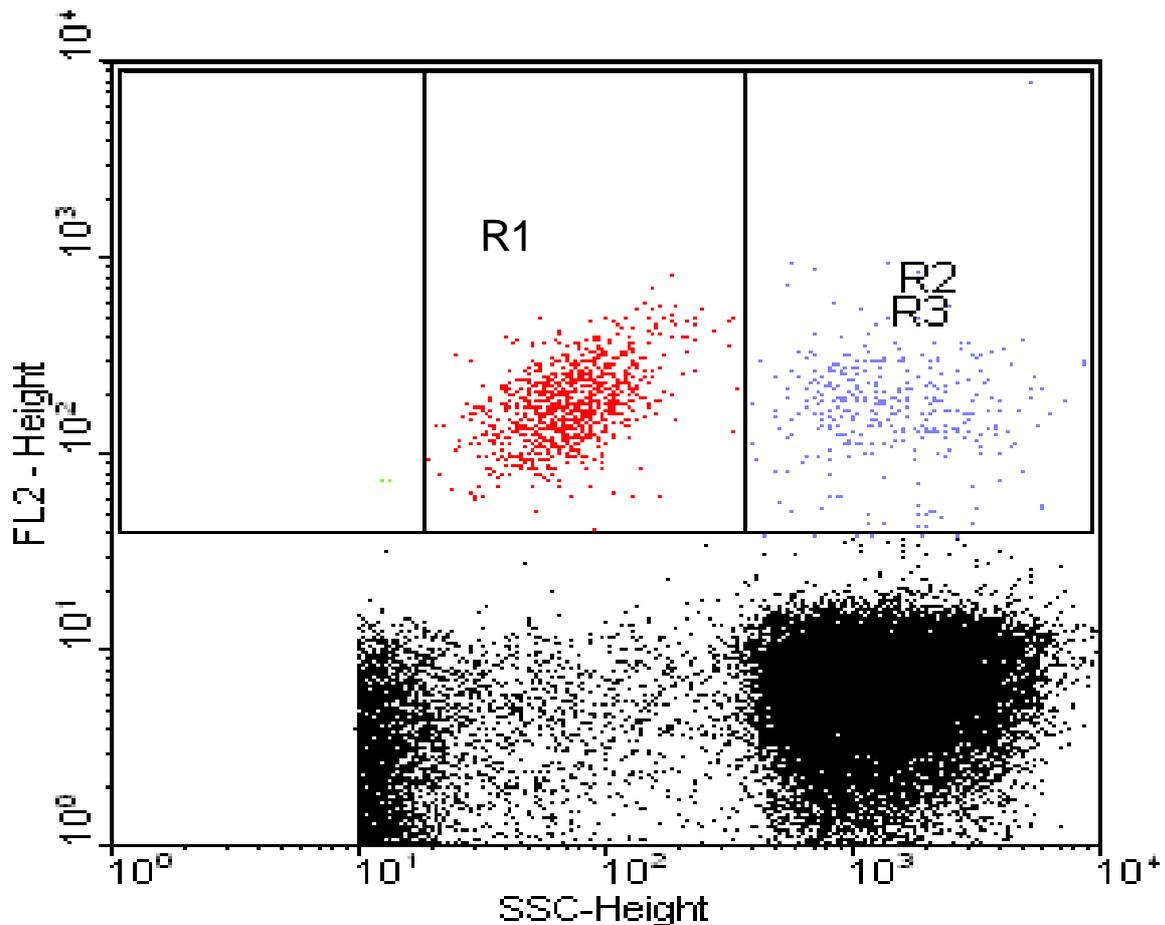
Alle Messungen wurden in Vollblutproben mit unfixierten, voll funktionsfähigen Thrombozyten durchgeführt. Gegenüber der Analyse von Thrombozyten in plättchenreichem Plasma hat dies zwei entscheidende Vorteile: Es entfällt der Arbeitsschritt des Zentrifugierens, der bei unfixierten Thrombozyten eine Aktivierung induzieren kann; des weiteren kann es beim Abpipetieren des plättchenreichen Plasmas zu einer ungleichen Größenverteilung der Thrombozyten kommen, da sich große, schwere Plättchen im Zentrifugat weiter unten absetzen.

Mit Hilfe eines Cell-Counters (H 6000 Analyser, Coulter, USA) wurde die Thrombozytenzahl bestimmt und mit 37°C warmem PBS-Puffer auf 10 G/L Thrombozyten verdünnt. Zur eindeutigen Identifikation der Thrombozytenpopulation im Durchflußzytometer wurden in allen Probenansätzen die Blutplättchen mit dem IgG1-Anti-CD41-Antikörper in einer Konzentration von 5 µg/ml gefärbt (Klon P2, PE-gelabelt, Firma Becton Dickinson, Heidelberg). In Abhängigkeit vom zu untersuchenden Antigen wurde ein entsprechender zweiter FITC-markierter (Funktions-) Antikörper und gegebenenfalls ein Thrombozytenaktivator zugegeben. Die Endmenge eines Lösungsansatzes betrug jeweils 50 µl. Ansätze mit unstimulierten Plättchen wurden 5 Minuten bei 37°C in Dunkelheit inkubiert, die Antikörper-Antigen-Bindungsreaktion mit 2 ml PFA-Lösung (0,2 Vol %) gestoppt und im Durchflußzytometer gemessen. Ansätzen, bei denen wir die Blutplättchen stimulierten, ging zusätzlich eine 10-minütige Inkubationszeit mit dem Stimulans bei 37 °C der Antikörperzugabe voraus. Wie wir in Vorversuchen zeigen konnten, sind diese in PFA-Lösung fixierten Proben in Dunkelheit – um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden – bis zu 24 Stunden stabil.

### 2.4.3 Geräteeinstellungen

Die Proben wurden im Durchflußzytometer mit einer Geschwindigkeit von 60µl/min eingesogen, so daß maximal 500 Zellen pro Sekunde eingelesen wurden. Um die eingelesene Datenmenge nicht unnötig zu vergrößern, legten wir auf dem SSC-Kanal eine Schwelle bei 10 [AU] fest, unter der die mitregistrierten kleinsten Luftblasen und Verunreinigung in den Probenansätzen nicht gespeichert wurden. Die Verstärkung der

Signale auf den einzelnen Registrierkanälen wurde in logarithmischer Darstellung im Bereich 0 bis 10 000 [AU] so gewählt, dass die Thrombozytenwolke nativer Zellen im Vorwärts-Scatter zwischen 20 und 1000 [AU] sowie im Seit-Scatter (SSC) zwischen 10 und 200 [AU] zu liegen kam; die Fluoreszenzsignale auf den Kanälen 1, 2 und 3 wurden soweit verstärkt, dass 99 % der singulären, unstimulierten und unmarkierten Thrombozyten im Bereich 0 bis 10 [AU] lagen (Abb. 2 u. 3).



*Abbildung 2: SSC-Fl 2-Diagramm zur Auswertung der Probenansätze*

*CD 41,PE-positive Einzelzellen befinden sich in der Region R1; Thrombozyt-Thrombozyt- und Thrombozyt-Leukozyt-Aggregate kommen in den Regionen R2 und*

R3 zu liegen. Erythrozyten und Leukozyten sind CD 41,PE-negativ und finden sich im Diagramm rechts unten. Links unten werden Verunreinigungen und kleine Luftblasen registriert, die wir unter einer SSC-Größe von 10 [AU] für die Auswertung nicht mitspeicherten

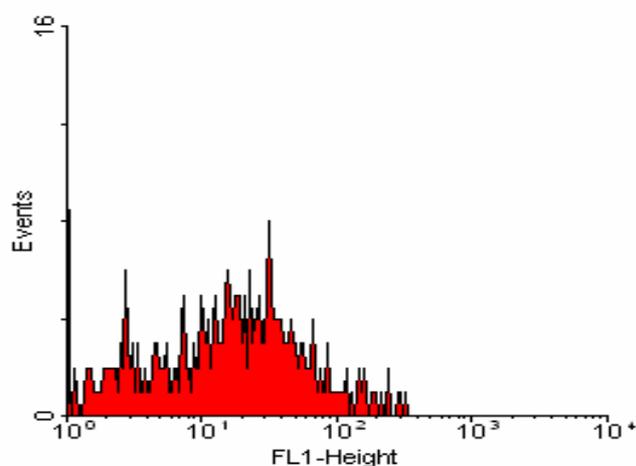


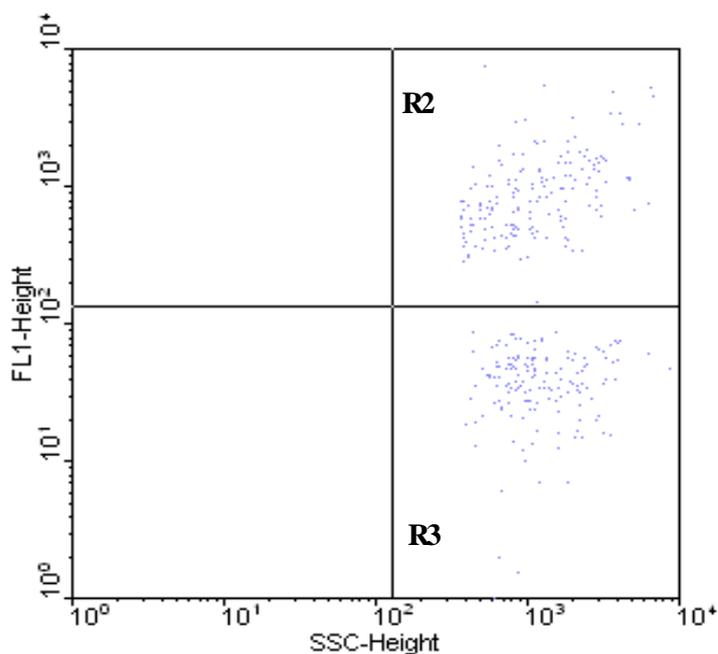
Abbildung 3: Fl 1-Histogramm

Von der singulären Thrombozytenpopulation aus der Region R1 (in Abbildung 3) wird in einem Fl 1 - Histogramm die mittlere Fluoreszenzstärke des Funktionsantikörpers berechnet, in diesem Beispiel die Fluoreszenzstärke der gegen P-Selektin gerichteten Antikörper von unstimulierten Thrombozyten einer gesunden Person

#### **2.4.4 Auswertung der Messungen**

In Abbildung 1 ist die von uns im Computerprogramm CELL-Quest<sup>TM</sup> erstellte Auswertungsmaske als SSC-Fl 2-Diagramm dargestellt. Fl 2 stellt dabei die auf Kanal 2 gemessene Fluoreszenzstärke des PE-gelabelten Anti-CD41-Antikörpers zur eindeutigen Identifikation von Thrombozyten dar. In der Region R1 finden sich alle singulären, CD 41-positiven Zellen (=Thrombozyten), klar abgegrenzt von allen

anderen Zellen bzw. Zellaggregaten. Von dieser Thrombozyten-Population wurde die mittlere Fluoreszenzstärke Fl 1 des Funktionsantikörpers in einem Fl 1-Histogramm im Bereich 1,0 bis 7500 [AU] bei logarrhythmischer Darstellung berechnet (Abbildung 2). Die Bereiche darüber bzw. darunter wurden bewusst nicht mitberücksichtigt, um Störsignale durch Zelldebris nicht miteinzubeziehen. Zur Identifikation von Thrombozyten-Aggregaten, die sich im SSC-Fl2-Diagramm im Feld R2/R3 der Abbildung 1 darstellen, verwendeten wir den FITC-markierten Anti-CD45-Leukozyten-Antikörper. Mit Hilfe dieses Funktionsantikörpers ist es möglich, die in der Region R2/R3 zusammengefassten Aggregate nach Thrombozyt-Leukozyt- und Thrombozyt-Thrombozyt-Aggregaten aufzutrennen: In einem SSC-Fl 1-Diagramm (Abbildung 4) liegen in der Region R2 die Aggregate aus Leukozyten und Thrombozyten, in der Region R3 finden sich die CD 45-negativen Thrombozyt-Thrombozyt-Aggregate.



*Abbildung 4: Differenzierung der Thrombozytenaggregate im SSC-Fl1-Diagramm.*

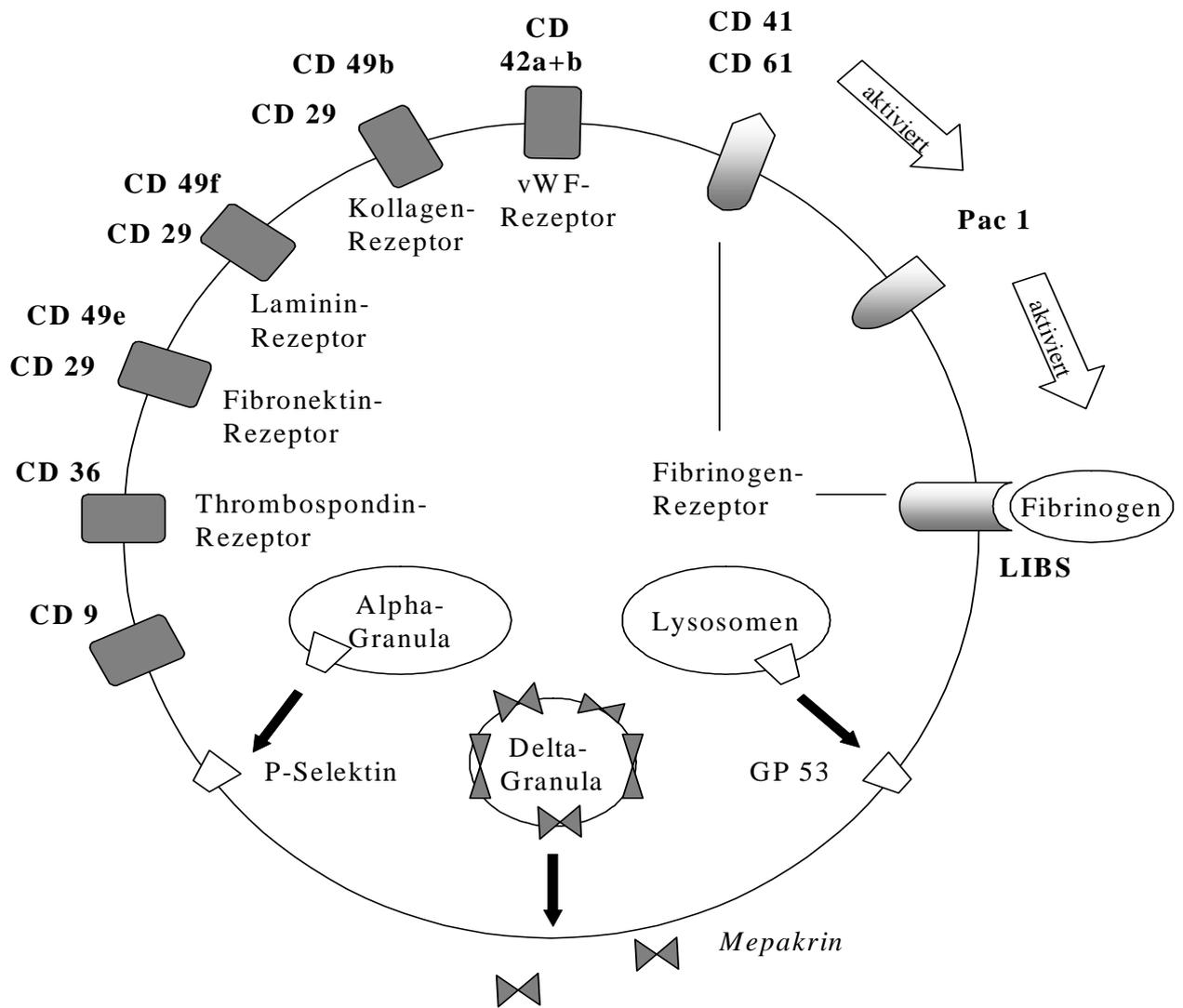
*Zur Unterscheidung von Thrombozyten-Aggregaten wurde der Anti-CD45-Leukozyten-Antikörper eingesetzt; im Feld R2 finden wir die Thrombozyt-Leukozyt-Aggregate im Feld R3 die Thrombozyt-Thrombozyt-Aggregate.*

### 2.4.5. Detektierbare thrombozytäre Antigene

Thrombozyten besitzen insgesamt fünf verschiedene Rezeptortypen für die Adhäsion: Rezeptoren für Kollagen (1), Laminin (2), Fibronektin (3), Thrombospondin (4) und den von Willebrand-Faktor (5). Der Fibrinogenrezeptor vermittelt die Aggregation. Diese Rezeptoren sind bereits auf ruhenden Thrombozyten mittels entsprechender Antikörper nachweisbar. In ruhenden Blutplättchen finden sich außerdem drei verschiedenen Granulatypen, die bei Thrombozytenaktivierung exozytiert werden: Die  $\alpha$ -Granula beinhalten in ihrer Membran P-Selektin, Lysosomen und das Membranglykoprotein gp 53. Beide werden durch Aktivierung der Blutplättchen an die Zytoplasmamembran transportiert und sind dann für gegen sie gerichtete Antikörper zugänglich. Der dritte Granulatyp sind die  $\delta$ -Granula, die über kein spezifisch durch Antikörper erkennbares Antigen verfügen. Es ist jedoch mit Hilfe des Farbstoffs Mepakrin möglich, auch diesen Granulatyp durchflußzytometrisch zu erfassen. Mepakrin kann im Gegensatz zu Antikörpern die Zytoplasmamembran von Thrombozyten permeieren und wird spezifisch in den  $\delta$ -Granula gespeichert. Bei Thrombozytenstimulation wird dieser Farbstoff zusammen mit den Granulainhaltsstoffen freigesetzt, so dass diese Plättchen nach Stimulation weniger stark fluoreszieren. In Abbildung 5 sind alle an der Zelloberfläche expremierten Rezeptoren und intrazellulären Granula dargestellt, die wir durchflußzytometrisch erfassten. Die Klassifikation, Anzahl und Liganden der verschiedenen Thrombozytenrezeptoren sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Sie werden im nächsten Kapitel genauer beschrieben.

In Abbildung 5 sind oben links im Bild die fünf Adhäsionsrezeptoren, die sich auf der Oberfläche ruhender Thrombozyten befinden, dargestellt. Bei einer Plättchenaktivierung durchläuft der Fibrinogenrezeptor (im Bild re. oben) mehrere Aktivierungsstufen, wobei schrittweise Neoepitope für den Pac-1 und den LIBS-Antikörper zugänglich werden. Zugleich werden P-Selektin und GP 53 durch Granulafusion mit der Zytoplasmamembran an die Oberfläche transportiert und in  $\delta$ -Granula gespeichertes Mepakrin wird freigesetzt (im Bild unten).

Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Thrombozyten



Phoretische Klasse	Integrin-Klasse	CD - Klasse	Kopienanzahl	Liganden
Ia IIa	$\alpha 2 \beta 1$	49b / 29	1 000	Kollagen
Ic IIa	$\alpha 5 \beta 1$	49e / 29	1 000	Fibronectin
Ic' IIa	$\alpha 6 \beta 1$	49f / 29	1 000	Laminin
Ib V IX		42a/ 42b	25 000	von Willebrand Faktor
III b		36	25 000	Kollagen, Thrombospondin
IIb IIIa	$\alpha IIb \beta 3$	41 / 61	100 000	Fibrinogen
P-Selektin		62 P	10 000	Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten und Makrophagen
GMP-53		63	650	?
		9		(Signaltransduktion)

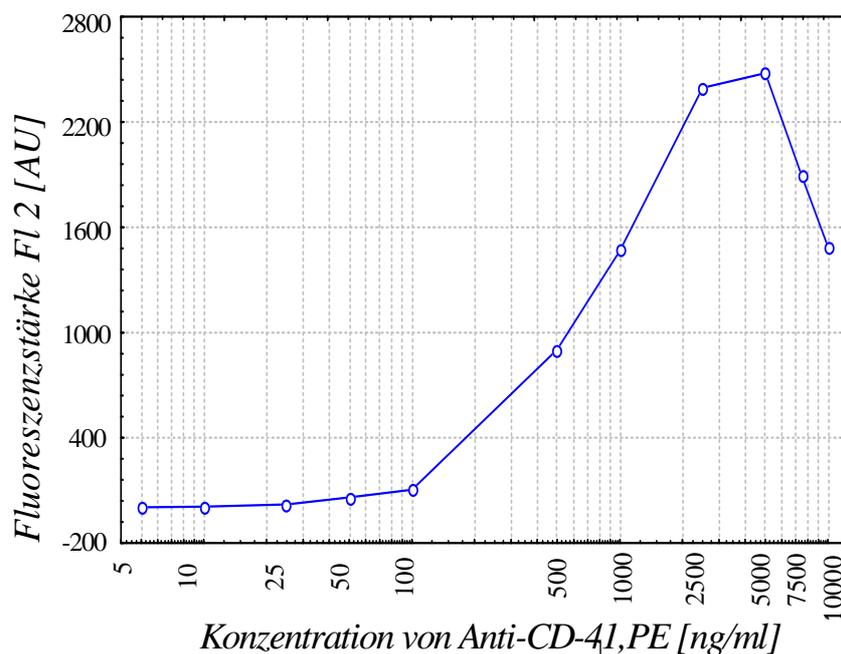
*Tabelle 1: Rezeptorklassifikation thrombozytärer Glykoproteine*

## **2.5 Die thrombozytären Glykoproteine und ihre markierenden Antikörper**

### **2.5.1 Markierung der Thrombozytenoberflächenrezeptoren**

#### *2.5.1.1 Thrombozytenidentifikation: CD 41*

Zur eindeutigen Identifikation der Thrombozytenpopulation im Vollblut wurde der PE-gefärbte Anti-CD 41-Antikörper (Klon P2, Immunotech, Hamburg) verwendet, der an Glykoprotein IIb im intakten Komplex mit GP IIIa bindet. Bei aufsteigender Antikörper-Konzentration bestimmten wir die mittlere Fluoreszenzstärke Fl 2 der singulären Thrombozyten in einem FSC/SSC-Diagramm. Die Abbildung 6 zeigt in logarithmischer Darstellung die Antigen-Antikörper-Bindungskurve des Anti-CD 41-PE-Antikörpers nichtaktivierter Blutplättchen mit einem Fluoreszenzmaximum bei 5 µg/ml. Auffällig ist ein Fluoreszenzintensitätsabfall bei Antikörperkonzentrationen über 5 µg/ml. Dieser Effekt eines Intensitätsabfalls nach Überschreiten einer optimalen Antikörperkonzentration zeigte sich auch bei allen anderen von uns getesteten Antikörpern. Für unsere weiterführenden Versuche benutzten wir eine Konzentration im Sättigungsbereich von 5 µg/ml.



