

# **Untersuchungen über den Einfluß des synthetischen Thrombininhibitors Argatroban auf isolierte Gefäße**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor medicinae**

(Dr. med.)

vorgelegt dem Wissenschaftlichen Rat der  
Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Hans-Martin Schrödter,

geboren am 18.10.1968 in Köthen

## Gutachter

1. Prof. Dr. Glusa, Jena/Erfurt
2. Prof. Dr. Fleck, Jena
3. Prof. Dr. Matthias, Gießen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.05.2002

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
2.	Material und Methode.....	8
2.1.	Substanzen.....	8
2.2.	Plättchenreiches Plasma (PRP).....	10
2.2.1.	Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP) und plättchenfreiem Plasma (PFP).....	10
2.3.	Bestimmung der Gerinnungszeit.....	10
2.4.	Untersuchung an isolierten Gefäßen.....	11
3.	Ergebnisse.....	15
3.1.	In-vitro-Untersuchungen an isolierten Gefäßen.....	15
3.2.	Ex-vivo-Untersuchungen mit N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) zur Funktion des Endothels.....	18
3.3.	In-vitro-Untersuchungen mit L-Arginin und Argatroban.....	22
3.4.	Ex-vivo Untersuchungen mit Argatroban.....	31
4.	Diskussion.....	38
5.	Zusammenfassung.....	47
6.	Literatur.....	49

# **Untersuchungen über den Einfluß des synthetischen Thrombininhibitors Argatroban auf isolierte Gefäße**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß des synthetischen Thrombininhibitors Argatroban auf isolierte Gefäßringe von Kaninchen untersucht.

Um die Effekte von Argatroban zu beurteilen, sollten zunächst grundsätzliche Gefäßreaktionen an Gefäßpräparaten der A. carotis von Kaninchen geprüft werden.

Zunächst wurde untersucht, ob an den Gefäßringen durch Acetylcholin eine endothelabhängige Relaxation ausgelöst wird und ob diese durch den Cyclooxygenaseinhibitor Indometazin beeinflusst wird. In weiteren Versuchen wurde die NO-Synthese durch die NO-Synthase-Hemmer L-NAME und L-Glutamin blockiert, um eine Vermittlung der Acetylcholin-induzierten Relaxation durch NO nachzuweisen. Außerdem wurde der Einfluß von L-NAME auf die durch  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und Phe hervorgerufenen Kontraktionen untersucht.

Aus zahlreichen experimentellen Untersuchungen ist bekannt, daß L-Arginin als Substrat der NO-Synthase insbesondere an geschädigten Gefäßen zu einer endothelabhängigen Relaxation führt.

In weiteren Versuchen wurde deshalb in vitro die Wirkung von L-Arginin auf die kompetitive Hemmung der NO-Synthase durch L-NAME bzw. L-Glutamin untersucht.

Der selektive synthetische Thrombininhibitor Argatroban ist eine Arginin enthaltende Verbindung, somit liegt nahe, das Argatroban über die Bereitstellung des Stickstoffs der terminalen Guanidinogruppe zu einer endothelabhängigen Relaxation führen könnte.

In vitro als auch z.T. in vivo Versuchen wurde der Einfluß von Argatroban auf die durch Phe, 5-HT, Arachidonsäure und PRP-Lysat hervorgerufenen Kontraktionen sowie der Einfluß von Argatroban auf die durch Acetylcholin-induzierte Relaxation geprüft.

In abschließenden Versuchen wurde die Wirkung von Argatroban auf die verminderte Acetylcholin-induzierte Relaxation durch L-NAME untersucht.

Um die Wirkung von Argatroban als Thrombininhibitor nachzuweisen, wurden während der Versuche über einen arterieller Katheter in der A. femoralis vor sowie nach Injektion von Argatroban über eine Ohrtrandvene Blutproben entnommen.

## 1. Einleitung

Herz-Kreislaufkrankungen stehen in den Industrienationen als Todesursache an erster Stelle. Ursächlich dafür ist die mit zunehmendem Wohlstand einhergehende Hyperalimentation und die damit verbundene Zunahme von Stoffwechselerkrankungen wie dem Diabetes mellitus und Dyslipoproteinämien. Letztere führen insbesondere über einen Anstieg der Low-Density-Lipoproteins (LDL) zu einer Störung der rückkopplungskontrollierten rezeptorvermittelten Aufnahme dieser Partikel. LDL werden dadurch vermehrt in der Intima der Gefäße abgelagert, wo sie durch Sauerstoffradikale, die von Makrophagen freigesetzt werden, oxidiert werden. Nach und nach entsteht ein Atherom dessen zentrale Nekrose sich zunehmend ausdehnt und schließlich eine Endothelschädigung herbeiführt (Riede et al., 1989).