*Abbildung 6: Bindungskurve des Anti-CD 41,PE - Antikörpers*

### 2.5.1.2 GPIb/V/IX

Der GpIb/V/IX-Rezeptoren Komplex gehört zur Familie der leuzinreichen Glykoproteine. Das Glykoprotein GP V lagert sich dabei im Verhältnis 1:2 den anderen Strukturen des Rezeptorkomplexes an<sup>16</sup>. Etwa 25.000 Kopien dieses Rezeptors existieren auf der Thrombozytenoberfläche<sup>17</sup>. GPIb, ein heterodimeres Protein, ist die dominierende Komponente des Rezeptorkomplexes GPIb/V/IX. Es besteht aus einer großen  $\alpha$ -Untereinheit GPIb $\alpha$ , und einer phosphorilierten, kleineren GPIb $\beta$ -Untereinheit. Die aminoternale, globuläre Domäne von GPIb $\alpha$  stellt einen essentiellen Rezeptor für den von Willebrand Faktor dar und verfügt des weiteren über eine Bindungsstelle von hoher Affinität für Thrombin<sup>18</sup>.

Die Bindungsfähigkeit des GPIb/V/IX-Rezeptorkomplexes an den von Willebrand Faktor macht ihn besonders wichtig für die Thrombozytenadhäsion.

Die Markierung des Rezeptors GPIb/V/IX erfolgte in der Durchflusszytometrie mit dem monoklonalen IgG2a Antikörper anti-CD 42a-FITC (Klon: SZ1) sowie mit dem Antikörper anti-CD 42b-FITC. Beide Antikörper bezog unser Labor von der Firma Immunotech in Hamburg.

Der Antikörper anti-CD 42a-FITC bindet spezifisch an GPIX, wenn dieser im komplexierten Zustand mit GPIb vorliegt. Der Antikörper anti-CD 42b-FITC hingegen lagert sich an GPIb im Komplex mit GPIX an.

Folgende Konzentrationen entsprachen den Fluoreszenzmaxima:

anti-CD 42a-FITC-Antikörper: 5 $\mu$ g/ml

anti-CD 42b-FITC-Antikörper: 10 $\mu$ g/ml

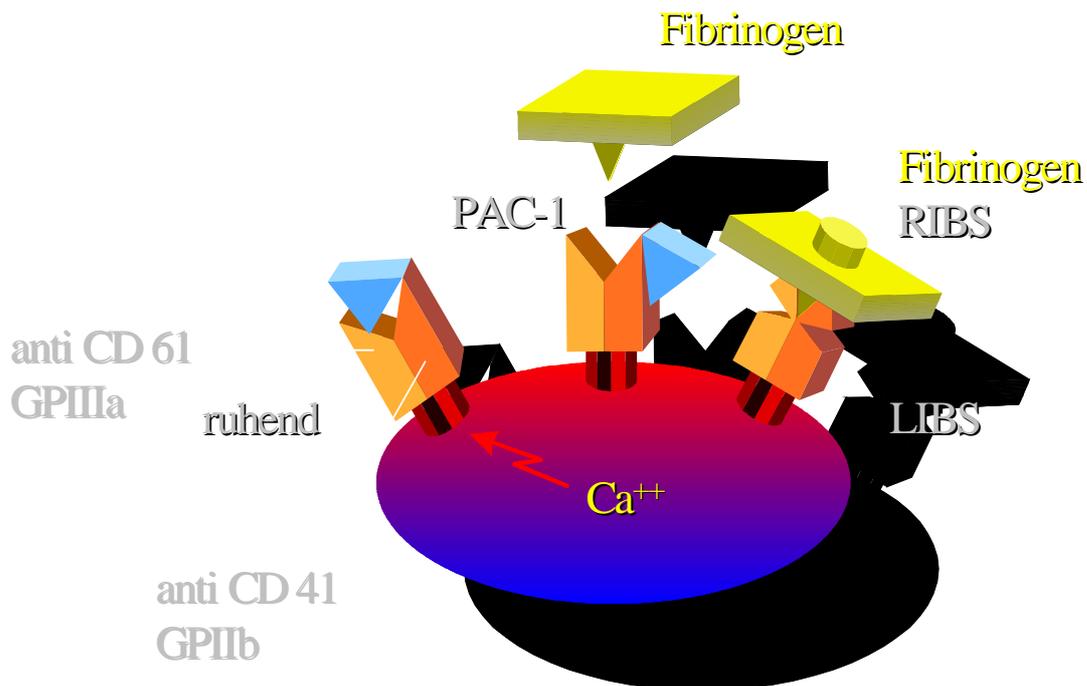
### 2.5.1.3 *GpIIb/IIIa*

Das GpIIb/IIIa Molekül gehört zu der Familie der Adhäsionsrezeptoren, den Integrinen.

Der GpIIa/IIIb-Komplex ist das derzeit am besten charakterisierte Glykoprotein. Es setzt sich aus einer  $\alpha$ IIb-Integrin-Kette (= GpIIb) und einer  $\beta$ 3-Integrin-Kette zusammen (s. Abb. 7). Dieser Rezeptorkomplex findet sich ausschliesslich auf Thrombozyten und Megakaryozyten<sup>19</sup>. Mit über 50.000 Kopien pro Thrombozyt an der Oberfläche ist er der häufigste Rezeptor auf der Thrombozytenmembran<sup>20</sup>. Es befindet sich ein eigener Rezeptorpool im surface connected system (=SCS) sowie in den  $\alpha$ -Granula, aus welchem bei Aktivierung und Degranulierung weitere Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche bereitgestellt werden<sup>21 22</sup>. Der GpIIb/IIIa Rezeptor ist in der Lage, eine Reihe wichtiger, adhäsiver Proteine zu binden. Zu diesen gehört Fibrinogen<sup>23</sup>, Fibronectin<sup>24 25</sup>, Vitronectin<sup>26</sup>, Von Willebrand-Faktor<sup>27</sup> und

Thrombospondin<sup>28</sup>. Über den Liganden Fibrinogen stellt der GpIIb/IIIa-Komplex die Vernetzung der Thrombozyten her. Dadurch kommt es zur Thrombozytenaggregation.

## Der GP IIb/IIIa-Rezeptor



*Abbildung 7: Das Glykoprotein IIb/IIIa*

Mit drei verschiedenen monoklonalen Antikörpern stellten wir den GpIIb/IIIa-Rezeptor in der Durchflusszytometrie dar (s. Abb. 7).

Im Vollblut verwendeten wir den PE-gelabelten Antikörper anti-CD41/PE (Klon P2) der Firma Immunotech aus Hamburg. Dieser Antikörper bindet an das GpIIb-Glykoprotein im intakten Komplex mit GpIIIa auf Thrombozyten.

Weitere Antikörper zur Markierung des GpIIb/IIIa-Komplexes waren anti-CD41/SZ-22-FITC (Klon SZ 22) sowie der Antikörper anti-CD61/P2-FITC (Klon SZ 22), beide wiederum von der Firma Immunotech aus Hamburg. Der Antikörper anti-CD41/SZ-

22-FITC bindet mit GpIIb unabhängig von GpIIIa. Der Antikörper anti-CD61/P2-FITC (Klon SZ 22) hingegen setzt sich an das Glykoprotein GpIIIa.

Zum Nachweis aktivierter Thrombozyten verwendeten wir den Antikörper anti-PAC-1 (IgM-Antikörper) der Firma Becton Dickinson aus Heidelberg. Dieser Antikörper bindet spezifisch an aktivierten GpIIb/IIIa-Komplex. Das Fluoreszenzmaximum der o.g. Antikörper und der daraus abgeleiteten Versuchskonzentrationen lag bei folgenden Werten:

Anti-CD41/PE: 10µg/ml

Anti-CD41/SZ 22-FITC: 5µg/ml

Anti-CD61/P2-FITC : 2µg/ml

Anti-PAC-1-FITC: 10µ/ml

#### 2.5.1.4 CD154

Der Rezeptor CD154 ist eine transmembranäre Proteinstruktur, die mit dem Zytokin TNF- $\alpha$  verwandt ist. Den passenden Liganden findet CD154 auf Endothelzellen, B-Zellen, Monozyten und Makrophagen.

CD154 induziert bei der Bindung an Endothelzellen die Ausschüttung der Chemokine IL-8 und MCP-1, welche die Chemotaxis von Neutrophilen und Leukozyten verursachen<sup>29 30</sup>. Des weiteren werden Endothelzellen dazu stimuliert, Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin zu exprimieren<sup>31</sup>. Somit ist es den Plättchen möglich, über CD 154 eine direkte inflammatorische Antwort der Gefäßwand zu induzieren. Die Markierung des Rezeptors CD 154 erfolgte mit anti-CD 154-FITC. Die ermittelte sigmoide Bindungskurve zeigte ihr Fluoreszenzmaximum bei folgender Konzentration:

Anti-CD 154-FITC-Antikörper: 20µg/ml

### 2.5.1.5 *GP Ia/IIa, GP Ic/IIa, GP Ic'/IIa*

Das Glykoprotein GP IIa ist Bestandteil mehrerer Rezeptoren auf der Zytoplasmamembran der Thrombozyten. Dazu zählen das GP Ia/IIa, welches Kollagen bindet<sup>32</sup>, zum anderen das Glykoprotein GP Ic/IIa, das als Fibronektin-Rezeptor<sup>33</sup> fungiert, und ausserdem das Glykoprotein GP Ic'/IIa, welches in der Lage ist, Laminin zu binden<sup>34</sup>.

Das Integrin GP Ia/IIa ist mit etwa 2000 Kopien an der Thrombozytenoberfläche vertreten und über die Bindung an Kollagen für die Thrombozytenadhäsion und –aggregation von Bedeutung<sup>35</sup>.

Der Fibronektinrezeptor GP Ic/IIa scheint bei der Thrombozytenadhäsion eine Rolle zu spielen, allerdings ist sein Wirkungseinfluss noch nicht geklärt. Auf der Thrombozytenoberfläche ist er mit 1000 Kopien sehr gering vertreten.

Gp Ic/IIa ist ebenfalls mit 1000 Kopien auf der Thrombozytenoberfläche vertreten. Die Funktion des Lamininrezeptors bei der Plättchenadhäsion ist ebenfalls noch unklar<sup>36</sup>.

Markiert werden der Rezeptoranteil GP IIa mit anti-CD 29-FITC. Das Glykoprotein GP Ia des Kollagenrezeptors ist Zielstruktur des Antikörpers anti-CD 49b-FITC (Klasse IgG1, Klon Gi9).

Die Fluoreszenzmaxima fanden sich bei:

anti-CD 29-FITC-Antikörper: 10µg/ml

anti-CD 49b-FITC-Antikörper: 4µg/ml

### 2.5.1.6 *GP IIIb (CD36)*

CD 36, ein äußerst kompaktes, hydrophobes Molekül, wird auf der Oberfläche von Thrombozyten, Monozyten, Epithel- und Endothelzellen exprimiert. Eine besondere Eigenschaft ist die Resistenz des Moleküls gegen proteolytische Reduzierung in der Plättchenmembran. Das Glykoprotein GP IIIb ist in der Lage, Thrombospondin und Kollagen zu binden<sup>37</sup>. Ein Mangel an CD36 kann allerdings aufgrund anderer Kompensationsmechanismen ohne Effekt bleiben.

Das Glykoprotein GP IIIb wird mit dem Antikörper anti-CD 36-FITC (Klasse IgG1, FA6-152) detektiert. Das Fluoreszenzmaximum fand sich bei:

Anti-CD 36-FITC-Antikörper: 4µg/ml

## 2.5.2 Detektion der Thrombozytengranula

### 2.5.2.1 $\alpha$ -Granula

Die  $\alpha$ -Granula sind Speicherorgan für eine Anzahl verschiedener Proteine. Sie enthalten Fibrinogen, Fibronectin, PDGF (platelet derived growth factor), PF 4 (platelet factor 4),  $\beta$ -Thromboglobulin, sowie das P-Selektin. Bei Freisetzung der Inhaltsstoffe der  $\alpha$ -Granula nach Aktivierung der Thrombozyten kommt es durch die Inhaltsstoffe der Granula zu einer weiteren Aktivierung der Thrombozyten. Bei einem Defekt der  $\alpha$ -Granula (Gray platelet syndrom) kommt es typischer Weise zu einer milden Blutungsneigung von Haut und Schleimhäuten, Petechien, Epistaxis und ggf. Menorrhagien. Nachzuweisen sind neben einer mäßigen Thrombozytopenie relativ große Thrombozyten und eine inkomplette Aggregationsantwort auf Kollagen und Thrombin, selten auf ADP<sup>38</sup>.

Um herauszufinden, ob unter dem Einfluss nicht steroidaler Antiphlogisika die Entleerung der  $\alpha$ -Granula in veränderter Weise stattfindet, haben wir das Glykoprotein P-Selektin zu Hilfe genommen. Das P-Selektin ist ein transmembranäres Glykoprotein, das auf der Oberfläche inaktivierter Thrombozyten in nur geringer Menge vorhanden ist. Es ist vor allem in den  $\alpha$ -Granula membranständig internalisiert. Bei Thrombozytenaktivierung fusionieren die  $\alpha$ -Granula mit der Plasmamembran, und der Rezeptor erscheint schlagartig an der Thrombozytenoberfläche. Neutrophile und Monozyten können über Glykolipide und Glykoproteine an exponiertes P-Selektin adhären<sup>39 40</sup>. Das P-Selektin spielt eine bedeutende Rolle in Hämostase und bei der inflammatorischen Antwort auf Gewebsverletzungen<sup>41</sup>.

Das Glykoprotein P-Selektin markierten wir mit dem Antikörper anti-CD 62P-FITC (Klon CLB-Thrombo/6) der Firma Immunotech (Hamburg). Er dient zum Nachweis aktivierter Thrombozyten<sup>42</sup>.

Das Fluoreszenzmaximum des Antikörpers lag bei folgender Konzentration:

anti-CD 62P-Antikörper: 5µg/ml

#### 2.5.2.2 *Lysosomen*

Bei dem Glykoprotein GP 53 handelt es sich um ein Membranglykoprotein der Tetra-Span-TM4-Superfamilie, bestehend aus den zwei Untereinheiten  $\alpha 3\beta 1$  und  $\alpha 6\beta 1$ <sup>43 44</sup>. Es befindet sich in Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und vor allem in Thrombozyten<sup>45</sup>. In der ruhenden Zelle findet sich GP 53 fast nur in den Lysosomen und erscheint erst nach Aktivierung der Zelle durch Exozytose an der Plättchenoberfläche.

Die exakte physiologische Funktion des GP 53 ist noch ungeklärt, allerdings wird eine Mitbeteiligung bei der transmembranären Signaltransduktion via Thyrosinphosphatasen sowie an der Regulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung vermutet<sup>46</sup>.

Der Antikörper anti-CD 63-FITC (Klon CLB-gran12) der Firma Immunotech (Hamburg) reagiert vor allem mit dem auf der Thrombozytenoberfläche exprimiertem GP 53 und ist somit zum Nachweis aktivierter Thrombozyten<sup>47</sup> geeignet. Das Fluoreszenzmaximum lag bei:

Anti-CD 63-Antikörper: 10µg/ml

#### 2.5.2.3 *δ-Granula*

In den  $\delta$ -Granula speichern die Thrombozyten ADP, ATP, Serotonin und andere Amine. ADP fördert durch die Freisetzung von Oberflächenrezeptoren und der Sekretion von Granula eine weitere Thrombozytenaggregation. Die ADP-Wirkung wird durch eine Reihe purinerner Rezeptoren vermittelt<sup>48 49</sup>.

Die Freisetzung von ADP wiesen wir mit dem fluoreszierendem Farbstoff Mepakrin (Quinacrine der FIRMA Sigma, Deisenhofen) nach, gelöst in PBS-Puffer. Anders als die Antikörper besitzt Mepakrin die Fähigkeit, die Zellmembran zu permeieren und

somit intrazellulär an die  $\delta$ -Granula ruhender Thrombozyten zu binden. Bei Freisetzung der  $\delta$ -Granula sinkt der membrangebundene Mepakrinanteil.

Fluoreszenzmaximum: Mepakrin: 5  $\mu\text{mol/l}$

### 2.5.3 Aktivatoren der Thrombozyten

#### 2.5.3.1 ADP (*Adenosindiphosphat*)

Adenosinphosphat ist ein schwacher Plättchenaktivator. Es wurde von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen, in PBS-Puffer gelöst und bei  $-30^{\circ}\text{C}$  gelagert. In den  $\delta$ -Granula der Thrombozyten wird ADP gespeichert<sup>50</sup> und bei Stimulation zum Beispiel durch Thrombin oder Kollagen mittels Exozytose freigesetzt. Es induziert über purinerge Rezeptoren der Familie P2<sup>51 52</sup> eine zytoplasmatische Calciummobilisation, die eine weitere Thrombozytenaggregation bewirkt und zudem die weitere Entleerung der  $\delta$ -Granula fördert.

#### 2.5.3.2 TRAP-6 (*Thrombinrezeptor-Aktivator-Protein-6*)

TRAP-6 bezogen wir von der Firma Bachem (Bubendorf, Schweiz). Die Substanz wurde in PBS-Puffer gelöst und bei  $-30^{\circ}\text{C}$  gelagert. TRAP-6 ist ein starker Thrombozytenaktivator, der an den Thrombinrezeptor (Protease-activated receptor) bindet. Der Thrombinrezeptor ist ein Rezeptor mit sieben transmembranären Domänen, wobei sich an dem extrazellulär gelegenen Teil eine Thrombinbindungsstelle befindet<sup>53</sup>. Wenn sich nun Thrombin an den Rezeptor heftet, spaltet es den Rezeptor an einer bestimmten Aminosäuresequenz. Dadurch entsteht im Rezeptor ein neues N-terminales Ende, das selbst als Ligand für die Rezeptoraktivierung fungiert<sup>54</sup>. TRAP-6 stellt eine Sequenz von sechs Aminosäuren dar, die genau diesem rezeptoreigenen Liganden entsprechen und dadurch ohne Spaltung den Thrombinrezeptor aktivieren.

Der Rezeptor vermittelt seine Wirkung über IP3 (Inositol(1,4,5)-triphosphat) mit folgender Calciummobilisation. Dadurch kommt es zur Thrombozytenaggregation und zur weiteren Freisetzung von Granula.

### 2.5.3.3 Adrenalin

Adrenalin ist ein schwacher Thrombozytenaktivator. Es wurde unter dem Handelsnamen Suprarenin von der Firma Höchst (Frankfurt am Main) bezogen. Adrenalin bindet an die adrenergen  $\alpha_2$ -Rezeptoren, welche über cAMP und Calciummobilisation die Thrombozytenaggregation und Sekretion fördern. Da Adrenalin nur unter Vorstimulation mit ADP eine erkennbare Thrombozytenaktivierung auslöst, stimulierten wir die Thrombozyten zuvor mit 5 $\mu$ g/ml ADP. Als Aktivierungsmarker wählten wir die Antikörper anti-CD 62P und anti-CD 63.

### 2.5.4 Vorbereitung der Blutproben für die FACS-Analyse

Wir nahmen stets das Blut in zwei in Eiswasser (4°C) gelagerte 2ml-Citratröhrchen über einen peripheren venösen Zugang ab. Die Zeit zwischen Blutabnahme und Verarbeitung betrug ca. 30-45 Minuten. Zunächst wurde das Blut mit BSA (Albumin, Bovine Fraction V der Firma Sigma, Deisenhofen), verdünnt mit PBS-Puffer (Apotheke Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität, München), auf 10G/l Thrombozyten verdünnt. Daraufhin wurden 23 Messansätze nach dem Pipetierschema, siehe Tabelle, erstellt. Die Messansätze wurden auf Eis in Falcon-Röhrchen (FALCON-Tubes, 5ml Polystyrene Round-Bottom Tube, 12 x 75mm style, Firma Becton Dickinson Labware, USA) pipetiert, um eine Beeinflussung der Thrombozyten durch Wärme auszuschliessen.

12 Falcon-Röhrchen wurden zunächst mit einer bestimmten Menge des auf 10G/l Thrombozyten verdünnten Blutes gefüllt. Zudem wurden allen Röhrchen der Detektionsantikörper CD 41-PE sowie der Zielantikörper (CD9, CD 29, CD 49b, CD 41, CD 61, CD 42a, CD 42b, CD 62P, CD 63, CD 154, PAC-1, CD 45) beigefügt. Daraufhin wurden die Messröhrchen bei 37°C fünf Minuten inkubiert und anschliessend mit 2ml Paraformaldehyd (0,2% Paraformaldehyd in PBS, 0,1M, pH7,3-7,4 aus der Apotheke Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität, München) gestoppt.

In zwei weiteren Falconröhrchen stimulierten wir das Blut zunächst mit ADP (100 $\mu$ M) und liessen sie 10 Minuten bei 37°C inkubieren. Nach der Inkubation regten wir die

Thrombozyten zusätzlich mit Adrenalin und einer weiteren Inkubation von 10 Minuten nochmals an. Anschliessend wurden die Antikörper CD 62 und CD 63 sowie der Detektionsantikörper CD 41-PE hinzugegeben. Nach einer Inkubation von weiteren 5 Minuten wurden auch diese Röhrchen mit 2 ml Paraformaldehyd gestoppt.

In zwei anderen Messröhrchen wurde das Blut gleich mit 5 $\mu$ M/l versetzt und dann 30 Minuten in den Inkubator bei 37°C gestellt. Nach dieser Zeit stoppten wir das eine der beiden Röhrchen mit 500 $\mu$ l Paraformaldehyd. Das zweite Röhrchen wurde mit TRAP-6 (1mM) angeregt und anschliessend 10 Minuten inkubiert. Danach wurde auch diese Probe mit 500 $\mu$ l Paraformaldehyd gestoppt.

Um eine Sekretion der  $\delta$ -Granula nachzuweisen, verwenden wir den fluoreszierenden Farbstoff Mepakrin. Mepakrin besitzt die Fähigkeit, die Zellmembran zu durchdringen und intrazellulär an die  $\delta$ -Granula ruhender Thrombozyten zu binden. Bei einer Exozytose der  $\delta$ -Granula sinkt der membrangebundene Mepakrinanteil.

## **2.6 PFA-100**

### **2.6.1 Meßprinzip**

PFA-100 ist ein Analysesystem, in dem der Prozess der Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaggregation, der nach einer Gefäßverletzung einsetzt, in vitro simuliert wird. Dieses System ermöglicht das Erkennen von ererbten, erworbenen oder durch Thrombozytenaggregationshemmer induzierte Thrombozytenfunktionsstörungen.

Das PFA-100 System gestattet die rasche Bewertung der Thrombozytenfunktion an kleinen antikoagulierten Vollblutproben. Die dazu verwendeten Einmalmesszellen bestehen aus mehreren integrierten Bauteilen wie der Kapillare, dem Probenreservoir und der biologisch aktiven Membran mit einer zentralen Öffnung. Die Vollblutprobe wird aus dem Probenreservoir durch die Kapillare aspiriert, wobei die Thrombozyten hohen Scherkräften ausgesetzt sind. Die Membran ist mit dem subendothelialen Protein Kollagen beschichtet, das die anfängliche Matrix für die Thrombozytenadhäsion bildet. Die Membran ist zusätzlich mit den physiologischen Agonisten Epinephrin oder ADP beschichtet, die der Thrombozytenaktivierung

dienen. Durch die hervorgerufene Thrombozytenaggregation bildet sich an der Öffnung ein Thrombozytenpfropf, der den Blutfluss schließlich zum Erliegen bringt. Das PFA-100 misst die Zeit vom Beginn des Tests bis zum vollständigen Membranverschluss. Diese Zeit wird als Verschlusszeit angegeben.

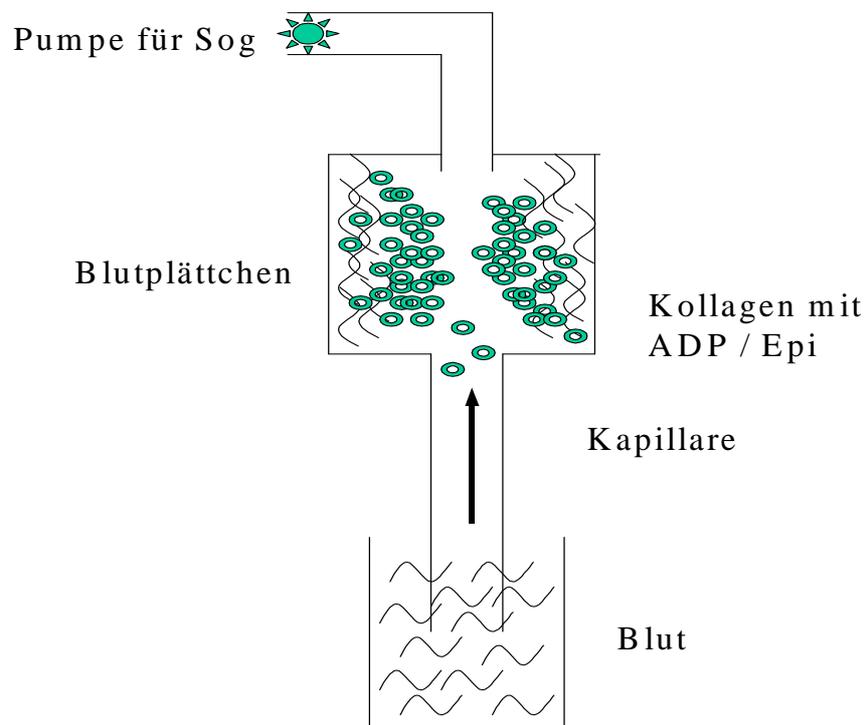
### **2.6.2 Vorbereitung der Blutproben zur Bestimmung der PFA-100-Verschlusszeit**

Für die Analyse im PFA-100 (Platelet Function Analyzer) wurde ein 3,8 ml – Röhrchen, gefüllt mit 0,38 ml Zitronensäure-Natriumcitrat-Puffer und 0,129 mol/l Zitrat, über eine Nadel peripher abgenommen und bei 4°C gelagert. In die Messzellen mit Kollagen/Epinephrin bzw. Kollagen/ADP der Firma DADE Behring wurden jeweils 800µl Blut eingefüllt.

### **2.6.3 Durchführung der PFA-100-Analyse**

Die Blutungsverschlusszeit untersuchten wir mit dem Platelet-Function-Analyzer der Firma DADE Behring. Vor jeder Untersuchung wurde ein Wartungsselbsttest durchgeführt. Zunächst wurden 800µl des mit Zitronensäure-Natriumcitrat-Puffer und Zitrat versetzten Vollblutes in eine Messzelle, die eine Glaskapillare enthält, gefüllt. Die Messung wurde mit zwei verschiedenen beschichteten Glaskapillaren durchgeführt. Die eine Glaskapillare war mit Kollagen/Epinephrin, die andere mit Kollagen/ADP beschichtet. Beide imitieren somit eine verletzte Endothelwand. Das Blut und die Messzelle werden bei 37°C inkubiert. Wird nun das Blut durch die Kapillare gezogen, kommt es zur Thrombozytenadhäsion und daraufhin zur Thrombozytenaktivierung und -aggregation. Durch den in der Kapillare wachsenden Thrombozytenpfropf gelangt immer weniger Blut durch die Kapillare, bis der Blutstrom gänzlich versiegt. Das PFA-100 kontrolliert den Blutstrom vom ersten Kontakt mit der Glaskapillare bis zum Versiegen des Stromes, also bis zum Verschluss der Kapillare (s. Abb. 8). Das Zeitintervall bis zum vollständigen Verschluss der Kapillare wird als Verschlusszeit bezeichnet und repräsentiert die Funktionstüchtigkeit der Thrombozyten. Der untere Grenzwert für die Kollagen/Epinephrin beschichteten Kapillaren liegt bei 85 Sekunden, der obere Grenzwert bei 165 Sekunden. Für die Kollagen/ADP - beschichteten Kapillaren liegt der Normbereich zwischen 71-118 Sekunden. Mit den

Kollagen/Epinephrin-beschichteten Messzellen ist es möglich, eine Reihe von Thrombozytenfunktionsstörungen wie z. B. das von Willebrand-Jürgen-Syndrom oder das Bernard-Soulier-Syndrom oder Funktionsstörungen aufgrund von Thrombozytenaggregationshemmern aufzudecken. Die mit Kollagen/ADP-beschichteten Messzellen eignen sich zum Nachweis von durch Aspirin oder anderen Medikamenten verursachten Thrombozytopathien.



*Abbildung 8: Schematischer Aufbau zur Messung der in-vitro-Blutungszeit*

## 2.7 Die Aggregometrie

Seit der Erstbeschreibung durch Born 1962 ist die Untersuchung der Thrombozytenaggregation ein wichtiges Instrument zur Erfassung angeborener, erworbener und auch medikamentös induzierter Funktionsstörungen der

Thrombozyten. Bei der Untersuchung zur Wirksamkeit von Aggregationshemmern ist die Methode gut einsetzbar.

### **2.7.1 Das Messprinzip**

Plättchenreiches Plasma wird bei 37°C und definierter Geschwindigkeit in einer Küvette gerührt, die zwischen einer Lichtquelle und einer Photozelle platziert wird. Nach Zugabe der Aggregantien (ADP oder Kollagen) aggregieren die Plättchen, und die Lichtdurchlässigkeit durch die Küvette nimmt zu. Diese Änderung der Lichtdurchlässigkeit wird von einem angeschlossenen Schreiber aufgezeichnet.

Die Reagenzien ADP und Kollagen binden an spezifische Membranrezeptoren, aktivieren dadurch die Thrombozyten und lösen eine Serie spezifischer Reaktionen aus, die als Gestaltänderung (shape change), Sekretion des Granulainhalts und Aggregation bezeichnet werden. Gemessen wird die Menge der benötigten ADP und Colagenmengen, um eine gleich starke Aggregationsreaktion auszulösen.

### **2.7.2 Durchführung**

Von jedem Probanden wurden zwei Gerinnungsröhrchen mit Zitratblut (340 µl), jeweils vor der Einnahme des jeweiligen Medikamentes, sowie an Tag 4, Tag 5 und Tag 6 nach der Medikamenteneinnahme, gewonnen. Es wurde plättchenreiches (PRP) und plättchenarmes Plasma (PAP) aus den Blutproben hergestellt. Das plättchenreiche Plasma wurde auf eine Anzahl von 200/nl Thrombozyten eingestellt. Die Untersuchung erfolgte eine Stunde nach der Blutentnahme.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Aggregometer Apac der Firma LAbor verwendet. Das Ausmaß der Aggregation wurde in Prozent der optischen Dichte angegeben. Die Eichung der optischen Dichte erfolgt mit dem jeweils zu untersuchenden plättchenreichen Plasma als 100% und des plättchenarmen Plasmas als 0%.

## 2.8 Die Thrombelastographie

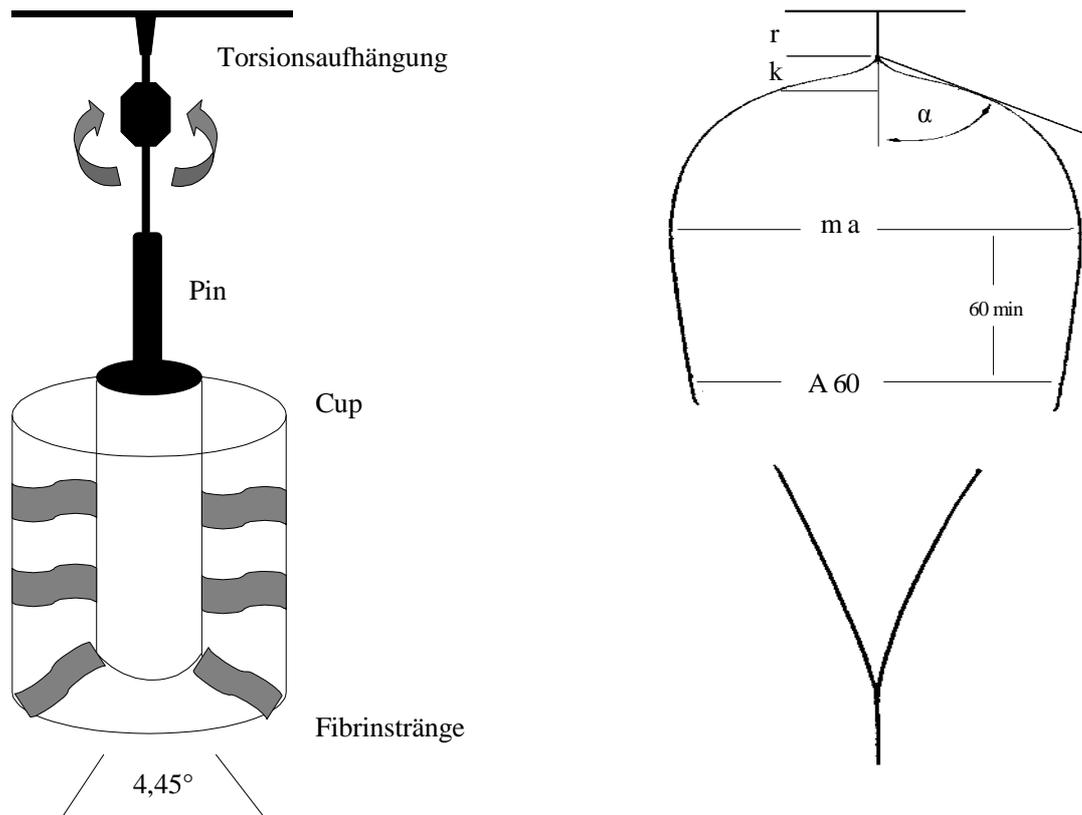
### 2.8.1 Meßprinzip

Für die Aufzeichnung eines Thrombelastogramms wird Zitratblut in einem oszillierenden Zylinder (Cup) durch Zugabe von Kalzium bei 37°C zur Gerinnung gebracht. In den Zylinder ragt ein frei beweglicher Stift (Pin), dessen Auslenkung bei Bildung von Fibrinsträngen zwischen Zylinderwand und Stift auf Papier übertragen wird. Abbildung 9 zeigt schematisch den Aufbau eines TEG-Gerätes. Daneben ist beispielhaft ein Thrombelastogramm dargestellt, das durch folgende Parameter charakterisiert ist:

r-Zeit: die sog. Reaktionszeit wird vom Start der Gerinnung bis zu einer Amplitude von 2 mm gemessen und hängt fast ausschließlich von der plasmatischen Gerinnung ab.

k-Zeit: die k-Zeit ist durch die Wegstrecke definiert, innerhalb der die Amplitude des TEG von 2 mm auf 2 cm anwächst, und entspricht der Geschwindigkeit der Koagelbildung; die k-Zeit wird etwa zu gleichen Teilen von der plasmatischen Gerinnung und der Thrombozytenzahl bzw. -funktion bestimmt. Ein anderer Parameter zur Bestimmung der Koagelentstehung ist der Winkel  $\alpha$ , der vom Startpunkt der k-Zeit an das Thrombelastogramm angelegt wird.

ma: ma steht für die maximale Amplitude des TEG und spiegelt die maximale Größe und Festigkeit des Blutgerinnsels wider, die zu etwa 80 Prozent von der Thrombozytenzahl und -funktion und zu etwa 20 Prozent vom Fibrinogenspiegel abhängt. Danach beginnt die Phase der Fibrinolyse. Der Wert A 60 beschreibt die Amplitudengröße 60 Minuten nach dem ma-Wert.



*Abbildung 9: Meßprinzip und Auswertung eines Thrombelastogramms*

### 2.8.2 Durchführung

Von jedem Probanden wurden  $340 \mu\text{l}$  Zitratblut innerhalb einer Stunde nach Blutabnahme mit  $20 \mu\text{l}$  einer 0,2-molaren Kalziumchloridlösung direkt in einem Cup gemischt, wodurch die Gerinnung in dem von uns verwendeten Thrombograph der Firma Thrombomed gestartet wurde. Als Verdunstungsschutz überschichteten wir den Lösungsansatz mit  $200 \mu\text{l}$  Paraffinöl. Die Geschwindigkeit des Papiervorschubs war auf  $2 \text{ mm/min}$  eingestellt. Nach sichtbarem Überschreiten der maximalen Amplitude und beginnender Fibrinolyse wurde die TEG-Aufzeichnung beendet.

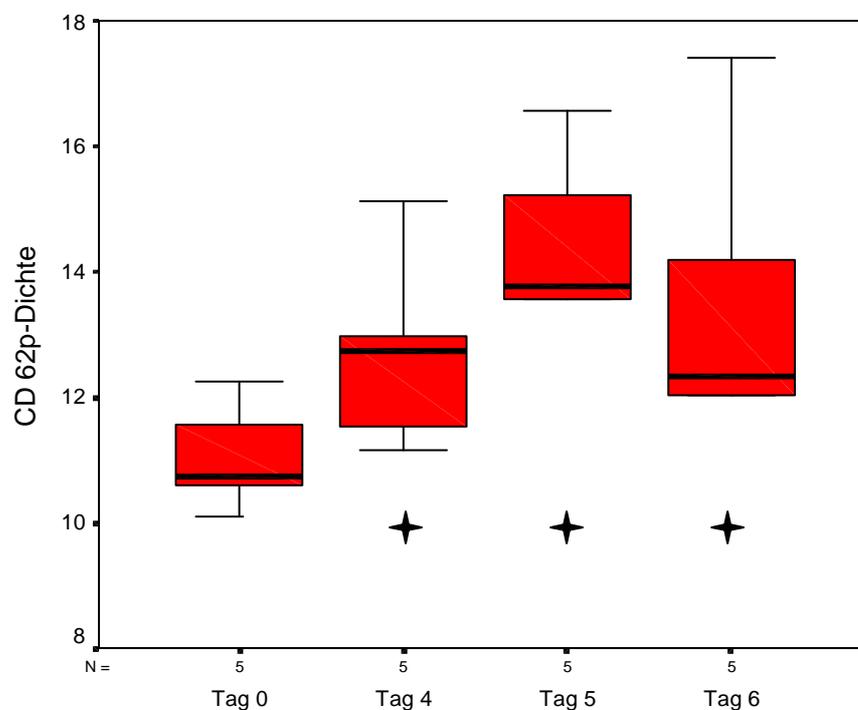
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Statistisch signifikante Ergebnisse aus der FACS-Analyse

#### 3.1.1 Statistisch signifikante Ergebnisse aus der FACS-Analyse, zum Rezeptor P-Selektin mit dem Antikörper anti-CD 62p, ohne Stimulation durch ADP oder TRAP, nach Einnahme der untersuchten Medikamente.

##### 3.1.1.1 FACS, ASS, anti-CD-62p, ohne Stimulation

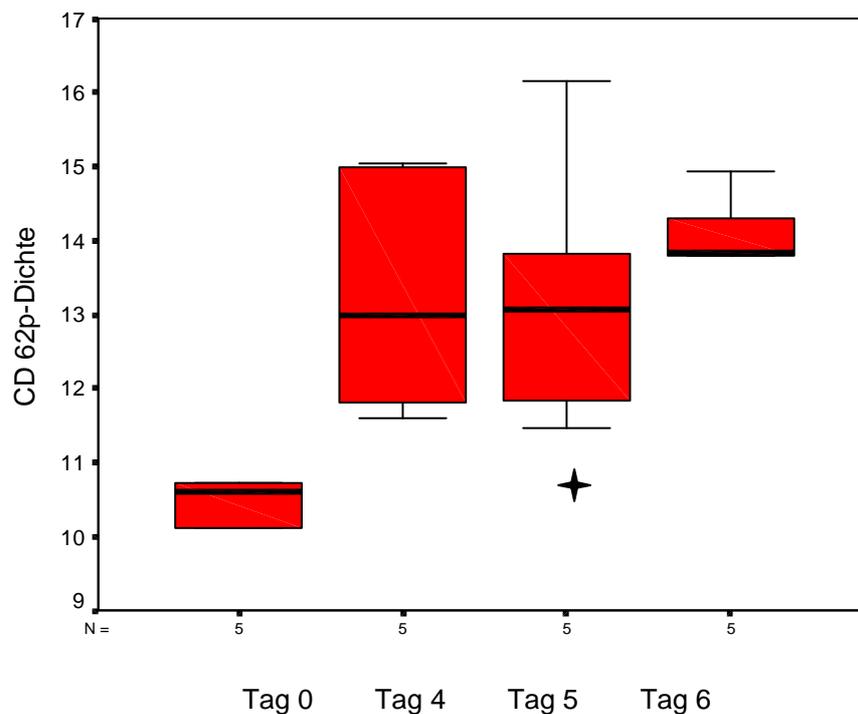
Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von jeweils  $p=0,043$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zu Tag vier, fünf und sechs nach dreimaliger Einnahme von ASS im Sinne eines Anstieges der Expression des Rezeptors P-Selektin in der Thrombozytenmembran aus der Wand der  $\alpha$ -Granula (s. Abb. 10).