Dem Endothel, das als Grenzschicht zwischen strömendem Blut und Gefäßwand zahlreiche Funktionen besitzt, wurde in den letzten Jahren wachsendes Interesse in der Forschung entgegengebracht. Durch die Freisetzung lokaler chemischer Botenstoffe, wie verschiedener Arachidonsäuremetaboliten, Thrombinantagonisten (z.B. Heparansulfat, Thrombomodulin) und Fibrinolytika (tPA), hat das Endothel einerseits einen Einfluß auf die Hämostase (Schrör & Hohlfeld, 1990). Andererseits kontrolliert das Endothel den Stoffaustausch zwischen dem intra- und extrazellulären Raum, die akuten und chronischen Entzündungsreaktionen sowie immunologische Prozesse. Insbesondere ist auch auf die Rolle des Endothels bei der Regulation des lokalen Gefäßtonus hinzuweisen (Busse, 1989). Die Einstellung des lokalen Gefäßtonus, als ein äußerst komplexes Geschehen, kann grundsätzlich durch zwei unterschiedliche Mechanismen hervorgerufen werden. Zum einen ist das Endothel Angriffspunkt verschiedener im Blut zirkulierender vasoaktiver Stoffe, wie der vasokonstriktorisches Substanzen Serotonin, Noradrenalin, Prostaglandine, Angiotensin, Arachidonsäure u.a. und der vasodilatativen Substanzen Adenosin-5'-diphosphat (ADP), Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Acetylcholin, Bradykinin u.a. (Gillis & Pitt, 1982). Zum anderen synthetisiert und setzt das Endothel selber vasoaktive Substanzen frei, wie z.B. verschiedene Prostaglandine und den endothelium-derived relaxant factor (EDRF) frei (Pearson & Gordon, 1985; Bassenge & Busse,

1988). EDRF wurde erstmals 1980 als ein vom Endothel gebildeter labiler Faktor mit relaxierender Wirkung auf die glatten Gefäßmuskelzellen beschrieben (Furchgott & Zawadzki, 1980). Einige Jahre später wurde die Vermutung geäußert, daß EDRF mit Stickstoffmonoxid (NO) identisch sei (Furchgott, 1988; Ignarro et al., 1988). 1987 wiesen Palmer et al. die Freisetzung von NO aus kultivierten Endothelzellen nach. Den Stickstoff für die endotheliale NO-Synthese liefert dabei die terminale Guanidinogruppe des cytoplasmatisch gespeicherten L-Arginins (Palmer et al., 1988; Schmidt et al., 1988). Die chemische Reaktion von Arginin zu Citrullin und NO wird durch die NO-Synthase katalysiert (Cooke & Tsao, 1993). Derzeit werden insgesamt drei Isoenzyme, davon zwei konstitutive (NO-Synthase I in Nervenzellen, NO-Synthase III in Endothelzellen) und eine induzierbare (in allen Körperzellen - insbesondere Monozyten/Makrophagen und Hepatozyten) unterschieden (Förstermann et al., 1994; Nathan, 1992; Pfeilschifter et al., 1996). Während die Regulation der konstitutiven NO-Synthase durch eine Beeinflussung der Enzymaktivität erfolgt, ist die Regulation der induzierbaren NO-Synthase von der Rate der Enzymneubildung abhängig (Nathan, 1992; Pfeilschifter et al., 1996). Dies erklärt sich dadurch, daß das als Cofaktor des Enzyms benötigte Calmodulin im Gegensatz zu der konstitutiven NO-Synthase bei der induzierbaren fest im Enzymmolekül integriert ist. Somit ist die induzierbare NO-Synthase, mit Ausnahme der induzierbaren NO-Synthase in humanen Hepatozyten, unabhängig von der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration (Geller et al., 1993; Förstermann et al., 1994). Die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase III kann durch unterschiedlichste Mechanismen ausgelöst werden, z.B. durch verschiedene hydromechanische Stimuli, wie die durch das Strömen des Blutes in longitudinale Richtung hervorgerufene Scherkraft), durch die Herzaktion hervorgerufenen Dehnungs- und Entdehnungsreize und dem  $pO_2$  im Blut (Bassenge & Heusch, 1990; Melkumyants et al., 1987; Pohl et al., 1986; Rubanyi et al., 1986; Stafforini et al., 1987; Pohl et al., 1986; Smiesko et al., 1985; Busse, 1989; 1991). All diese genannten Faktoren tragen mit zu einer basalen NO-Freisetzung bei (Griffith et al., 1984; Rubanyi et al., 1985).