*Abbildung 10: P-Selektin-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-CD62p-Antikörpers ohne Stimulation durch ADP oder TRAP, nach Einnahme von ASS.*

### 3.1.1.2 FACS, Ibuprofen, anti-CD-62p, ohne Stimulation

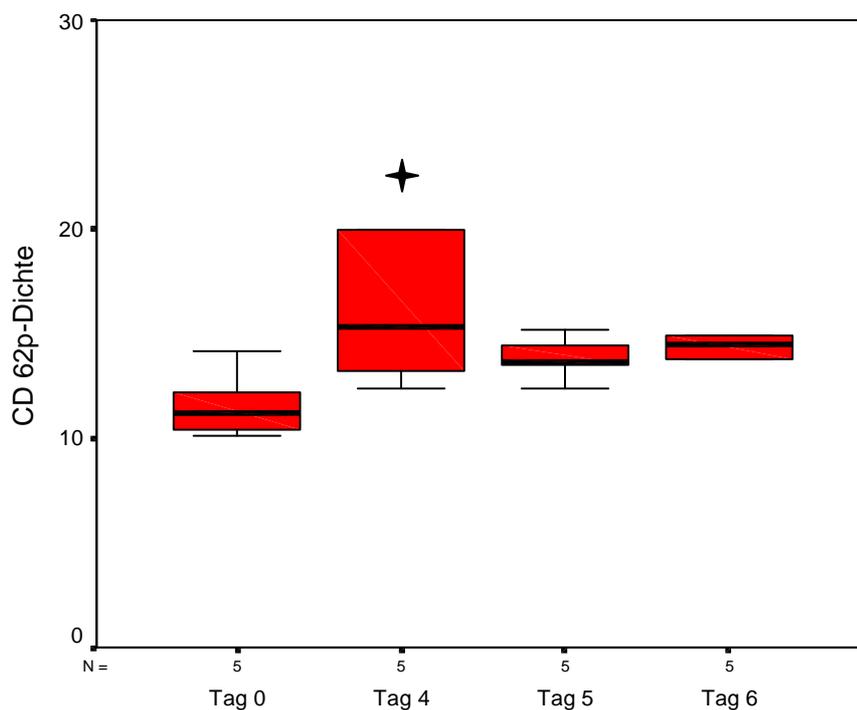
Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,043$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zu Tag fünf nach dreimaliger Einnahme von Ibuprofen im Sinne eines Anstieges der Expression des Rezeptors P-Selektin in der Thrombozytenmembran aus der Wand der  $\alpha$ -Granula, bestimmt mit dem Anti-CD 62p (s. Abb. 11).



*Abbildung 11: P-Selektin-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-CD62p-Antikörpers ohne Stimulation, nach Einnahme von Ibuprofen*

### 3.1.1.3 FACS, Diclofenac, anti-62p, ohne Stimulation

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,043$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zu Tag vier nach dreimaliger Einnahme von Diclofenac im Sinne eines Anstiegs des Rezeptors P-Selektin in der Thrombozytenmembran aus der Wand der  $\alpha$ -Granula, dargestellt mit dem Anti-CD-62p (s. Abb. 12).



*Abbildung 12: P-Selektin-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-CD62p-Antikörpers ohne Stimulation, nach Einnahme von Diclofenac.*

Nach der Einnahme von Paracetamol und Rofecoxib kam es nicht zu einer signifikanten Beeinflussung der P-Selektinexpression (s. Tab. 2).

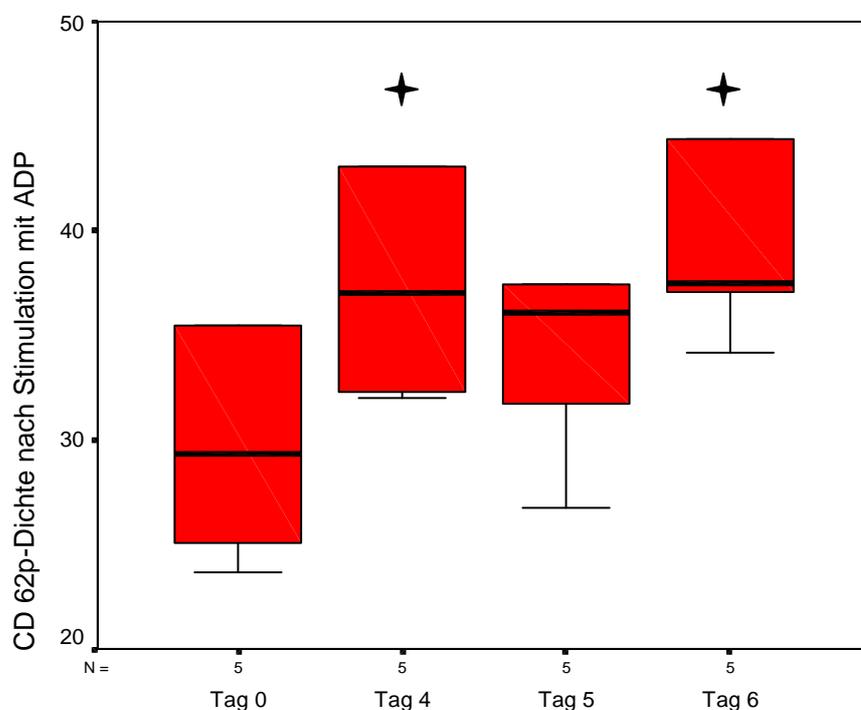
	ASS	Ibuprofen	Paracetamol	Diclofenac	Rofecoxib
P-Selektin-Expression ohne Stimulation der Thrombozyten	+	+	0	+	0

*Tabelle 2: Auswirkungen der untersuchten Medikamente auf die P-Selektin-Expression ohne Stimulation der Thrombozyten mittels ADP und PAF; + Mehrexpression, 0 kein signifikanter Unterschied, - verminderte Expression*

### 3.1.2 Statistisch signifikante Ergebnisse aus der FACS-Analyse zum Rezeptor P-Selektin, nach Stimulation der Thrombozyten durch ADP, nach Einnahme der untersuchten Medikamente.

#### 3.1.2.1 FACS, Diclofenac, anti-62p, nach Stimulation durch ADP

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von jeweils  $p=0,043$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zur Messung an Tag 4 und an Tag 6 nach dreimaliger Einnahme von Diclofenac im Sinne ein Anstieges des Rezeptors P-Selektin aus der Wand der  $\alpha$ -Granula (s. Abb. 13).



*Abbildung 13: P-Selektin-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-CD62p-Antikörpers mit Stimulation der Thrombozyten durch ADP, nach Einnahme von Diclofenac.*

Nach der Einnahme von ASS, Ibuprofen, Paracetamol und Rofecoxib kam es nicht zu einer signifikanten Beeinflussung der P-Selektinexpression (s. Tab. 3)

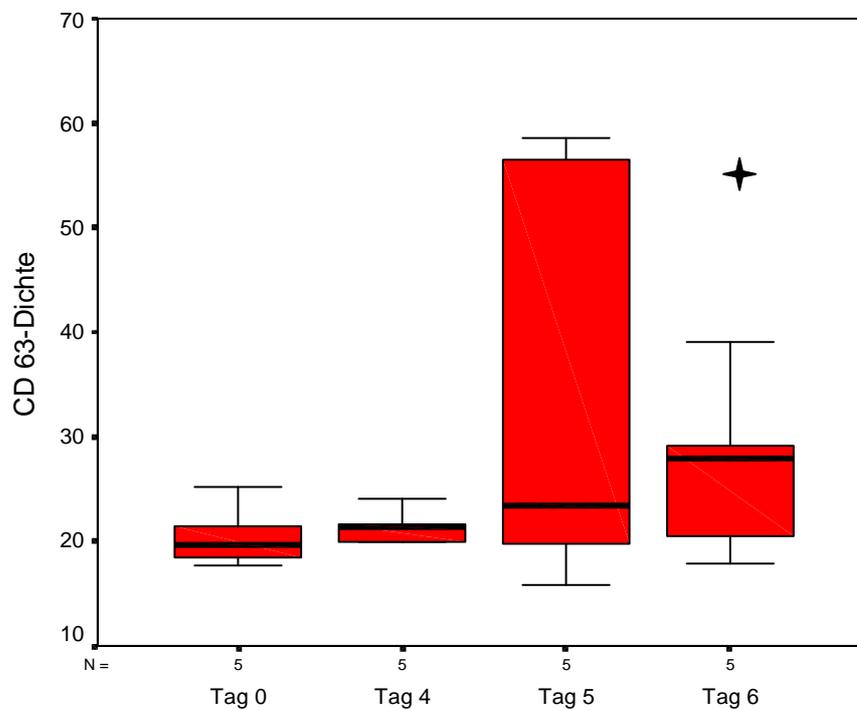
	ASS	Ibuprofen	Paracetamol	Diclofenac	Rofecoxib
P-Selektin- Expression nach Stimulation der Thrombozyten durch ADP	0	0	0	+	0

*Tabelle 3: Auswirkungen der untersuchten Medikamente auf die P-Selektin-Expression mit Stimulation der Thrombozyten mittels ADP; + Mehrexpression, 0 kein signifikanter Unterschied, - verminderte Expression.*

### 3.1.3 Statistisch signifikante Ergebnisse aus der FACS-Analyse zum Rezeptor CD-63, ohne Stimulation der Thrombozyten durch ADP oder TRAP, nach Einnahme der untersuchten Medikamente

#### 3.1.3.1 FACS, Paracetamol, anti-CD-63, ohne Stimulation

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,043$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zur Messung an Tag 6 nach dreimaliger Einnahme von Paracetamol im Sinne eines Anstiegs des Rezeptors GP 53 aus den thrombozytären Lysosomen (s. Abb. 14).

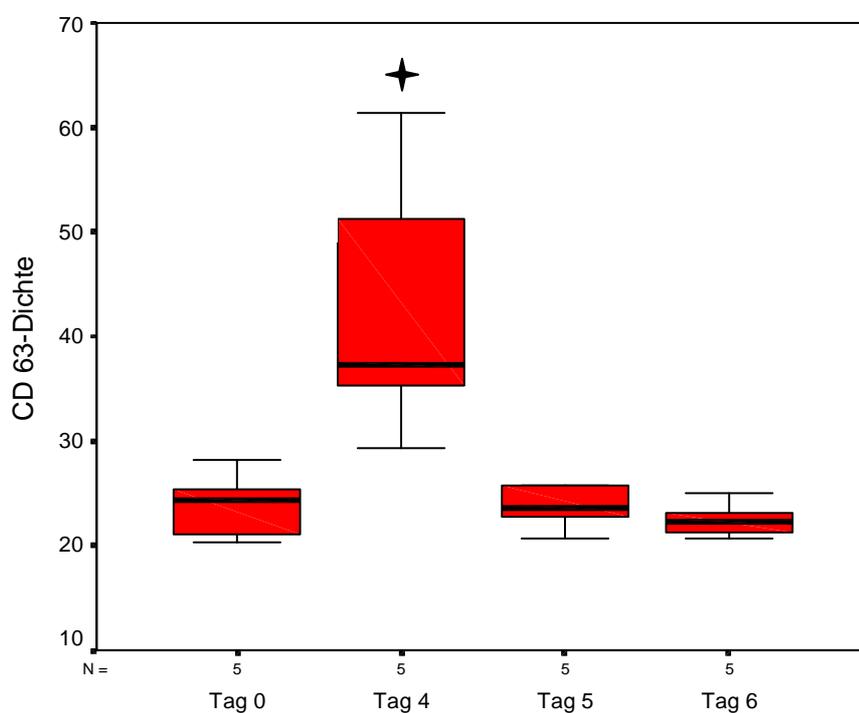


*Abbildung 14: GP-53-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-CD63-Antikörpers ohne Stimulation der Thrombozyten durch ADP oder TRAP, nach Einnahme von Paracetamol.*

### 3.1.3.2 FACS, Diclofenac, anti-CD-63, ohne Stimulation

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0,043$ ) der Messung ohne Medikament im Vergleich zur Messung an Tag 4 nach dreimaliger Einnahme von Diclofenac im Sinne eines Anstieges des Rezeptors GP 53 aus den Lysosomen der Thrombozyten (s. Abb. 15).

Nach Einnahme der anderen untersuchten Medikamente kam es zu keinen signifikanten Veränderungen (s. Tab. 4)



*Abbildung 15: GP-53-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-CD63-Antikörpers ohne Stimulation der Thrombozyten durch ADP oder TRAP nach Einnahme von Diclofenac.*

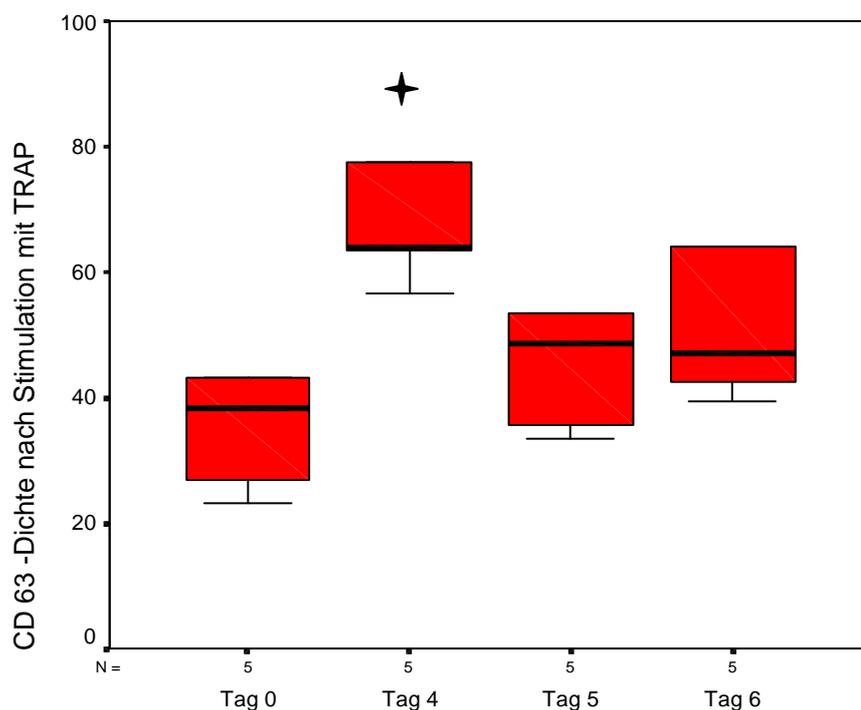
	ASS	Ibuprofen	Paracetamol	Diclofenac	Rofecoxib
GP-53-Expression ohne Stimulation der Thrombozyten	0	0	+	+	0

*Table 4: Auswirkungen der untersuchten Medikamente auf die Expression des GP-53 ohne Stimulation der Thrombozyten mittels ADP oder TRAP; + Mehrexpression, 0 kein signifikanter Unterschied, - verminderte Expression*

### 3.1.4 Statistisch signifikante Ergebnisse aus der FACS-Analyse zum Rezeptor CD 63, mit Stimulation durch TRAP, nach Einnahme der untersuchten Medikamente

#### 3.1.4.1 FACS, Diclofenac, anti-CD-63, Stimulation mit TRAP

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0,043$ ) der Messung ohne Medikament im Vergleich zur Messung an Tag 4 nach dreimaliger Einnahme von Diclofenac im Sinne eines Anstieges des Rezeptors GP 53 aus den Lysosomen der Thrombozyten (s. Abb. 16).



*Abbildung 16: GP-53-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-CD63-Antikörpers mit Stimulation der Thrombozyten durch TRAP nach Einnahme von Diclofenac.*

Nach Einnahme der anderen untersuchten Medikamente kam es zu keinen signifikanten Veränderungen (s. Tab. 5)

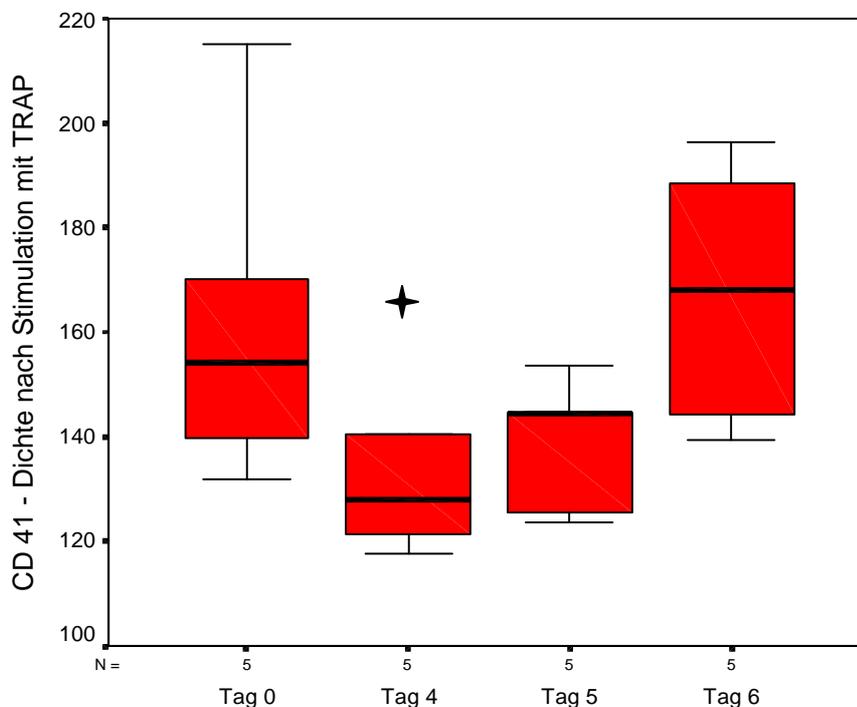
	ASS	Ibuprofen	Paracetamol	Diclofenac	Rofecoxib
GP-53- Expression nach Stimulation der Thrombozyten durch TRAP	0	0	0	+	0

*Tabelle 5: Auswirkungen der untersuchten Medikamente auf die Expression des GP-53 nach Stimulation der Thrombozyten mittels TRAP; + Mehrexpression, 0 kein signifikanter Unterschied, - verminderte Expression.*

### 3.1.5 Statistisch signifikante Ergebnisse aus der FACS-Analyse zum Rezeptor CD 41, mit Stimulation durch TRAP, nach Einnahme der untersuchten Medikamente

#### 3.1.5.1 FACS, Paracetamol, anti-CD-41, Stimulation mit TRAP

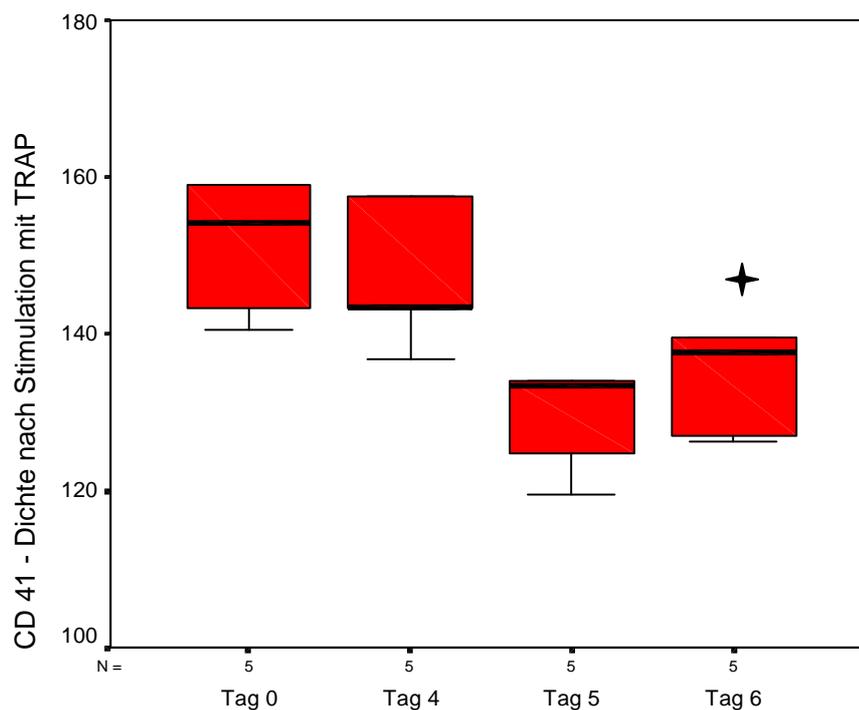
Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,043$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zur Messung an Tag 4 nach dreimaliger Einnahme von Paracetamol im Sinne einer Verminderung der Expression des GP IIb auf der Thrombozytenmembran (s. Abb. 17).