Die Signaltransduktion, die zur NO-Synthese in den Endothelzellen führt, ist bei den verschiedenen Agonisten unterschiedlich. Die durch Acetylcholin hervorgerufene NO-Freisetzung setzt die Bindung an  $M_1$ -Rezeptoren voraus, die unter Vermittlung von G-

Proteinen eine Aktivitätssteigerung der an der Membranınnenseite lokalisierten Phospholipase C zur Folge hat. Dieses Enzym spaltet Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) (Botting & Vane, 1989). Durch das kurzlebige IP<sub>3</sub> kommt es über eine Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, die eine Aktivitätssteigerung der NO-Synthase bewirkt (Rapoport, 1986; Lückhoff & Busse, 1986; Nathan, 1992; Pfeilschifter et al., 1996). Die EDRF-Freisetzung erfolgt vorwiegend abluminal, wo EDRF in physiologischen Konzentrationen über eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase einen cGMP Anstieg bewirkt (Angus & Cocks, 1989; Greenberg & Diecke, 1988; Griffith et al., 1984; Schmidt et al., 1993; Förstermann et al., 1984; 1986; Mülsch et al., 1987). cGMP führt über Proteinkinasen in den glatten Gefäßmuskelzellen zu einer Relaxation (Twort & van Bremen, 1988; Rapoport & Murad, 1983; Nathan, 1992). Luminal bewirkt EDRF eine Zunahme des cGMP im Zytosol von Thrombocyten, die sich im Randstrom des Blutgefäßes befinden, über eine Reduzierung der intracellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration eine Hemmung der Plättchenadhäsion und -aggregation (Azuma et al., 1986; Furlong et al., 1987; Hogan et al., 1988; Mülsch et al., 1987; Schmidt & Walter, 1994; Schmidt et al., 1993). Neben dieser Kurzzeitregulation des Vasotonus und der Hämostase besitzt NO auch eine Langzeitwirkung. NO reagiert direkt mit Lipid-Peroxyradikalen, hemmt die makrophagenvermittelte Oxidation von LDL, wirkt antiproliferativ, antimigrativ auf Intimazellen und glatte Gefäßmuskelzellen und damit antiatherogen (Bode-Böger et al., 1997; Cohen, 1995; Hare & Colucci, 1995; Kelly et al., 1996). Somit ist NO eines der wichtigsten protektiven Systeme der Gefäßwand. Bei Hypercholesterinämie wird u.a. durch die vermehrte Bildung von Lipidperoxyradikalen, die Bildung von Superoxidradikalen im Endothel und endogener kompetitiver NO-Synthase-Inhibitoren wie dem asymmetrischen Dimethylarginin (ADMA) dieses System gestört (Ohara et al., 1993; Mügge et al., 1994; Bode-Böger et al., 1997). So wurde bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit und selbst bei jungen Patienten mit asymptomatischer Hypercholesterinämie ein Anstieg der ADMA-Plasmakonzentration gemessen (Böger et al., 1997; Bode-Börger et al., 1997). Auch an Cholesterin-gefütterten Kaninchen ließ sich ein Anstieg nachweisen (Bode-Börger et al., 1996).

Experimentell ließ sich durch andere kompetitive Hemmer der NO-Synthase, wie N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) oder N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) sowohl in vitro als auch in vivo durch die gehemmte EDRF-Freisetzung ein erhöhter Gefäßtonus hervorrufen (Ress et al., 1990). So wiesen Vallance et al. (1989) nach Infusion von L-NMMA in die menschliche Armarterie einen erhöhten peripheren Widerstand und Ress et al. (1989) bei systemischer Gabe von L-NMMA einen Blutdruckanstieg als Ausdruck einer erhöhten Vasokonstriktion nach.

Bossaller et al. (1987) und Förstermann et al. (1988) fanden an arteriosklerotisch veränderten humanen Koronargefäßen und Ragazzi et al. (1995) an der Aorta von Kaninchen eine Reduktion der EDRF-Freisetzung. Auch zeigte sich an Cholesterin-gefütterten Kaninchen und an Patienten mit peripherer arterieller Verschußkrankheit eine Abnahme der Urinausscheidung von Nitrat als Maß für die endogene NO-Produktion (Böger et al., 1995; 1997).