*Abbildung 17: GP IIb-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-CD41-Antikörpers mit Stimulation der Thrombozyten durch TRAP nach Einnahme von Paracetamol*

### 3.1.5.2 FACS, Rofecoxib, anti-CD-41, Stimulation mit TRAP

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,043$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zur Messung an Tag sechs nach dreimaliger Einnahme von Rofecoxib im Sinne einer Verminderung der Expression des GP IIb auf der Thrombozytenmembran (s. Abb. 18).



*Abbildung 18: GP IIb-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-CD41-Antikörpers mit Stimulation der Thrombozyten durch TRAP nach Einnahme von Rofecoxib.*

Nach Einnahme der anderen untersuchten Medikamente kam es zu keinen signifikanten Veränderungen (s. Tab. 6).

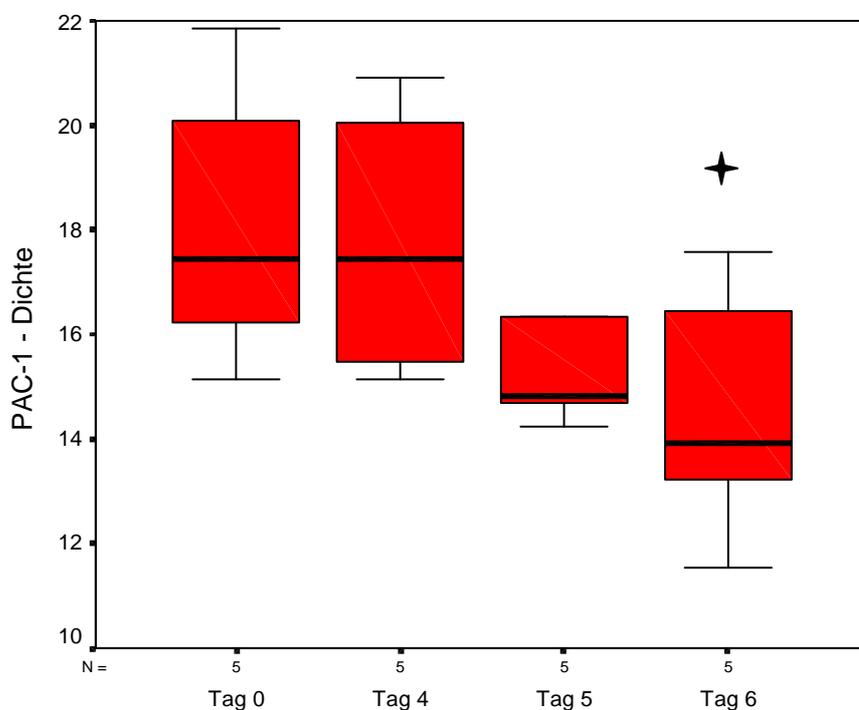
	ASS	Ibuprofen	Paracetamol	Diclofenac	Rofecoxib
GP-IIb- Expression nach Stimulation der Thrombozyten durch TRAP	0	0	-	0	-

*Tabelle 6: Auswirkungen der untersuchten Medikamente auf die Expression des GP-IIb nach Stimulation der Thrombozyten mittels TRAP; + Mehrexpression, 0 kein signifikanter Unterschied, - verminderte Expression.*

### 3.1.6 Statistisch signifikante Ergebnisse aus der FACS-Analyse zum Rezeptor PAC-1, ohne Stimulation, nach Einnahme der untersuchten Medikamente

#### 3.1.6.1 FACS, Rofecoxib, PAC-1, ohne Stimulation

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,043$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zur Messung an Tag sechs nach dreimaliger Einnahme von Rofecoxib im Sinne einer Abnahme des aktivierten GP IIb/IIIa auf der Thrombozytenmembran (s. Abb. 19).



*Abbildung 19: GP-IIb/IIIa-Oberflächendichte, bestimmt mit Hilfe der Fluoreszenzstärke des Anti-PAC-1-Antikörpers ohne Stimulation der Thrombozyten durch ADP oder TRAP nach Einnahme von Rofecoxib.*

Nach Einnahme der anderen untersuchten Medikamente kam es zu keinen signifikanten Veränderungen (s. Tab. 7)

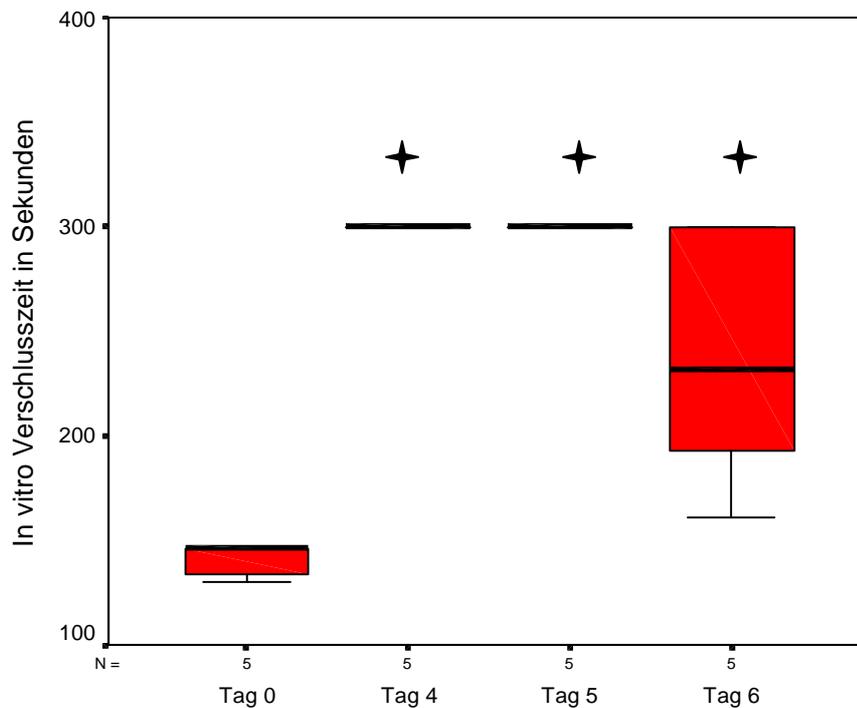
	ASS	Ibuprofen	Paracetamol	Diclofenac	Rofecoxib
GP-IIb/IIIa- Expression ohne Stimulation der Thrombozyten	0	0	0	0	-

*Tabelle 7: Auswirkungen der untersuchten Medikamente auf die Expression des GP-IIb/IIIa ohne Stimulation der Thrombozyten mittels TRAP; + Mehrexpression, 0 kein signifikanter Unterschied, - verminderte Expression.*

## 3.2 Statistisch signifikante Ergebnisse aus der PFA-100-Analyse

### 3.2.1 Statistisch signifikante Veränderung der In-vitro-Verschlusszeit nach Einnahme von ASS bei Epinephrin beschichteter Kapillare

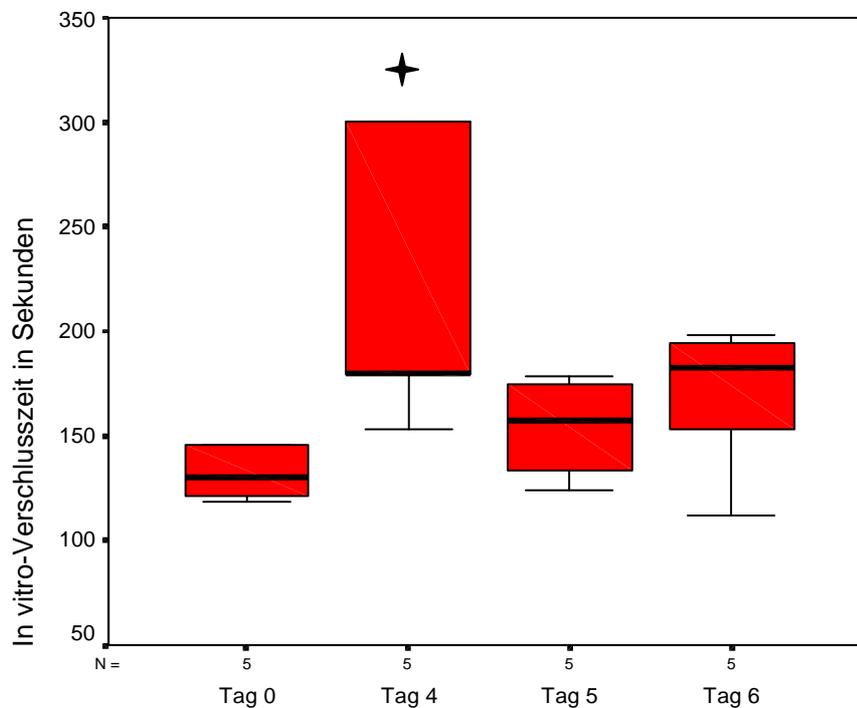
Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Messung ohne Medikament im Vergleich zur Messung an Tag vier ( $p=0,042$ ), Tag fünf ( $p=0,042$ ) und Tag sechs ( $p=0,043$ ) nach dreimaliger Einnahme von ASS im Sinne einer Verlängerung der Verschlusszeit (s. Abb. 20).



*Abbildung 20: Veränderungen der In-vitro-Verschlusszeit nach Einnahme von ASS, gemessen in Sekunden, bei epinephrinbeschichteter Kapillare.*

### 3.2.2 Statistisch signifikante Veränderung der In-vitro-Verschlusszeit nach Einnahme von Ibuprofen bei epinephrinbeschichteter Kapillare

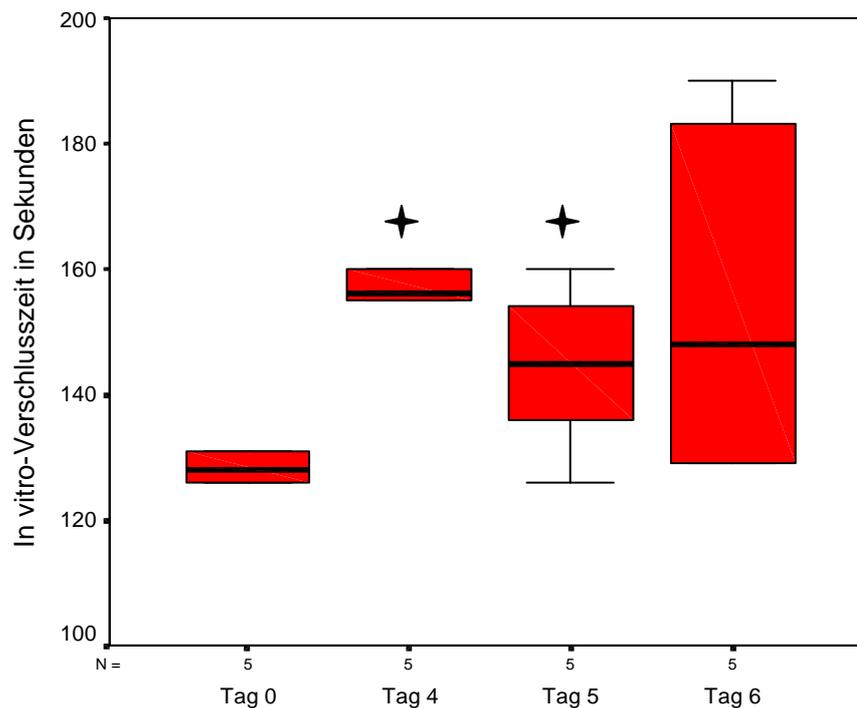
Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,042$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zur Messung an Tag vier nach dreimaliger Einnahme von Ibuprofen im Sinne einer Verlängerung der Verschlusszeit (s. Abb. 21). Im Gegensatz zu ASS ist dieser Effekt an Tag 5 und Tag 6 nicht mehr nachweisbar.



*Abbildung 21: Veränderungen der In-vitro-Verschlusszeit nach Einnahme von Ibuprofen, gemessen in Sekunden, bei epinephrinbeschichteter Kapillare.*

### 3.2.3 Statistisch signifikante Veränderung der Verschlusszeit nach Einnahme von Paracetamol bei epinephrinbeschichteter Kapillare

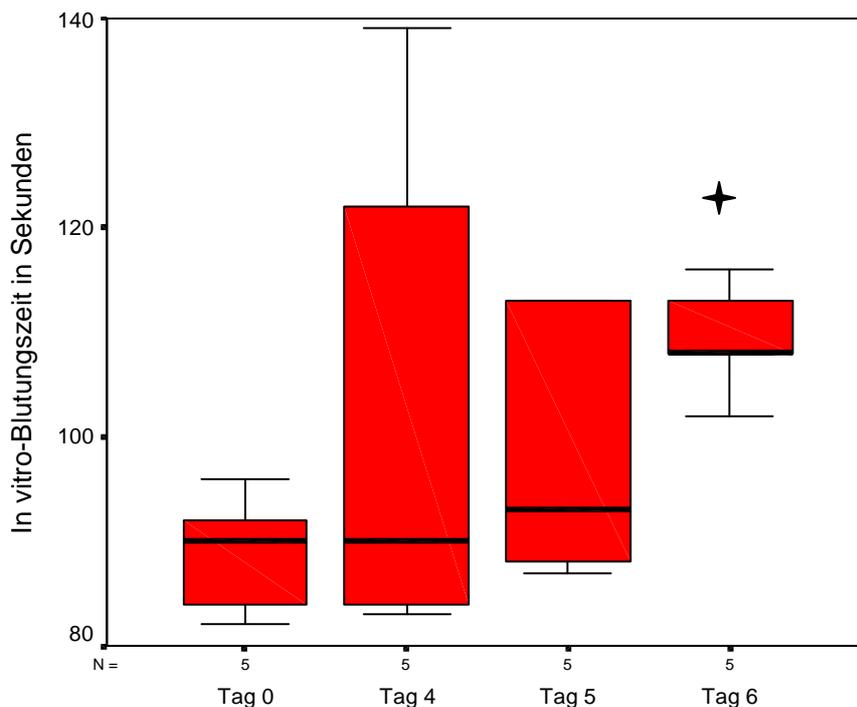
Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,043$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zur Messung an Tag vier und fünf nach dreimaliger Einnahme von Paracetamol im Sinne einer Verlängerung der Verschlusszeit, jedoch noch innerhalb des Normbereichs (s. Abb. 22).



*Abbildung 22: Veränderungen der In-vitro-Verschlusszeit nach Einnahme von Paracetamol, gemessen in Sekunden, bei epinephrinbeschichteter Kapillare.*

### 3.2.4 Statistisch signifikante Veränderung der In-vitro-Verschlusszeit nach Einnahme von Diclofenac bei ADP-beschichteter Kapillare

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,042$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zur Messung an Tag sechs nach dreimaliger Einnahme von Diclofenac im Sinne einer Verlängerung der Verschlusszeit (s. Abb. 23).



*Abbildung 23: Veränderungen der In-vitro-Verschlusszeit nach Einnahme von Diclofenac, gemessen in Sekunden, bei ADP-beschichteter Kapillare.*

Nach Einnahme der anderen untersuchten Medikamente kam es zu keinen signifikanten Veränderungen (s. Tab. 8)

	ASS	Ibuprofen	Paracetamol	Diclofenac	Rofecoxib
In-vitro- Verschlusszeit bei Epinephrin- beschichteter Kapillare	+	+	+	0	0
In-vitro- Verschlusszeit bei ADP- beschichteter Kapillare	0	0	0	+	0

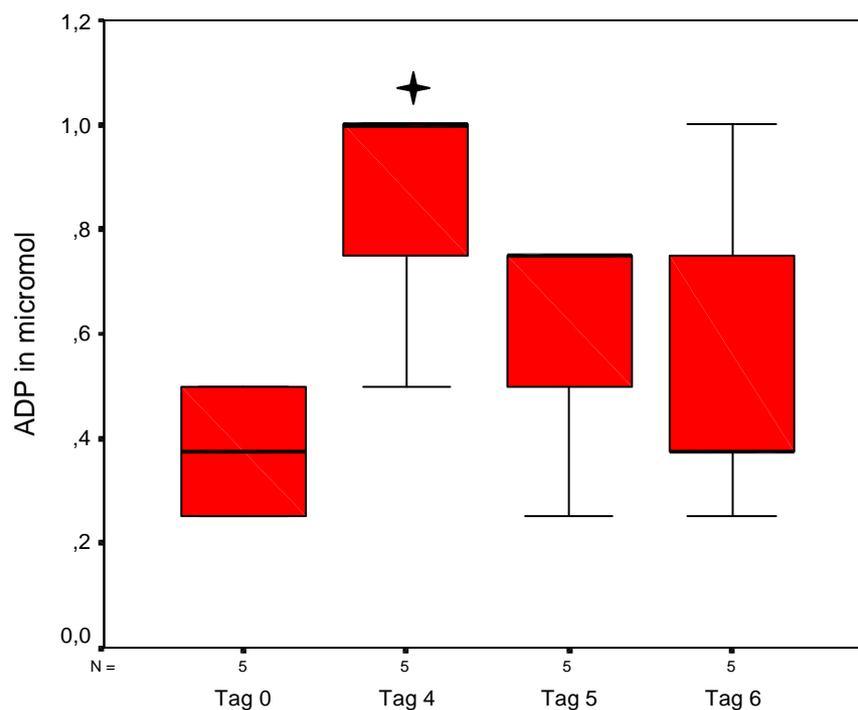
*Tabelle 8: Auswirkungen der untersuchten Medikamente auf die In-vitro-Verschlusszeit bei Epinephrin- und ADP-beschichteter Kapillare; + Verlängerung der Verschlusszeit, 0 kein signifikanter Unterschied, - verkürzte Verschlusszeit.*

### 3.3 Statistisch signifikante Ergebnisse aus der Aggregometrie-Analyse

#### 3.3.1 Statistisch signifikante Veränderung der benötigten Agonistenmenge bis zum Erreichen einer Aggregation nach dreimaliger Einnahme von ASS

##### 3.3.1.1 Messung nach Einnahme von Aspirin, Stimulation mit ADP

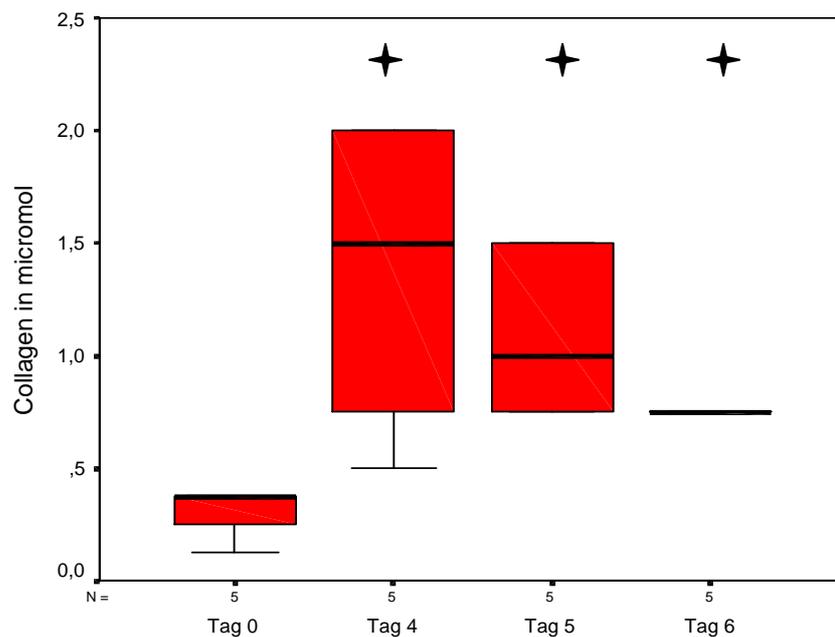
Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,043$  bei der Messung ohne Medikament im Vergleich zur Messung an Tag vier nach dreimaliger Einnahme von ASS im Sinne eines Anstiegs der benötigten Menge an ADP (s. Abb. 24).



*Abbildung 24: Anstieg der benötigten Menge ADP, um eine vergleichbare Aggregation nach Einnahme von ASS auszulösen*

### 3.3.1.2 Messung nach Einnahme von ASS, Stimulation mit Collagen

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von jeweils  $p=0,043$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zur Messung an Tag vier, fünf und sechs nach dreimaliger Einnahme von ASS im Sinne eines Anstiegs der benötigten Menge an Collagen (s. Abb. 25).



*Abbildung 25: Anstieg der benötigten Menge Collagen, um eine vergleichbare Aggregation nach Einnahme von ASS auszulösen*

Nach Einnahme der anderen untersuchten nichtsteroidalen Antiphlogistika konnte keine signifikante Änderung im Aggregationsverhalten der Plättchen nachgewiesen werden (s. Tab. 9).

	ASS	Ibuprofen	Paracetamol	Diclofenac	Rofecoxib
Collagen	+	0	0	0	0
ADP	+	0	0	0	0

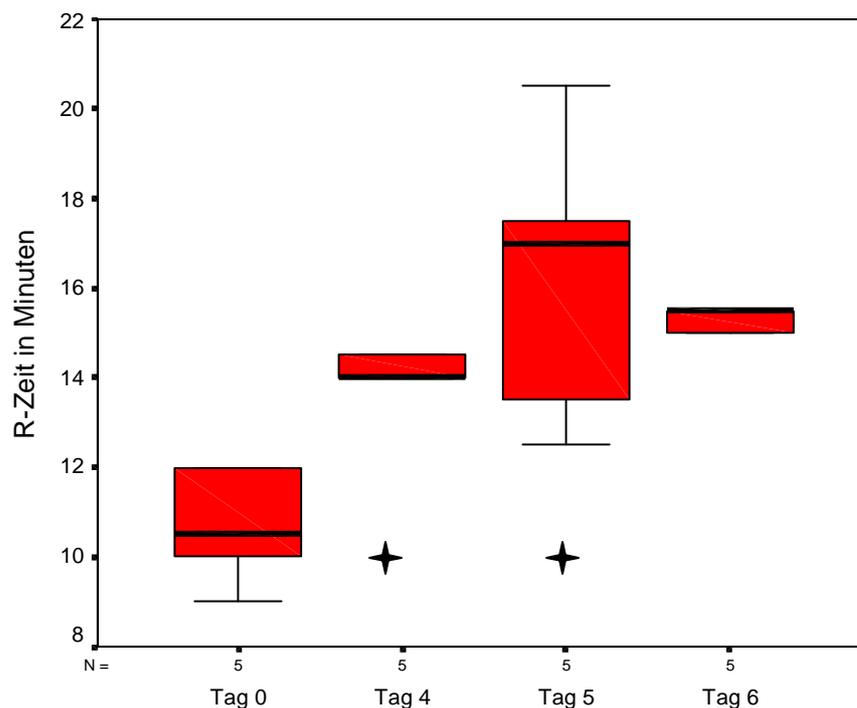
*Tabelle 9: Auswirkungen der untersuchten Medikamente auf die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten anhand der Aggregometrie im Sinne einer signifikant erhöhten Agonistendosis, + signifikante Erhöhung der benötigten Agonistendosis; 0 kein signifikanter Unterschied; - signifikante Verminderung der benötigten Agonistendosis.*

### 3.4 Statistisch signifikante Ergebnisse aus der Thromboelastographie

#### 3.4.1 Statistisch signifikante Veränderungen der R-Zeit, K-Zeit und MA-Zeit nach dreimaliger Einnahme von ASS

##### 3.4.1.1 Messung der R-Zeit nach Einnahme von ASS

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,043$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zu Tag 4 und einem Signifikanzniveau von  $p=0,042$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zu Tag 5 nach Einnahme von ASS im Sinne einer Verlängerung der Dauer bis zum Beginn der plasmatischen Gerinnung (s. Abb 26).



*Abbildung 26: Verlängerung der Dauer bis zum Beginn der plasmatischen Gerinnung nach Einnahme von ASS*

### 3.4.1.2 Messung der K-Zeit nach Einnahme von ASS

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,041$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zu Tag 4 nach Einnahme von ASS im Sinne einer Verlängerung der Dauer bis zum Ende der Koagelbildung (s. Abb. 27).

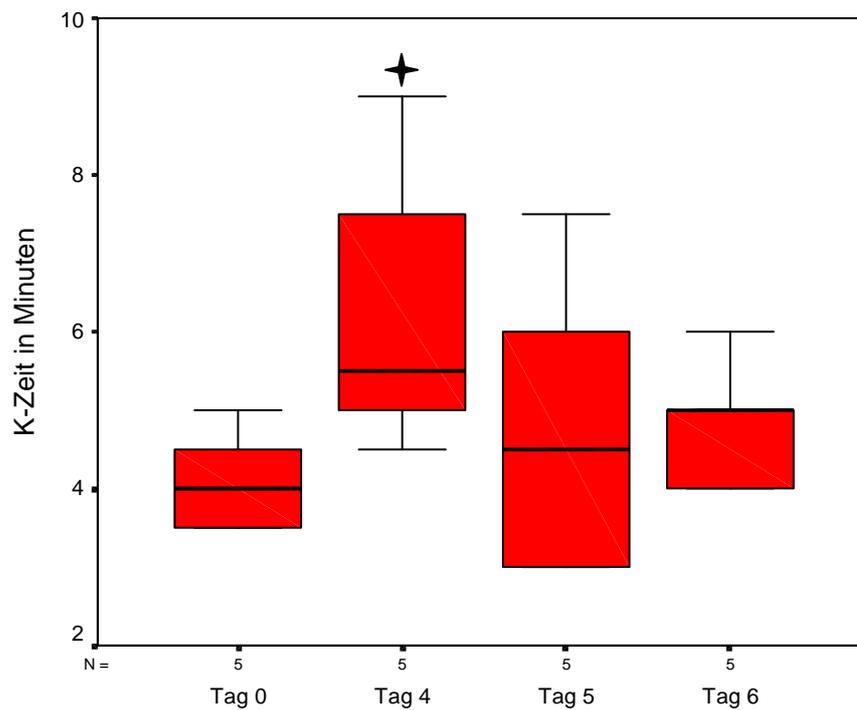
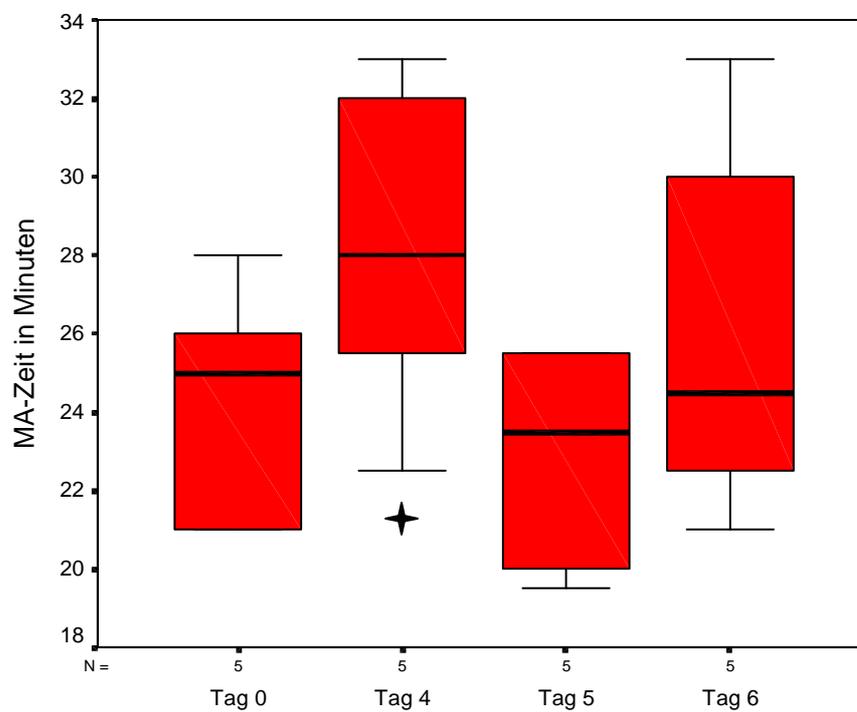


Abbildung 27: Verlängerung der Koagelbildungsdauer nach Einnahme von ASS

### 3.4.1.3 Messung der MA-Zeit nach Einnahme von ASS

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,043$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zu Tag 4 nach Einnahme von ASS im Sinne einer längeren Dauer bis zum Erreichen der maximalen Amplitude, die der größten Festigkeit des Blutgerinnsels entspricht. X-Achse = Tage, Y-Achse = Minuten (s. Abb 28).

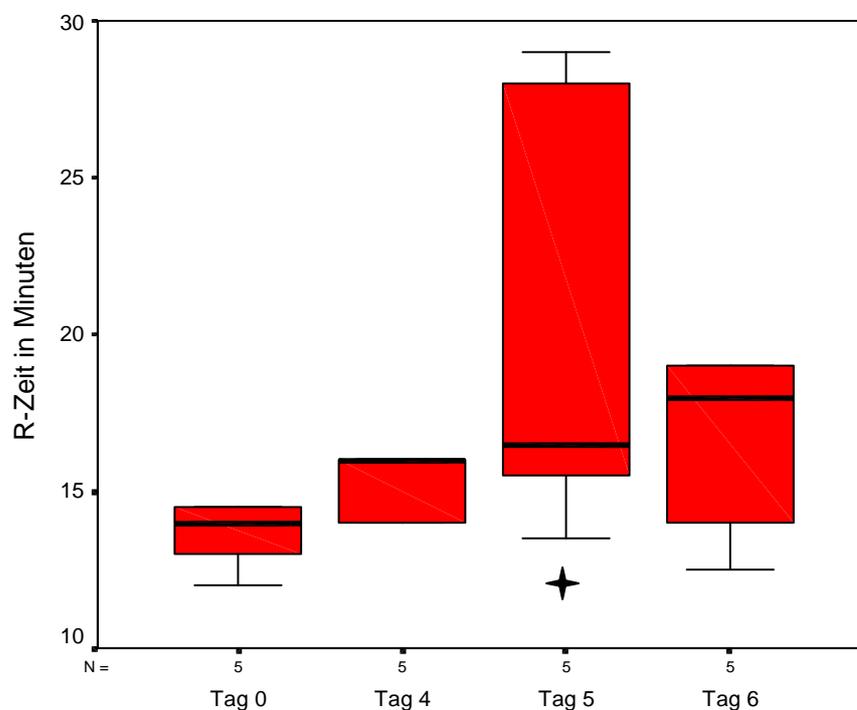


*Abbildung 28: Signifikante Verlängerung der Zeitdauer bis zum Erreichen des festmöglichen Blutgerinnsels nach Einnahme von ASS.*

### 3.4.2 Statistisch signifikante Veränderung der R-Zeit nach dreimaliger Einnahme von Diclofenac

#### 3.4.2.1 Messung der R-Zeit nach Einnahme von Diclofenac

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,043$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zu Tag 5 nach Einnahme von Diclofenac im Sinne einer Verlängerung der Dauer bis zum Beginn der plasmatischen Gerinnung (s. Abb 29).



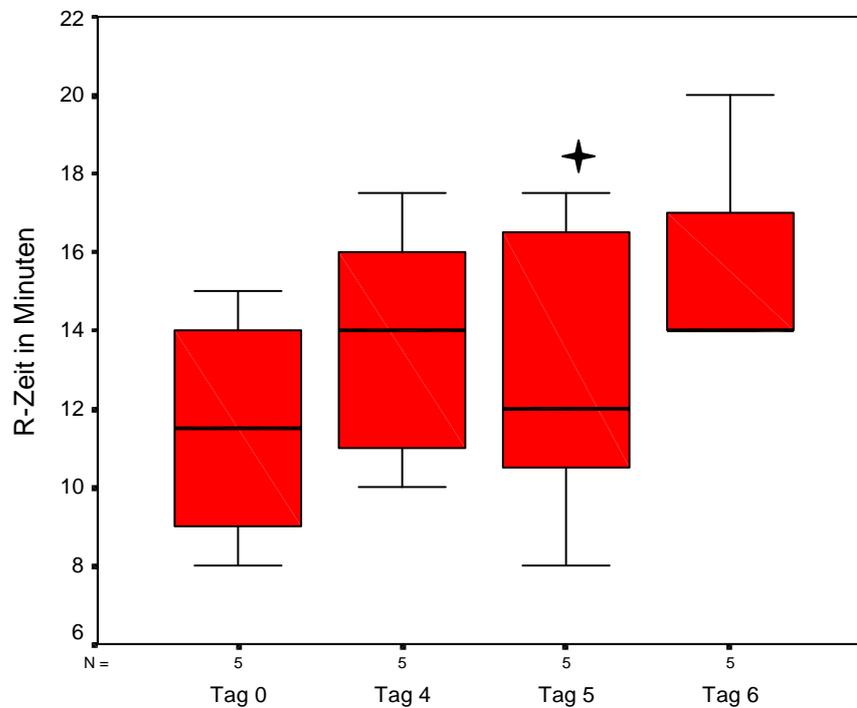
*Abbildung 29: Verlängerung der Dauer bis zum Beginn der plasmatischen Gerinnung nach Einnahme von Diclofenac*

Die Messung der K- und MA-Zeit konnte keinen signifikanten Unterschied zeigen.

### 3.4.3 Statistisch signifikante Veränderung der R-Zeit, der K-Zeit und der MA-Zeit nach dreimaliger Einnahme von Rofecoxib

#### 3.4.3.1 Messung der R-Zeit nach Einnahme von Rofecoxib

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,038$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zu Tag 4 nach Einnahme von Rofecoxib im Sinne einer Verlängerung der Dauer bis zum Beginn der plasmatischen Gerinnung (s. Abb 30).



*Abbildung 30: Verlängerung der Dauer bis zum Beginn der plasmatischen Gerinnung nach Einnahme von Rofecoxib.*

### 3.4.3.2 Messung der K-Zeit nach Einnahme von Rofecoxib

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,039$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zu Tag 4 nach Einnahme von Rofecoxib im Sinne einer Verlängerung der Dauer bis zum Ende der Koagelbildung (s. Abb. 31).

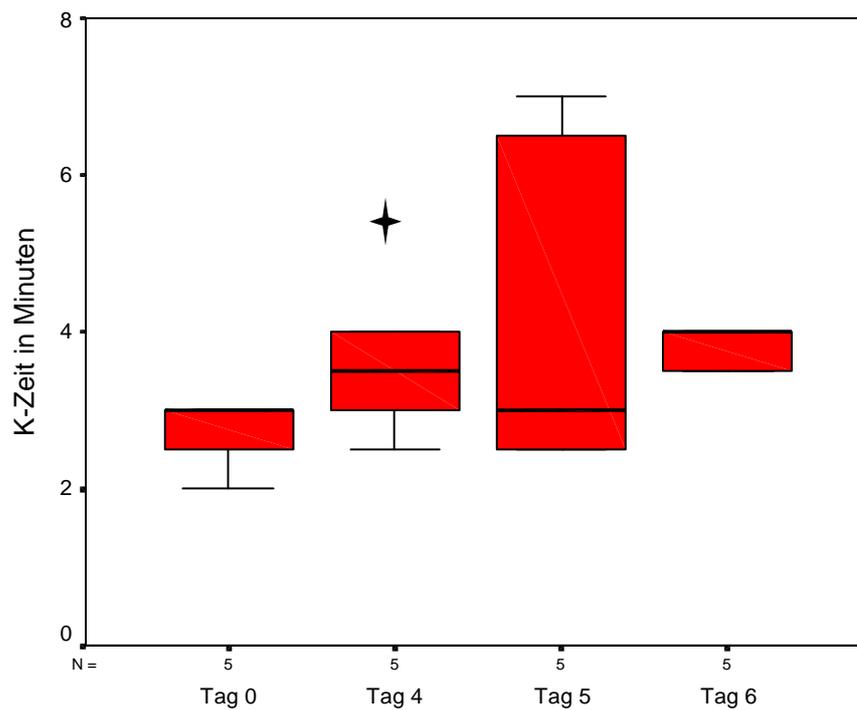
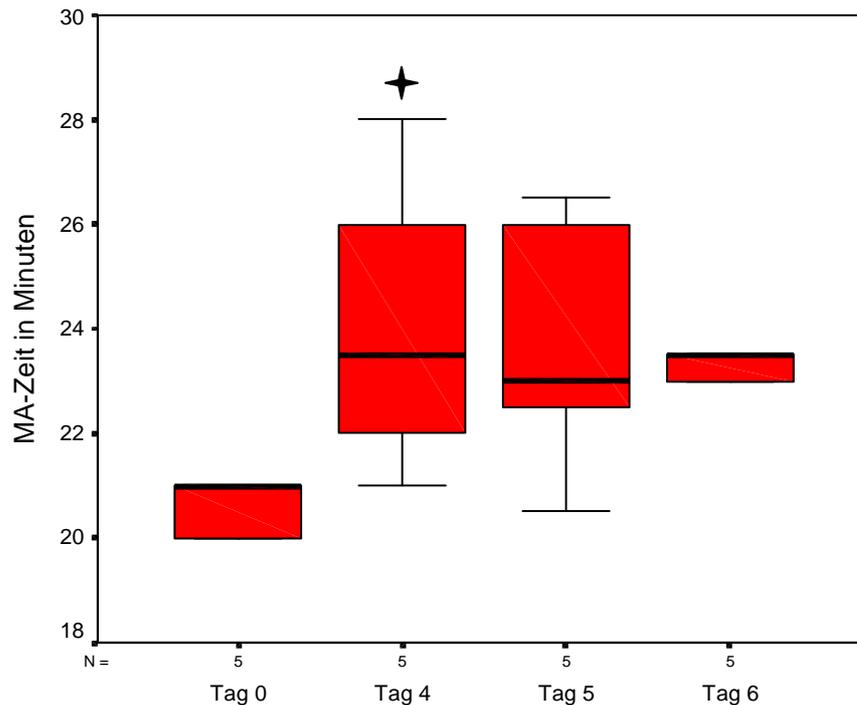


Abbildung 31: Verlängerung der Koagelbildungsdauer nach Einnahme von Rofecoxib

### 3.4.3.3 Messung der MA-Zeit nach Einnahme von Rofecoxib

Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,042$  der Messung ohne Medikament im Vergleich zu Tag 4 nach Einnahme von Rofecoxib im Sinne einer längeren Dauer bis zum Erreichen der maximalen Amplitude, die der größten Festigkeit des Blutgerinnsels entspricht (s. Abb. 32).



*Abbildung 32: Signifikante Verlängerung der Zeitdauer bis zum Erreichen des festmöglichsten Blutgerinnsels nach Einnahme von Rofecoxib.*

Nach Einnahme der anderen untersichten Medikamente konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden (s. Tab. 10).

	ASS	Ibuprofen	Paracetamol	Diclofenac	Rofecoxib
R-Zeit	+	0	0	+	+
K-Zeit	+	0	0	0	+
MA-Zeit	+	0	0	0	+

*Tabelle 10: Auswirkungen der untersuchten Medikamente auf die Thrombelastographie. + Verlängerung der Messzeit, 0 keine statistisch signifikante Veränderung der Messzeit.*

## 4 Diskussion

### 4.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie hat sich im Laufe der letzten zehn Jahre als nützliche Methode zur Studie von normalen und abnormalen Membranrezeptoren auf Thrombozyten erwiesen. Sie ist also eine Methode, die als Test für die Thrombozytenfunktion eingesetzt werden kann, analysiert aber auch deren Interaktion mit anderen Zellen<sup>55 56 57 58 59 60</sup>.

Thrombozyten zirkulieren normalerweise in einem nicht aktivierten Status durch das Gefäßsystem. Im Verlauf des Aktivierungsprozesses bilden die Thrombozyten Aggregate, geben Inhaltsstoffe der Granula frei und unterstützen die Bildung eines hämostatischen Gerinnsels. Während der Hämostase interagieren Komponenten der thrombozytären Plasmamembran mit Substanzen der Gefäßwand, mit Oberflächenrezeptoren anderer Blutzellen und mit verschiedenen Gerinnungsproteinen. Auch durch diese Interaktionen können Thrombozyten aktiviert werden, was sich auch mit Hilfe der Thrombozytendurchflusszytometrie nachweisen lässt<sup>61 62 63</sup>.

Mit Hilfe von kommerziell erhältlichen fluorchrommarkierten monoklonalen Antikörpern können diese spezifischen Veränderungen der Oberfläche aktivierter Thrombozyten gemessen werden<sup>64</sup>.

Wie in der vorliegenden Arbeit durch die Methode der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden konnte, zeigt sich eine signifikante Veränderung der Expression des Rezeptors P-Selektin nach Einnahme von 500mg ASS an drei aufeinander folgenden Tagen. Der Rezeptor P-Selektin wurde mit dem Antikörper CD 62 markiert. Ohne zusätzliche Stimulation der Thrombozyten konnte die vermehrte Expression des Rezeptors an den folgenden Tagen nach der Einnahme des Medikaments nachgewiesen werden. Bis zum Tag fünf waren die Werte ansteigend, erst an Tag

sechs, also drei Tage nach der Einnahme von ASS zeigte sich eine rückläufige, aber immer noch signifikant erhöhte Rezeptorexpression.

Es erfolgt also eine erhöhte Ausschüttung des P-Selektins aus den  $\alpha$ -Granula nach Einnahme von ASS. Erst drei Tage nach der letzten ASS-Einnahme scheint sich die Expression des P-Selektin wieder zu normalisieren.