An Gefäßen mit zerstörtem Endothel sind eine vermehrte Adhäsion und Migration von Monocyten, eine Thrombocytenadhäsion und -aggregation zu beobachten. Durch Thrombocytinhaltsstoffe wie dem Thromboxan A<sub>2</sub> und Serotonin wird ein lokaler Gefäßspasmus hervorgerufen (Houston et al., 1986; Schrör & Braun, 1990). Außerdem kommt es zu einer Proliferation von Gefäßmuskelzellen (Bode-Böger et al., 1997; Cohen, 1995; Hare & Colucci, 1995; Kelly et al., 1996).

Welche klinische Bedeutung NO hat, zeigt der Einsatz von organischen Nitratvasodilatoren, die in vivo NO über ein Cytochrom P-450 abhängiges Enzym NO abspalten, im Rahmen der Akut- und Dauertherapie bei der ischämischen Herzkrankheit (Bennett et al., 1989; Schröder et al., 1987, Schröder & Schrör, 1990). In niedrigen Dosierungen läßt sich durch die organischen Nitratvasodilatoren hauptsächlich eine Dilatation der venösen Gefäße beobachten (Bennett et al., 1992; Servent et al., 1989; Wolf & Werringloer, 1988). Die Vorlastsenkung führt über eine Abnahme des linksventrikulären enddiastolischen Druckes, der systolischen linksventrikulären Wandspannung und die Erhöhung des Herzzeitvolumens zu einer Verminderung des myocardialen Sauerstoffbedarfs (Schröder, 1994; Franciosa et al., 1974; Bassenge & Zanzinger, 1992). In höheren Nitratkonzentrationen werden auch arterielle Gefäße dilatiert, wodurch der koronare Blut-



fluß durch Dilatation der größeren Koronararterien in ischämische Regionen des Herzmuskels umverteilt wird (Harrison & Bates, 1993; Sellke et al., 1990). Nicht selten hat ein zu häufiger Einsatz von organischen Nitraten, z.B. durch eine Hemmung des die NO-Abspaltung katalysierenden Enzyms und eine neurohumorale Gegenregulation, eine Nitrattoleranz zur Folge (Brien et al., 1986; Förster et al., 1991; Needleman et al., 1973). Diese Toleranzentwicklung ist bei dem Nitratdilator Molsidomin nicht so ausgeprägt zu beobachten (Schächinger & Zeiher, 1997). Molsidomin wird in der Leber enzymatisch in 3-Morpholinosydnonimin (SIN-1) umgewandelt. In wäßriger Lösung entsteht daraus N-Morpholino-N-nitrosoaminoacetonitril (SIN-1A), das wie auch Nitroprussidnatrium NO spontan - und damit relativ „unkontrolliert“ freisetzt (Schröder, 1994). Nitrovasodilatoren können die umfangreichen Wirkungen des endogenen NO - schon allein durch das die Gefahr einer Nitrattoleranz reduzierende Nitrat-freie Intervall - nicht vollständig ersetzen. So sind eine dem Bedarf angepaßte Veränderung des Koronartonus und die autokrinen antiarteriosklerotischen Wirkungen des endogenen NO durch das exogene nicht gegeben (Zeiher, 1996).

Interessant wären für die Zukunft Präparate, die nicht nur als NO-Donatoren dienen und ihre Wirkung mehr oder weniger ubiquitär im Gefäßsystem entfalten, sondern Stoffe, die eventuell „vor Ort“ am geschädigten Gefäß, d.h. insbesondere am arteriosklerotisch veränderten Gefäß, über eine direkte Stimulation der NO-Synthase zu einer Gefäßerweiterung führen. Solch eine Stimulation kann z.B. durch eine Bereitstellung des Substrates der NO-Synthase - dem L-Arginin - hervorgerufen werden. L-Arginin ist intrazellulär in hohen Konzentrationen sowohl in gesunden als auch in arteriosklerotisch veränderten Gefäßen vorhanden. Möglicherweise kommt es bei letzteren durch intrazelluläre Kompartimentalisierung zu einer Reduzierung der zur Verfügung stehenden L-Arginin-Konzentration (Bode-Böger et al., 1997). Außerdem könnte der bereits beschriebene Anstieg von endogenen kompetitiven NO-Synthase-Inhibitoren in arteriosklerotisch veränderten Gefäßen zu einer Änderung der L-Arginin-Konzentration führen. Der Anstieg des endogenen kompetitiven NO-Synthase-Inhibitors ADMA ist von der Gefäßschädigung abhängig. So bestimmten Böger et al. (1997) an Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit eine Zunahme des ADMA-Spiegels in Abhängigkeit vom Stadium

nach Fontaine. Nach intravenöser Infusion von L-Arginin kam es dosisabhängig, offenbar durch Aufhebung der kompetitiven Hemmung der NO-Synthase durch ADMA, zu einer NO-vermittelten Steigerung der nutritiven Perfusion in der betroffenen Extremität (Böger et al., 1996; Bode-Böger et al., 1996). Auch gibt es Hinweise dafür, daß eine Normalisierung der gestörten NO-Synthase durch Zufuhr von L-Arginin zu einer Regression der Arteriosklerose führt (Drexler et al., 1991). An Cholesterin-gefütterten Kaninchen wurden nach längerfristiger oraler Zufuhr eine Verminderung der Intimaverdickung in der Aorta und eine Zunahme der endothelabhängigen Relaxation an isolierten Aortensegmenten ex vivo nachgewiesen (Cooke et al., 1991; 1992).

Aus zahlreichen experimentellen Untersuchungen ist bekannt, daß L-Arginin und Peptide, die Arginin im Molekül enthalten, über eine Bereitstellung des Stickstoffes der terminalen Guanidinogruppe zu einer endothelabhängigen Relaxation führen (Arnal et al., 1995; Pucci et al., 1995; Cooke et al., 1992).

Bei der Substanz Argatroban könnte es sich möglicherweise um einen solchen Stickstoffdonator handeln. Argatroban ist ein synthetischer Thrombininhibitor mit einem  $K_i$ -Wert von  $14 \times 10^{-8}$  mol/l. Argatroban bindet am katalytischen Zentrum des Enzyms (Taparelli et al., 1993) und hemmt somit die durch Thrombin vermittelten Effekte bei der Hämostase und Thrombose. Das enzymatisch wirksame  $\alpha$ -Thrombin, das aus dem Prothrombinkomplex hervorgeht, wird in einer relativ hohen Konzentration im geschädigten bzw. thrombotisch veränderten Gefäß gebildet (Bode & Stubbs, 1995; Bush, 1991). In diesem Gefäßbereich kann Thrombin auch eine rezeptorvermittelte Gefäßkontraktion auslösen, wenn entsprechende Thrombinrezeptoren (PAR-1) an den glatten Muskelzellen vorhanden sind (Rasmussen et al., 1991; Vu et al., 1991). Wie bereits oben erwähnt, weisen diese endothelgeschädigten Gefäßabschnitte zudem eine verminderte Konzentration an dem für die Reaktion mit der NO-Synthase zur Verfügung stehenden L-Arginin auf. Durch die oben beschriebene vermehrte Bildung endogener NO-Synthase-Inhibitoren und die hohe Thrombinkonzentration kommt es zum Überwiegen der vaso-konstriktorischen Faktoren mit der Konsequenz einer zusätzlichen Perfusionsminderung. Theoretisch hätte somit die Anwesenheit des synthetischen Thrombininhibitor Argatroban mehrere positive Effekte auf das thrombotisch veränderte, stenotische Gefäß. Durch

die Inaktivierung des Thrombins käme es einerseits über eine verringerte Fibrinbildung zum Stagnieren des Thrombenwachstums und zum anderen zu einer Verminderung seiner gefäßspastischen Wirkung. Außerdem wäre durch die Bereitstellung des Substrates L-Arginin eine Aufhebung der kompetitiven Hemmung der NO-Synthase durch endogene NO-Synthase-Inhibitoren denkbar. Beides könnte zu einer deutlichen Verbesserung der poststenotischen Perfusionsverhältnisse führen.