Einen ähnlichen Einfluss auf die Thrombozyten hat Ibuprofen. Auch hier konnte nach dreitägiger Einnahme des Medikamentes ein signifikanter Anstieg des P-Selektins an Tag fünf nachgewiesen werden.

Bei dem nichtsteroidalen Antiphlogistikum Diclofenac zeigte sich ein signifikanter Anstieg des P-Selektins an Tag vier nach der dreitägigen Einnahme. An Tag fünf und sechs war dieser Anstieg jedoch nicht mehr nachweisbar.

Dieser unerwartete Effekt, die vermehrte Expression des P-Selektins nach Einnahme von Cyclooxygenase hemmenden Medikamenten, könnte in einem zweiten - Cyclooxygenase-unabhängigen - Aktivierungspfad, eventuell über Leukotriene oder Sekretionsprodukte aktivierter neutrophiler Granulozyten wie der Protease Kathepsin G, als starker Thrombozytenagonist, ihre Erklärung finden<sup>65 66</sup>. Wie Hudson im Jahre 1993 beschrieb, kommt es nach einer Blockade des Cyclooxygenase-Stoffwechselweges durch NSAIDs zu einer Induktion des Lipidoxigenase-Stoffwechsels und somit zu einer Zunahme der Leukotriene. Dies erklärt die Nebenwirkung des aspirininduzierten Asthmas. Um die hier gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich einer möglichen Aktivierung der Thrombozyten nach ASS-Einnahme zu bestätigen, müssten Untersuchungen zu den Wirkungen von Leukotrienen auf Thrombozyten durchgeführt werden.

Außerdem ist an genetische Polymorphismen der Cyclooxygenase zu denken, z.B. in der Umgebung von Ser529, dem Bindungsort der Acetylsalicylsäure an der Cyclooxygenase. Des weiteren könnte auch eine Veränderung der Isoformen der Cyclooxygenase eine Rolle spielen. Thrombozyten weisen normalerweise vorrangig die gegenüber Acetylsalicylsäure sensitive Cyclooxygenase-Isoform 1 (COX-1) auf. Weber et al. haben jedoch nachgewiesen, dass Thrombozyten auch die induzierbare, zweite Variante der Cyclooxygenase (COX-2) enthalten, welche deutlich weniger

sensitiv für ASS ist<sup>67</sup>. Schließlich ist zu bedenken, dass Thromboxan nur eine von vielen endogenen Substanzen ist, die Thrombozyten aktivieren können. Dies bedeutet, dass selbst bei vollständiger Hemmung der Thromboxansynthese eine Thrombozytenaktivierung durch andere Stimuli nach wie vor möglich ist.

Ebenso könnte ein stimulierender Einfluss von ASS, Ibuprofen und Diclofenac auf die  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten in Betracht gezogen werden.

Für die beiden anderen untersuchten Medikamente, das Paracetamol und den selektiven COX-2-Hemmer Rofecoxib, konnten keine signifikanten Veränderungen für den Rezeptor P-Selektin nachgewiesen werden<sup>68</sup>.

Bei der Untersuchung des Rezeptors P-Selektin nach in-vitro-Stimulation der Thrombozyten mit ADP konnte nach der Einnahme von Diclofenac ein signifikanter Anstieg an Tag vier und sechs nachgewiesen werden.

In einer von A.M. Blaicher et al. veröffentlichten Studie<sup>69</sup> zeigte sich, im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, bei gesunden Probanden ein Abfall der CD 62 Expression nach Stimulation mit Arachidonsäure und Collagen 1h, 3h und 12h nach Einnahme von Aspirin und Diclofenac. Die selektiven COX-2 Hemmer hatten, wie in der hier vorliegenden Arbeit, keinen Einfluss auf die Expression des P-Selektins.

Die anderen untersuchten Medikamente hatten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Thrombozyten nach der in-vitro-Stimulation mit ADP.

Bei der Untersuchung des Rezeptors GP 53, markiert durch den Antikörper CD 63, ohne Stimulation durch ADP oder TRAP zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Rezeptors nach der Einnahme von Paracetamol an Tag 6. Der Rezeptor wurde also nach Einnahme von Paracetamol vermehrt aus den Lysosomen freigesetzt und in die Thrombozytenmembran integriert. Dies könnte für einen aktivierenden Einfluss von Paracetamol auf die Lysosomen des Thrombozyten sprechen. Hierzu findet sich in der gängigen Literatur kein Hinweis.

Ein ebenfalls signifikanter Anstieg des Rezeptors zeigte sich nach Einnahme von Diclofenac an Tag vier nach der dreitägigen Einnahme des Medikaments. Zu den

scheinbar aktivierenden Einflüssen auf Lysosomen der Thrombozyten sollten noch weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden.

Durch die anderen untersuchten Medikamente wurde die Expression des Rezeptors GP 53 nicht beeinflusst.

Auch nach einer in-vitro-Stimulation der Thrombozyten durch TRAP nach Einnahme von Diclofenac zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Rezeptors GP 53 auf der Thrombozytenoberfläche. Alle anderen untersuchten Medikamente hatten keinen signifikanten Einfluss auf die vorstimulierten Thrombozyten.

Bei der Untersuchung des Einflusses der Medikamente auf den Rezeptor GP IIb, markiert durch den Antikörper CD 41, präsentierte sich nach der in-vitro-Stimulation mit TRAP unter dem Einfluss von Paracetamol eine Verminderung der Rezeptorexpression an Tag vier. An den Tagen fünf und sechs stieg die Expression wieder auf den Ausgangswert an.

Auch der selektive COX-2 Hemmer Rofecoxib hatte auf die Expression des Rezeptors GP IIb einen signifikanten Einfluss. Es kam zu einer verminderten Expression des Rezeptors an Tag 6 nach dreitägiger Einnahme des Medikamentes.

Es zeigt sich ein selektiver Einfluss von Rofecoxib auf den Rezeptor GPIIb. Rofecoxib ist in der Lage bei Überdosierung in vitro auch die COX-1 zu hemmen<sup>70</sup>. Ein Einfluss der therapeutischen Dosis auf die Thrombozyten findet sich in der gängigen Literatur nicht.

Den aktivierten Rezeptorkomplex GP IIb/IIIa stellten wir in der Durchflusszytometrie mit dem Antikörper PAC-1 dar. Hier konnte ebenfalls ein Einfluss von Rofecoxib im Sinne einer verminderten Expression des GP IIb/IIIa auf der Thrombozytenmembran an Tag 6 nach dreitägiger Einnahme des Medikaments nachgewiesen werden.

Die hier aufgeführten Ergebnisse der Durchflusszytometrie sollten in größer angelegten Probandenkollektiven nachuntersucht werden. Dies war im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit nicht möglich.

## 4.2 PFA-100

Diese Methode gilt als ein Screeningtest zur Untersuchung von Thrombozytenfunktionsdefekten in der klinischen Praxis<sup>71 72</sup>. Die Messzelle des Gerätes simuliert den Prozess der Thrombozytenadäsion und – aggregation in vitro. Eine Membran, welche mit Kollagen/ADP oder mit Kollagen/Epinephrin benetzt ist, führt zur Anlagerung und Aktivierung der Thrombozyten. Folge ist eine Aggregatbildung, die zu einem Thrombozytenpfropf führt. Es kommt zur Verringerung des Blutflusses. Das Gerät ermittelt die Zeit vom Beginn des Blutflusses bis zum vollständigen Membranverschluss. Spannagel et al. zeigten eine hohe Sensitivität des PFA-100 für das von-Willebrand-Jürgens-Syndrom und für die Einnahme von Aspirin<sup>73</sup>.

Nach der dreimaligen Einnahme von ASS an Tag 1-3 zeigte sich in der PFA-Analyse ein deutlich signifikanter Anstieg der in vitro Blutungszeit an Tag 4-6, in den epinephrinbeschichteten Kapillaren. Die Blutungszeit war auf über 300 Sekunden angestiegen, also deutlich oberhalb der für diese Methode festgelegten Normgrenze von 165 Sekunden.

Dies bestätigt den Einfluss der Acetylsalicylsäure auf den Arachidonsäurestoffwechsel der Thrombozyten und die daraus resultierende Minderfunktion der Thrombozyten<sup>74</sup>.

Auch das Medikament Ibuprofen verlängerte zumindest an Tag 4 nach Einnahme die Blutungszeit signifikant<sup>75</sup>.

Nach der Einnahme von Paracetamol über drei Tage kam es ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Blutungszeit nach Messung mit den epinephrinbeschichteten Kapillaren an Tag 4 und 5, jedoch lagen diese beiden Anstiege noch innerhalb der Normgrenze von 165 Sekunden<sup>76</sup>.

Dennoch konnte ein gewisser Einfluss des Medikaments auf die Thrombozytenfunktion nachgewiesen werden, auch wenn dieser deutlich geringer ist als nach der Einnahme von ASS oder Ibuprofen.

Das Medikament Diclofenac zeigte eine signifikante Verlängerung der Blutungszeit bei ADP-beschichteter Kapillare an Tag 6 nach dreimaliger Einnahme<sup>77</sup>.

Für den selektiven COX-2-Hemmer Rofecoxib konnte keine Verlängerung der Blutungszeit nachgewiesen werden. Die Thrombozytenfunktion bleibt also unbeeinflusst durch dieses Medikament<sup>78</sup>, was eventuell einen Erklärungsansatz für das vermehrte Auftreten von Myokardinfarkten nach Einnahme von Rofecoxib darstellt. Dieses Medikament wurde aufgrund dieser thrombotischen Komplikationen aus dem Handel genommen.

Aus den Ergebnissen der PFA-Analyse zeigt sich also ein Einfluss auf die Blutungszeit nach den Medikamenten ASS, Ibuprofen und Diclofenac. Nach der Einnahme von Paracetamol konnte auch ein Anstieg der Blutungszeit nachgewiesen werden; dieser lag jedoch noch innerhalb der für diese Methode zugrunde gelegten Normzeit.

### 4.3 Aggregometrie

Durch die Methode der Aggregometrie konnte in dieser Arbeit ein signifikanter Einfluss auf die Menge der benötigten Stimulantia nach Einnahme von ASS gezeigt werden. An Tag vier nach Einnahme von ASS wurde ein signifikanter Anstieg der benötigten Menge ADP nachgewiesen, um eine vergleichbare Aggregationsreaktion der Thrombozyten zu erreichen, verglichen mit der Aggregationsreaktion ohne Einfluss von ASS. Für Epinephrin als Stimulans konnte dies sogar für die Tage 4-6 belegt werden. Für die anderen in dieser Arbeit verwendeten NSAIDs (Paracetamol, Diclofenac, Ibuprofen und Rofecoxib) konnte keine Veränderung im Aggregationsverhalten der Thrombozyten nachgewiesen werden<sup>79</sup>. Allerdings kann die parallele Einnahme von Paracetamol und Diclofenac den Einfluss von Diclofenac auf das Aggregationsverhalten verstärken<sup>80</sup>. Für die intramuskuläre Gabe von Diclofenac gibt es Daten, die einen Einfluss des Medikaments auf die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten dokumentieren<sup>81</sup>.

E.A.J. Knijff-Dutmer et al. konnten ebenfalls zeigen, dass spezifische COX-2-Hemmer keinen Einfluss auf das Aggregationsverhalten der Thrombozyten nehmen<sup>82</sup>.

## 4.4 Thrombelastographie

In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich ein Einfluss auf die Thrombelastographie, nämlich nach Einnahme von ASS, Diclofenac und Rofecoxib.

Im Gegensatz zu den Daten von Trentalange<sup>83</sup> verlängerte sich nach der Einnahme von ASS die R-Zeit signifikant, was einer Verlängerung der Zeit bis zum Beginn der plasmatischen Gerinnung entspricht und damit einem Einfluss von ASS auf dieselbe zeigt.

Ebenso verlängerte sich die K-Zeit unter dem Einfluss von ASS, was einer Verlangsamung der Koagelbildung entspricht. Auch die größtmögliche Festigkeit des Koagels (MA-Zeit) war unter dem Einfluss von ASS signifikant verändert.

Unter dem Einfluss von Diclofenac konnte eine Verzögerung bis zum Beginn der plasmatischen Gerinnung an Tag 5 im Sinne einer verlängerten R-Zeit, verglichen zur R-Zeit ohne Einnahme des Medikaments, nachgewiesen werden. Indes präsentierte sich die Koagelbildung sowie die Dauer bis zur größtmöglichen Koagelfestigkeit statistisch nicht signifikant verändert.

Diclofenac hat also Einfluss auf den Beginn der plasmatischen Gerinnung, nicht jedoch auf die Interaktion zwischen den Thrombozyten, wie z.B. die Aggregation oder auf den dafür notwendigen Rezeptor GP IIb/IIIa, was sich auch in den Ergebnissen der Aggregometrie oder der Durchflusszytometrie in dieser Arbeit widerspiegelt.

Nach der Einnahme von Rofecoxib zeigte sich eine Verlängerung der R-Zeit an Tag 4 im Vergleich zu den Zeiten ohne Einfluss eines Medikamentes. Rofecoxib beeinflusst also eventuell den Beginn der plasmatischen Gerinnung, nicht jedoch die Interaktion zwischen den Thrombozyten, wie z.B. die Aggregation. Dies belegen auch die hier erhobenen Daten.

Ebenso ist die Koagelbildung an Tag 4 unter dem Einfluss von Rofecoxib signifikant verlängert. An Tag fünf und sechs ist dies jedoch bereits nicht mehr nachweisbar. Auch die Dauer bis zum Erreichen der größtmöglichen Koagelfestigkeit zeigt sich unter dem Einfluss des selektiven COX-2 Hemmers verändert. Rofecoxib hat also

einen Einfluss auf die genannten Parameter, jedoch ist dieser, selbst nach einer dreitägigen Einnahme, nur von kurzer Dauer.

Aus den hier erhobenen Daten lässt sich folgende Empfehlung für den klinischen Alltag ableiten: Bei durch Blutungsneigung gefährdeten Patienten, z.B. aufgrund von Thrombozytopenien, empfiehlt sich der Einsatz von Paracetamol zur Schmerztherapie, um den Einfluss auf die Funktion der Thrombozyten möglichst zu minimieren. Sicherlich wären aus diesem Aspekt auch spezifische COX-2-Hemmer zu empfehlen, die jedoch derzeit aufgrund ihrer Nebenwirkungen in der Kritik stehen.

### **Beurteilung der Methoden:**

Ein Vorteil der Durchflusszytometrie ist die geringe Blutmenge, die zur Untersuchung notwendig ist, und eine geringe Stimulation der Thrombozyten bei der Vorbereitung zur Untersuchung. Ein weiterer Vorteil ist die genaue Aussage über die einzelnen Rezeptoren und Thrombozytenstörungen, die durch diese Methode erkennbar sind. Nachteile dieser Untersuchungsmethode sind andererseits die relativ hohen Kosten (Gerät, Antikörper) und die Notwendigkeit, auf erfahrene Labormitarbeiter zurückgreifen zu müssen, sowie das nur kurze Zeitfenster, in welchem die Proben bearbeitet werden müssen.

Die Vorteile der PFA-100-Analyse liegen zum einen in einer standardisierten in-vitro-Simulation der in-vivo auf die Thrombozyten einwirkenden Scherkräfte auf dem Weg durch eine Kollagen/Epinephrin oder Kollagen/ADP beschichteten Kapillare. Zum anderen kann das in zitratbeschichteten Vacutainern entnommene Blut bis zu fünf Stunden nach Abnahme noch verarbeitet werden. Außerdem ist das Gerät einfach in der Handhabung, und das Ergebnis liegt bereits nach wenigen Minuten vor. Es können parallel zwei Proben gemessen werden. Diese Vorteile machen den PFA-100 im klinischen Alltag gut anwendbar und sinnvoll, z.B. vor chirurgischen Eingriffen.

Die Nachteile der Aggregometrie sind der Zeitaufwand, die Notwendigkeit von erfahrem Laborpersonal und die komplizierte Aufbereitung der Blutproben. Darüber hinaus kann es zu einer möglichen Aktivierung der Thrombozyten durch die notwendige Zentrifugation der Blutprobe kommen. Außerdem ist die Methode abhängig von der jeweiligen Thrombozytenzahl des Patienten. Für den Nachweis der

verminderten Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten, vor allem nach Einnahme von ASS, ist die Aggregometrie jedoch gut geeignet.

Der Vorteil der Thrombelastographie ist die Möglichkeit, die Koagulation im Vollblut zu messen, sowie der seit vielen Jahren bestehende Einsatz dieser Methode im klinischen Alltag. Nachteil ist die Notwendigkeit einer schnellen Verarbeitung der Blutprobe nach deren Abnahme. Außerdem ist die richtige Interpretation der Thrombelastographie schwierig, und die Methode gilt als relativ unsensibel.

	ASS	Ibuprofen	Paracetamol	Diclofenac	Rofecoxib
Durchflusszytometrie	+	+	+	+	+
PFA-100	+	+	+	+	0
Aggregometrie	+	0	0	0	0
Thrombelastographie	+	0	0	+	+

*Tabelle 11: Zusammenfassende Tabelle der angewandten Methoden und der aufgetretenen Veränderungen der Thrombozytenfunktion nach Einnahme der untersuchten Medikamente. + statistisch signifikante Veränderungen; 0 = keine statistisch signifikanten Veränderungen.*

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit konnte anhand der aufgeführten Methoden folgenden Einfluss der untersuchten Medikamente auf die Thrombozytenfunktion nachweisen.

Nach dreitägiger Einnahme von Acetylsalicylsäure, Ibuprofen und Diclofenac zeigte sich in der Durchflusszytometrie eine erhöhte Expression des Thrombozytenoberflächenrezeptors P-Selektin ohne vorhergehende Stimulation der Thrombozyten durch ADP oder TRAP. Nach einer Stimulation mit ADP konnte nur noch ein signifikanter Anstieg des Rezeptors nach der Einnahme von Diclofenac nachgewiesen werden.

Die Medikamente Paracetamol und Diclofenac hatten Einfluss auf die Lysosomen in den Thrombozyten im Sinne einer signifikant vermehrten Expression des Glykoproteins GP 53 auf der Thrombozytenmembran. Nach einer zusätzlichen Stimulation durch TRAP war dieser Effekt nur nach der Einnahme von Diclofenac zu sehen.

Die Einnahme von Paracetamol und Rofecoxib beeinflusste das Glykoprotein GP IIb im Sinne einer verminderten Expression des GP IIb nach einer Stimulation durch TRAP. Eine verminderte Expression des aktivierten Glykoproteinkomplexes GP IIb/IIIa konnte nach der Einnahme von Rofecoxib nachgewiesen werden.

Die in-vitro-Blutungszeit, gemessen mit dem PFA-100, wurde durch die Einnahme des selektiven COX 2-Hemmers Rofecoxib nicht beeinflusst. Bei dieser Untersuchungsmethode zeigte sich ein Einfluss auf die Blutungszeit durch die Medikamente Acetylsalicylsäure, Ibuprofen und auch Paracetamol in den Collagen/Epinephrin Cartridges. In den Collagen/ADP Cartridges konnte ein Einfluss auf die Blutungszeit nur noch nach der Einnahme von Diclofenac nachgewiesen werden.

In der Aggregometrie zeigte sich der Einfluss auf die Thrombozytenfunktion nach Einnahme von Acetylsalicylsäure, nicht jedoch nach Einnahme der anderen NSAIDs oder des selektiven COX-2 Inhibitors Rofecoxib.

In der Thrombelastographie zeigten sich Verlängerungen der R-Zeit nach der Einnahme von Acetylsalicylsäure, Diclofenac und Rofecoxib. Dies belegt den Einfluss der Medikamente auf den Beginn der plasmatischen Gerinnung. Die K-Zeit, also die Koagelbildung, war durch Acetylsalicylsäure und Rofecoxib verlängert. Die MA-Zeit, ein Wert für die Festigkeit des ausgebildeten Koagels war nach der Einnahme von Acetylsalicylsäure und Rofecoxib beeinträchtigt.

Acetylsalicylsäure nimmt Einfluss auf die Expression des Rezeptors P-Selektin, nachgewiesen in der Durchflusszytometrie. Außerdem verlängert sich durch die Wirkung der ASS die Blutungszeit signifikant. Die Aggregation und die Koagelbildung sind ebenfalls durch ASS gehemmt.

Ibuprofen verstärkt die Expression des Rezeptors P-Selektin, nachgewiesen in der Durchflusszytometrie. Die Blutungszeit wird jedoch durch Ibuprofen signifikant verlängert. In der Aggregometrie und der Thrombelastographie konnte kein Einfluss nachgewiesen werden.

Paracetamol nimmt Einfluss auf die Lysosomen in Form einer vermehrten Expression der Oberflächenrezeptoren sowie auf GP IIb im Sinne einer verminderten Expression des Oberflächenrezeptors. Die Blutungszeit war ebenfalls, allerdings nur innerhalb der Norm verlängert. Auf die Aggregation oder die Thrombelastographie hat Paracetamol keinen Einfluss.