In den vorliegenden Untersuchungen sollte bei Kaninchen geprüft werden, ob nach parenteraler Applikation von Argatroban die NO-vermittelten Gefäßreaktionen ex vivo verändert werden. Dazu wurden zunächst an verschiedenen Gefäßpräparaten (A.carotis, Aorta) von Kaninchen grundsätzliche Gefäßreaktionen, so die kontraktionsauslösende Wirkung von Serotonin (5-HT), Phenylephrin (Phe) und Prostaglandin<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) untersucht. Außerdem mußte geprüft werden, ob in den Gefäßen eine endothelabhängige durch Acetylcholin ausgelöste Gefäßrelaxation existiert und diese durch NO vermittelt wird. Durch L-NAME, dem Hemmstoff der NO-Synthase, wurde der Nachweis für die NO-vermittelte Gefäßrelaxation erbracht. Nach intravenöser Applikation von Argatroban wurde getestet, ob ex vivo an isolierten Gefäßen die durch PGF<sub>2α</sub>, Phe und 5-HT ausgelösten Kontraktionen bzw. Kontraktionen durch plättchenreiches Plasma oder Arachidonsäure verändert werden. In allen Experimenten wurde die durch Ach hervorgerufene endothelabhängige Relaxation untersucht. In weiteren Experimenten wurde L-NAME intravenös appliziert und die Gefäßreaktionen geprüft. Parallel dazu wurden Blutproben (Zitratblut) entnommen und zu einem späteren Zeitpunkt Gerinnungsanalysen durchgeführt.

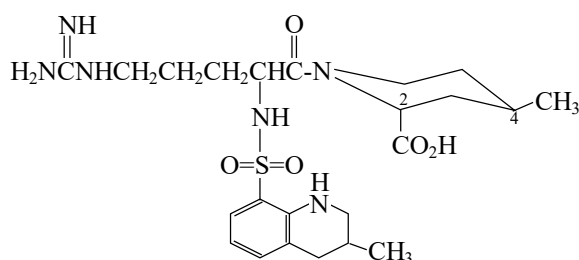
Außerdem wurde sowohl in vitro als auch ex vivo untersucht, ob sich durch die Zufuhr des NO-Synthase-Substrates L-Arginin bzw. Argatroban die kompetitive Hemmung der NO-Synthase durch L-NAME bzw. L-Glutamin aufheben oder mindern läßt.

Untersuchungen an der A. carotis von Kaninchen wurden in der Literatur bis zum Beginn der Experimente nur selten durchgeführt. In den vorliegenden Untersuchungen erwies sich die A. carotis als ein sehr gut geeignetes Gefäßpräparat zum Studium von endothelabhängigen Gefäßaktionen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Substanzen

Prostaglandin-F <sub>2α</sub>	(PGF <sub>2α</sub> , SERVA, Heidelberg)
Acetylcholin	(Ach, Dispersa, Winterthur Schweiz)
Serotonin	(5-Hydroxytryptamin, 5-HT, SERVA, Heidelberg)
Phenylephrin	(L-Phenylephrin-HCl, Phe, SERVA, Heidelberg)
N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin-Methylester	(L-NAME, SIGMA, Deisenhofen)
L-Arginin	(SIGMA, Deisenhofen)
Argatroban	(4-Methyl-1-{N <sup>α</sup> -[(3-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-8-quinoliny)-sulfonyl]-L-arginyl} -2-piperidine-carboxyl Säure (MQPS), Stoff wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. J. Fared Loyola University Medical Center, Maywood, USA überlassen)



Indometazin (SERVA, Heidelberg)

L-Glutamin (SIGMA, Deisenhofen)

Arachidonsäure	(AA, SERVA, Heidelberg)
Ketanserlin	(Research Biochemicals Internationale, Natick, USA)
Daltroban	(Boehringer, Mannheim)
BAY U 3405	(Bayer, Leverkusen)
Prothazin <sup>®</sup>	(Promethazin, Arzneimittelwerk Dresden)
Cyproheptadin	(SERVA, Heidelberg)
aPTT- Reagenz	(Immuno, Heidelberg)
Thrombin-Reagenz	(Immuno, Heidelberg)
Prazosin	(Arzneimittelwerk Dresden, Dresden)
Ketamin	(Richter, Budapest, Ungarn)
Rompur <sup>®</sup>	(Xylazin, Bayer, Leverkusen)

**Zusammensetzung der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung in mmol/l:**

NaCl	118,0	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0	Glucose	11,0
KCl	4,7	CaCl <sub>2</sub>	2,5		
MgSO <sub>4</sub>	1,2	NaHCO <sub>3</sub>	25,0	pH	7,2-7,4

**2.2. Plättchenreiches Plasma (PRP)**

### **2.2.1. Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP) und plättchenfreiem Plasma (PFP)**

Zur Gewinnung von plättchenreichem Plasma wurde Citratblut von Kaninchen (neun Teile Blut plus ein Teil Natriumcitrat  $1,1 \times 10^{-2}$  mol/l 10 min bei 1600 U/min zentrifugiert und anschließend das plättchenreiche Plasma als Überstand abpipettiert.

Das verbliebene erythrozytenhaltige Sediment wurde bei 5000 U/min 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und als plättchenfreies Plasma (PFP) eingesetzt.

Nach Bestimmung der Plättchenzahl im Phasenkontrastmikroskop wurde das PRP mit einer definierten Menge PFP verdünnt und auf eine Plättchenzahl von  $3-4 \times 10^5$  Plättchen pro  $\mu$ l eingestellt. Proben von 1 ml wurden bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

Nach dem Auftauen wurden die Proben mikroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich bei 300facher Vergrößerung, daß kaum intakte Plättchen zu sehen waren.

Aus dem Plasma wurde 1 ml tiefgefrorenes PRP mit dem doppelten Volumen Aceton 15 min im Kühlschrank inkubiert. Während dieser Zeit kam es zu einer vollständigen Denaturierung der hochmolekularen Plasmabestandteile (sichtbar als weißer Niederschlag). Nach 3-minütiger Zentrifugation bei  $4^\circ\text{C}$  mit 10000 U/min wurde der Überstand sofort in ein 25 ml Spitzkölbchen pipettiert. Anschließend wurde das Probenvolumen mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe bei 12 Torr bis auf 50  $\mu$ l vorsichtig eingeengt. Nach Beendigung der Prozedur wurden die im Spitzkölbchen enthaltenen niedermolekularen Plasmabestandteile mit 0,9%-iger NaCl-Lösung wieder auf das ursprüngliche Volumen von 1 ml aufgefüllt.

### **2.3. Bestimmung der Gerinnungszeit**

Die Gerinnungszeiten wurden mit dem Koagulometer Thrombotrack<sup>®</sup> 4 (Immuno, Heidelberg) gemessen.

### **Messung der aPTT**

Citratblut von Kaninchen wurde bei 2500 U/min 15 min bei 4°C zentrifugiert und der plasmatische Überstand abpipettiert. Davon wurden 50 µl mit 50 µl aPTT-Reagenz, 3 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 50 µl einer  $2,5 \times 10^{-2}$  molaren  $\text{CaCl}_2$  - Lösung versetzt und die Zeit bis zur Gerinnung gemessen.

### **Messung der Thrombinzeit**

Von dem Plasma (Überstand) wurden 100 µl mit der gleichen Menge Trispuffer (0,1 mol/l, pH 7,5) 1 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde diese Lösung mit 50 µl Thrombin-Reagenz versetzt und die Zeit bis zur Gerinnung bestimmt.

Die Herstellung des Thrombin-Reagenz wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

## **2.4. Untersuchung an isolierten Gefäßen**

Zur Gewinnung von isolierten Gefäßen wurden Kaninchen (Weiße Neuseeländer, Gewicht: 2500-3000 g; männlich, weiblich) mit Ketamin (1mg/kg) und Rompur® (0,2 mg/kg) i.m. narkotisiert. Nach Präparation der A.carotis auf beiden Seiten wurden die Gefäße entnommen. Die Gefäße wurden sorgfältig vom perivaskulären Gewebe befreit und in ca. 2-3 mm breite Ringe geschnitten. Ein Gefäß wurde unmittelbar nach der Gefäßentnahme untersucht, während das zweite Gefäß nach 24h (Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4°C) verwendet wurde.

Die Gefäßringe wurden zwischen L-förmigen Platindrähten in 10 ml Organbädern fixiert. Als Badflüssigkeit diente Krebs-Henseleit-Lösung die konstant auf 37°C temperiert und kontinuierlich mit einem Gasgemisch aus 95 %  $\text{O}_2$  und 5 %  $\text{CO}_2$  durchströmt wurde (Versuchsordnung Abb. 1). Die Gefäßringe wurden mit einer konstanten Vorspannung von 20 mN, die während des Versuches immer wieder neu einreguliert wurde, belastet. In regelmäßigen Abständen erfolgte ein Austausch der Badflüssigkeit.

Versuchs- und Meßanordnung zur Kontraktionsmessung sind in Abb. 1 und 2 dargestellt. Die Kontraktionen wurden isometrisch mit einem HSE Kraftaufnehmer F 30 Typ 372 gemessen.