Diclofenac verändert die Thrombozytenfunktion im Sinne eines Anstiegs der Oberflächenrezeptoren P-Selektin und GP 53 aus den Lysosomen. Dennoch verlängert es die Blutungszeit signifikant. Auf die Aggregometrie hat Diclofenac keinen Einfluss.

Rofecoxib hat trotz der verminderten Expression des GP IIb/IIIa keinen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion hinsichtlich der Aggregation oder der Blutungszeit. In der Thrombelastographie zeigt sich eine Verlängerung der R- und K-Zeit und eine Beeinträchtigung der maximalen Amplitude.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Medikamente zeigten einen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion. Den geringsten Einfluss auf die Thrombozytenfunktion hatte der selektive COX-2-Hemmer Rofecoxib und das nichtsteroidale Antiphlogistikum Paracetamol, sodass eine Schmerztherapie bei blutungsgefährdeten Patienten, insbesondere bei thrombopenischen Patienten, mit einem Medikament dieser Wahl erfolgen sollte.

Beim Vergleich der hier angewandten Methoden muss angemerkt werden, dass wahrscheinlich im klinischen Alltag der Platelet function Analyser 100 und die Aggregometrie als wegweisende Methoden für die Entdeckung eventueller Blutungsstörungen nach Einnahme von nichtsteroidalen Antiphlogistika die Methoden der Wahl sind. Die Thrombelastographie ist aufgrund der Dauer bis zu einem Ergebnis zu langsam, und aus den Veränderungen in der Durchflusszytometrie lassen sich nicht zwangsläufig Thrombozytenfunktionsstörungen ableiten, die zu veränderten Blutungsneigungen führen könnten. Ausserdem ist die Durchflusszytometrie auch die aufwendigste der hier durchgeführten Methoden.

In der Zusammenschau ist also dem PFA-100, und in zweiter Linie der Aggregometrie, der Vorzug in der Untersuchung der Thrombozytenfunktion - nach Einnahme von nichtsteroidalen Antiphlogistika - hinsichtlich einer Aussage über eine eventuelle Blutungsgefahr zu geben.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater Professor Dr. E. Hiller und meinem Betreuer PD. Dr. R. Pihusch für ihre geduldige Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die unermüdliche und geduldige Unterstützung während der ganzen Zeit, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Besonderer Dank gilt Frau B. Reinhard, die durch ihre engagierte und selbstlose Arbeit im Labor wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und den Probanden bedanken: für die Motivation, die Unterstützung und bei den Probanden für ihren selbstlosen Einsatz, die zur Vollendung dieser Arbeit notwendig waren.

## Literaturverzeichnis und Anhang

---

- <sup>1</sup> Wolfe LS. Eicosanoids: Prostaglandins, Thromboxanes, Leukotrienes and other derivatives of carbon-20 unsaturated fatty acids. *J Neurochem* 38, 1-14
- <sup>2</sup> Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic acid metabolism. *Ann Rev Biochem* 1986 55, 69-102
- <sup>3</sup> Shimizu T, Wolfe LS. Arachidonic acid cascade and signal transduction. *J Neurochem* 1990, 5, 1-15
- <sup>4</sup> Shimizu T, Wolfe LS. Arachidonic acid cascade and signal transduction. *J Neurochem* 1990, 5, 1-15
- <sup>5</sup> Funk CD. Prostaglandins and Leukotrienes Advances in eicosanoid biology. *Science* 2001, 294, 1871-1875
- <sup>6</sup> Vane JR. Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs. *Nature New Biol* 1971 231, 232-235
- <sup>7</sup> Meade EA, Smith WL, deWitt DL. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (Cyclooxygenase) isoenzymes by Aspirin and other non-steroidal-anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1993, 268, 6610-6614
- <sup>8</sup> Fitzgerald GA, Patrono C. The Coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2 *N Engl J Med* 2001, 345, 433-445
- <sup>9</sup> Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic acid metabolism. *Ann Rev Biochem* 1986 55, 69-102
- <sup>10</sup> Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci* 1993 (90), 11693-11697
- <sup>11</sup> Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996 (87): 4925-4936
- <sup>12</sup> Gordon N, Thom J, Cole C, Baker R. Rapid detection of hereditary and acquired platelet storage pool deficiency by flow cytometry. *Br J Haematol* 1995 (89):117-123

- 
- <sup>13</sup> Wall JE, BuijsWilts M, Arnold JT, Wang W, White MM, Jennings LK, Jackson CW. A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents. *Br J Haematol* 1995 (89): 380-385
- <sup>14</sup> Gawaz MP, Bogner C, Gurland HJ. Flow-cytometric analysis of mepacrine-labelled platelets in patients with end-stage renal failure. *Haemostasis* 1993 (23): 284-292
- <sup>15</sup> Davies TA, Drotts D, Weil GJ, Simons ER. Flow cytometric measurements of cytoplasmic calcium changes in human platelets. *Cytometry* 1988 (9): 138-142
- <sup>16</sup> Lopez JA. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Blood Coagulation Fibrinolysis* 5 (1994) 97-119
- <sup>17</sup> Bernedt MC, Gregory C, Karal A, Zola H, Heddle NM, Fournier D, Castaldi PA. Purification and preliminary characterization of the glycoprotein Ib complex in the human platelet membrane. *Eur J Biochem* 1985 151: 637-649
- <sup>18</sup> Ruggeri ZM. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in the initiation of platelet adhesion to thrombogenic surfaces. *Thromb Haemost* 74 1995 460-463
- <sup>19</sup> Beer JH, et al. Plättchenrezeptoren : Nomenklatur-Struktur-Funktion. *Schweiz Med Wochenschrift* 122, 1992, (34) :1249-1263
- <sup>20</sup> Pidard D, Montgomery RR, Bennett JS, Kunicki TJ. Interaction of AP-2, a monoclonal antibody specific for the human platelet glycoproteins IIb/IIIa complex, with platelets. *J. Biol. Chem* 1983 258 :12582-12586
- <sup>21</sup> Woods VL, Wolff LE, Keller DM. Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb/IIIa complex, which may be accessible to some but not other extracellular proteins. *J Biol Chem* 1986; 1553-1558
- <sup>22</sup> Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1988;71:831-843
- <sup>23</sup> Marguerie GA, Plow EF, Edington TS. Human platelets possess an inducible and saturable receptor of fibrinogen. *J Biol Chem* 1979 245 :5357-5367
- <sup>24</sup> Plow EF, Pieschacher MD, Rouslathi E, Marguerie GA. The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and the von Willebrand factor binding to platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985 82 :8057-8061

- 
- <sup>25</sup> Parise LV, Philips DR. Fibronectin-binding properties of the purified platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. *J Biol Chem* 1986 261 :14011-14017
- <sup>26</sup> Mohri H, Ohukubo T. How vitronectin binds to activated glycoprotein IIb/IIIa complex and its function in platelet aggregation 1991 *Am J Clin Pathol* 96 :605-609
- <sup>27</sup> Plow EF, Pieschacher MD, Rouslathi E, Marguerie GA. The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and the von Willebrand factor binding to platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985 82 :8057-8061
- <sup>28</sup> Karczewski J, Kundsén KA, Smith L, Murphy A, Rothman VL, Tuszynski G. The interaction of thrombospondin with platelet glycoprotein gp IIb/IIIa. 1989 *J Biol Chem* 264 :21322-2132
- <sup>29</sup> Henn V, Sulpsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, KroczeK RA. CD 40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. 1998 *Nature* 391, 591-594
- <sup>30</sup> Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow W, Pober JS. CD 40 on human endothelial cells : inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. 1995 *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 4342-4346
- <sup>31</sup> Henn V, Sulpsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, KroczeK RA. CD 40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. 1998 *Nature* 391, 591-594
- <sup>32</sup> Collier BS, Beer JH, Scudder LE, Steinberg MH. Collagen-platelet interactions: evidence for a direct interaction of collagen with platelet GP Ia/IIa and an indirect interaction with platelet GP IIb/IIIa mediated by adhesive proteins. 1989 *Blood* 74 :182-192
- <sup>33</sup> Gianotti FG, Languino LR, Zanetti A, Peri G, Tarone G, Dejana E. Platelets express a membrane protein complex immunologically related to the fibroblast fibronectin receptor and distinct from GP IIb/IIIa. 1987 *Blood* 69: 1535-1538
- <sup>34</sup> Sonnenberg A, Modderman PW, Hogervorst F. Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6. *Nature* 1988 ;336 :487-489
- <sup>35</sup> Santoro SA, Rajpara SM, Staatz MD, Woods VL. Isolation and characterization of a platelet surface collagen binding complex related to VLA-2. 1988 *Biochem Biophys Res Commun* 153 :217-223

- 
- <sup>36</sup> Piotrowicz RS, Orzechowski RP, Nugent DJ, Yamada KY, Kunicki TJ. Glycoprotein Ic-IIa functions as activation independent fibronectin receptor on human platelets. 1988 *J Cell Biol* 106 :1359-1364
- <sup>37</sup> Keherl B, Balleisen L, Kokott R, Mesters R, Stenzinger W, Clementson KJ, van de Loo J. Thrombospondin binds normally to glycoprotein IIb deficient platelets. 1991 *Biochem Biophys Res Commun* 197 :985-991
- <sup>38</sup> E.Hiller, H. Riess *Hämorrhagische Diathese und Thrombose*, 3. Auflage, S.98
- <sup>39</sup> Larsen E, Palabrica T, Sajer S, Gilbert GE, Wagner DD, Furie BC, Furie B. PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III 8CD15. 1990 *Cell* 63 :467-474
- <sup>40</sup> Erbe DV, Watson R, Prestal LG, Wolitky BA, Foxall C, Brandley BK, Lasky LA. P- and E-selection in use common sites for carbohydrate ligand recognition and cell adhesion. 1993 *J Cell Biol* 120 :1227-1235
- <sup>41</sup> Sanders WE, Wilson RW, Ballantyne CM, Beaudet AL. Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. 1992 *Blood* 80 (3) :795-800
- <sup>42</sup> Metzelaar MJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK. Detection of platelet activation using activation specific monoclonal antibodies. 1990 *Blood Cells* 16 (1) :85-93, discussion 93-96
- <sup>43</sup> Azorosa DO, Hidreth JEK. CD 63 cluster report workshop. *Leucocyte Typing 1995* Oxford University Press 1352-1353
- <sup>44</sup> Berdichevski F, Bazzon G, Hemler ME. Specific association of CD63 with VLA-3 and VLA-6 integrins. 1995 *J Biol Chem* 270 (30) :17784-17790
- <sup>45</sup> Nieuwenhuis HK, van Oosterhout JJG, Rozenmuller E, van Iwaarden F, Sixma JJ. Studies with a monoclonal antibody against activated platelets ; evidence that a secreted 50.000 molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in circulation. 1987 *Blood* 70 : 838-845
- <sup>46</sup> Carmo AM, Wright MD. Association of the transmembrane 4 superfamily molecule cd53 with tyrosine phosphatase activity. 1995 *Eur J Immunol* 25(7) :2090-2095
- <sup>47</sup> Metzelaar MJ, Wnjgaard PLJ, Peters PJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK, Clevers HC. CD 63 antigen - a novel lysosomal membrane glycoprotein cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. 1991 *J Bio Chem* 266 :3239-3245

- 
- <sup>48</sup> Heptinstall S, Sanderson HM, Glenn JR, Storey RF, Lösche W. Dose occupation of the P2T receptor on platelets by ADP lead to a reduced rate of Ca<sup>2+</sup> reuptake following Ca<sup>2+</sup> liberation of the P2Y receptor, and is this mediated by a fall of basal cAMP ? 1999 Throm Haemost Suppl. Aug. 1999 :355 Abstr. 1128
- <sup>49</sup> Jin J, Kunapuli SP. Co-activation of P2Y1 and P2T2AC receptors and subsequent platelet aggregation are essential for a ADP-induced thromboxane A 2 generation in human platelets. Thromb Haemost Suppl. 1999 :444 Abstr. 1404
- <sup>50</sup> Reimers HJ, Longenecker GL. Adenine nucleotides in blood platelets 1985 The platelets: physiology and pharmacology. Academic, Orlando, 85
- <sup>51</sup> Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P-purinoceptor? Gen Pharmacol 1985 5, 433-440
- <sup>52</sup> Dubyac GR, El Moatassim C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. Am J Physiol 1993 265 :C577-C606
- <sup>53</sup> Brass LF, Vassallo RR, Belmonte E, Ahuja M, Cichowski K, Hoxie JA. Structure and function of the human platelet thrombin receptor. 1992 J Biol Chem 267, 20, 13795-113798
- <sup>54</sup> Brass LF, Pizzaro S, Ahuja M, Belmonte E, Blanchard N, Stadel JM, Hoxie JA. Changes in the structure and function of the human thrombin receptor during receptor activation, internalisation and recycling. 1994 J Biol Chem 269, 4, 2943-2952
- <sup>55</sup> Abrams C, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. Blood 75:128-138, 1990
- <sup>56</sup> Abrams CS, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders, Thromb and Hemostasis 65: 467-473
- <sup>57</sup> Li N, Goodall AH, Hjerdahl P. A sensitive flow cytometric assay for circulating platelet-leucocyte aggregates. Br J of Hematology 99: 808-816
- <sup>58</sup> Marti GE, Magruder L, Schuette W, Gralnick HR. Flow cytometric analysis of platelet surface antigens. Cytometry 9: 448-455, 1988
- <sup>59</sup> Michelson AD. Flow cytometry A clinical test of platelet function. Blood 87: 4925-4936, 1996
- <sup>60</sup> Redlich H, Vickers J, Loesche W, Heptinstall S, Kehrl B, Spangenberg P. Formation of platelet-leucocyte conjugates in whole blood. Blood 96: 170-175, 1997

- 
- <sup>61</sup> Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. Endothelial function and hemostasis. *Zeitschrift für Kardiologie* 89: 160-167, 2000
- <sup>62</sup> Hoffmann M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thrombosis and hemostasis* 85: 958-965, 2001
- <sup>63</sup> Mannaioni PF, Di Bello MG, Masini E. Platelets and inflammation: Role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflammation Research* 46:4-18, 1997
- <sup>64</sup> Abrams C, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood* 75:128-138, 1990
- <sup>65</sup> Gaetano G, Cerletti C, Evangelista V. Recent advances in platelet-polymporphnuclear leucocyte interaction. *Haemostasis* 29: 41-49, 1999
- <sup>66</sup> Cerletti C, Evangelista V, Molino M, De gaetano G. Platelet activation by polymorphonuclear leucocytes. *Thromb and hemost* 74: 218-223, 1995
- <sup>67</sup> Weber AA, Zimmermann KC, Meyer-Krichrath J, Schrör K. Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *Lancet* 1999, 353: 900
- <sup>68</sup> Blaicher AM, Landsteiner HT, Al-Falaki O, Zwerina J, Volf I, Gruber, Zimpfer M, Hoeruaf K. Acetylsalicylic acid, diclofenac and lornoxicam, but not rofecoxib affect platelet CD62 expression. *Anesth Analg* 2004; 98:1082-5
- <sup>69</sup> Blaicher AM, Landsteiner HT, Al-Falaki O, Zwerina J, Volf I, Gruber, Zimpfer M, Hoeruaf K. Acetylsalicylic acid, diclofenac and lornoxicam, but not rofecoxib affect platelet CD62 expression. *Anesth Analg* 2004; 98:1082-5
- <sup>70</sup> Homoncik M, Malec M, Marsik C, Sycha T, Anzenhofer S, Gustorff B, Jilma B. Rofecoxib exerts no effect on platelet plug formation in healthy volunteers. *Clin Exp Rheumatol* 03-04/2003;21(2):229-31
- <sup>71</sup> Francis JL. Clinical experience with the platelet function analyser (PFA)-100: *Blood* 94 (suppl. 1, part. 1): 3513, 1999
- <sup>72</sup> Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Ostgaard RA. Characterization of an in vitro platelet function analyser, PFA-100: *Clinical an applied Thromb and Hemost* 2: 241-249, 1996
- <sup>73</sup> Spannagel M, Schramm W. Hämostaseologie-rationale Diagnostik. *Der Internist* 40: 657-665, 1999

- 
- <sup>74</sup> Homoncik M, Gilma B, Hergovich N, Stohlawetz P, Panzer S, Speiser W. Monitoring of aspirin (ASA) pharmacodynamics with the platelet function analyzer PFA-100. *Thromb and Haemost* 2000 Feb; 83(2):316-21
- <sup>75</sup> Slappendel R, Weber EW, Benraad B et al. Does ibuprofen increase perioperative blood loss during hip arthroplasty? *Eur J Anesthesiol* 2002;19:829-31
- <sup>76</sup> Niemi TT, Backman JT, Syrjala MT, Viinikka LU, Rosenberg PH. Platelet dysfunction after ketorolac or propacetamol *Acta Anaesthesiol Scand*. 2000; 44: 69-74
- <sup>77</sup> Blaicher AM, Landsteiner HAT, Zwerina J, Leitgeb U, Volf I, Hoerauf K. Effect of non-selective, non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 selective inhibitors on the PFA-100 closure time. *Anaesthesia* 2004 Nov;59(11):1100-3
- <sup>78</sup> Homoncik M, Malec M, Marsik C, Sycha T, Anzenhofer S, Gustorff B, Gilma B. Rofecoxib exerts no effect on platelet plug formation in healthy volunteers. *Clin Exp Rheumatol* 03-04/2003;21(2):229-31
- <sup>79</sup> Leese PT, Hubbard RC, Shawn SY. Effects of celecoxib, a novel cyclooxygenase-2 inhibitor, on platelet function in healthy adults: A randomized, controlled trial, *Journal of clinical Pharmacology*, 2000; 40: 124-132
- <sup>80</sup> E. Munsterhjelm, Niemi TT, Syrjälä MT, Ylikorkala, Rosenberg PH. Propacetamol augments inhibition of platelet function by diclofenac in volunteers *British Journal of Anaesthesia* May 2003; 91: 357-62
- <sup>81</sup> Power I, Chambers WA, Greer IA, Ramage D, Simon E. Platelet function after intramuscular diclofenac *Anaesthesia* 1990 Nov; 45(11):916-9
- <sup>82</sup> E.A.J. Knijff-Dutmer, Kalsbeek-Batenburg EM, Koerts J, van d Laar MA. Platelet function is inhibited by non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs but not by cyclooxygenase-2-selective inhibitors in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2002 Apr.;41(4):458-461
- <sup>83</sup> Trentalange MJ, Walts LF. A comparison of thrombelastogram and template bleeding time in the evaluation of platelet function after aspirin *J Clin Anesth* 1991 September; 3: 377-

---

### **Curriculum vitae**

Name: Stephan, Florian Brandl  
Adresse: Eppendorfer Landstraße. 24, 20249 Hamburg  
Geburtsdatum / -ort: 27. Juli 1974, Stuttgart  
Familienstand: Ledig  
Nationalität: Deutsch

#### Schulbildung:

1981-1983 Grundschule in Bischofsheim bei Frankfurt am Main  
1983-1985 Grundschule in Gauting bei München  
1985-1994 Otto-von-Taube-Gymnasium in Gauting  
Abschluss: Abitur

#### Berufsausbildung:

9/94-2/97 Ausbildung zum Bankkaufmann bei der Bayerischen Vereinsbank in München

#### Hochschulausbildung:

3/97 Beginn des Humanmedizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität, München  
3/99 Physikum  
3/00 1. Staatsexamen  
2/02 2. Staatsexamen  
04/02-07/02 1. Pj-Tertial im Fach Chirurgie  
Abteilung für Plastische-, Hand-, und Mikrochirurgie, Klinikum Großhadern, Prof. Dr. Dr. h. c. F.-W. Schildberg  
08/02-11/02 2. Pj-Tertial im Fach Anästhesie/Intensivmedizin  
Kantonspital Chur, Dr. med. T. Sieber, Prof. Dr. med. A. Frutiger  
12/02-03/03 3. Pj-Tertial im Fach Innere Medizin

---

	Hämatologie/Onkologie, Medizinische Klinik und Poliklinik III, Klinikum Großhadern, Prof. Dr. med. W. Hiddemann
6/03	3. Staatsexamen
11/03-11/04	Arzt im Praktikum, Universitätsklinikum Eppendorf, Medizinische Klinik II, Onkologie/Hämatologie, Prof. Dr. med. D. K. Hossfeld
seit 12/04	Assistenzarzt, Universitätsklinikum Eppendorf, Medizinische Klinik II, Onkologie/Hämatologie, Prof. Dr. med. C. Bokemeyer

Studienbegleitende Tätigkeiten:

8/99	Famulatur in der Kardiologie im Krankenhaus Bogenhausen, München
8/00	Famulatur in der internistischen Notaufnahme im Klinikum Großhadern
3-4/01	Famulatur in der Hämato-Onkologie Klinikum Großhadern
8/01	Famulatur im Department of Leukemia, MD Anderson Cancer Center, Houston/Texas