Nach einer Adaptationszeit von 60 min wurden die Gefäße zweimal im Abstand von 30

min mit KCl ( $3 \times 10^{-2}$  mol/l) kontrahiert. Zwischen jeder Kontraktion wurde die Badlösung mehrmals ausgetauscht. Danach wurde eine Kontraktion durch  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $3 \times 10^{-6}$  mol/l) ausgelöst, nach einer Pause von 45 min erfolgte eine weitere  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Zugabe. Dabei kam es im allgemeinen zu einer deutlichen Kontraktionszunahme. Weitere  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Zugaben hatten dagegen nur noch geringe Kontraktionssteigerungen zur Folge, so daß bei den folgenden Versuchen bereits nach der zweiten  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Kontraktion die weiteren Untersuchungen mit Acetylcholin (kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Vasodilatation) und im Abstand von jeweils 45 min kumulative Konzentrations-

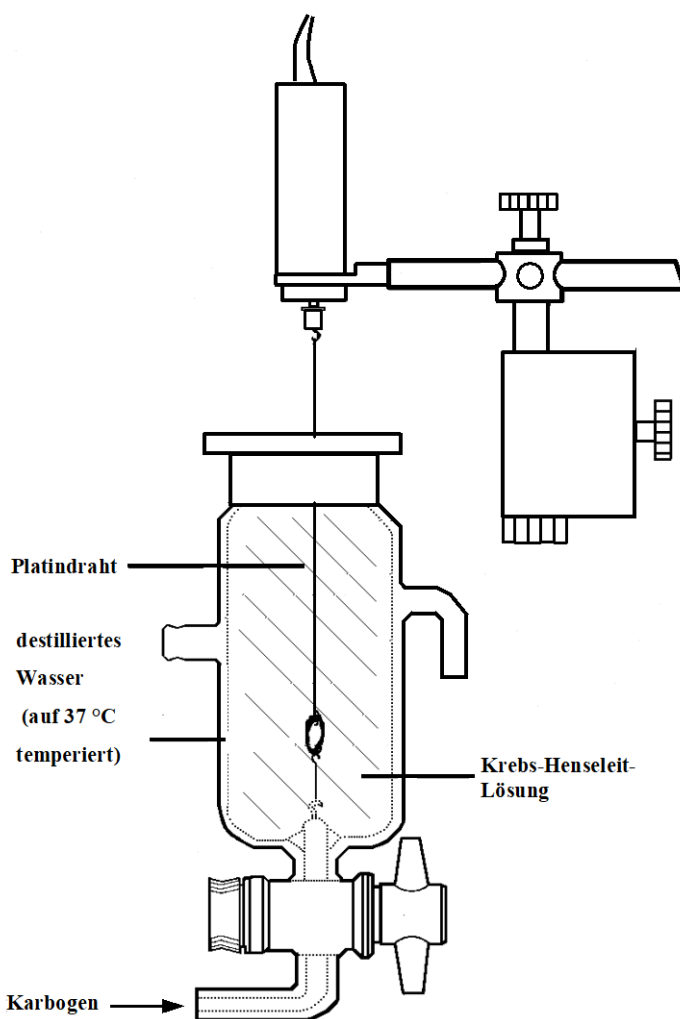


Abb. 1 Versuchsanordnung

Wirkungs-Kurven für die Vasokontraktion durch Serotonin ( $10^{-9}$  bis  $10^{-5}$  mol/l) und Phenylephrin ( $10^{-9}$  bis  $10^{-5}$  mol/l) erstellt wurden. Versuchsbeispiele sind in Abb. 3 dargestellt. Um den Einfluß von Pharmaka auf die Acetylcholin induzierte Relaxation bzw. die Kontraktion des Serotonin oder Phenylephrin zu prüfen, wurden die Gefäßringe 20 min vor der Erstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit den Substanzen vorinkubiert. Bei späteren Experimenten wurde anstelle der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Kontraktion eine Kontraktion durch Phe  $10^{-6}$  mol/l im Abstand von 30 min ausgelöst. Auf dem Plateau der Phe-Kontraktion wurde eine kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Ach von  $10^{-9}$ - $10^{-5}$  mol/l erstellt. Nach einer Pause von 30 min wurden den Organbädern weitere Substanzen (Arachidonsäure, PRP oder 5-HT) hinzugegeben, wobei



ihre kontraktionsauslösende Wirkung in prozentuale Beziehung zu der vorangegangenen Phenylephrinkontraktion am gleichen Präparat gesetzt wurden.

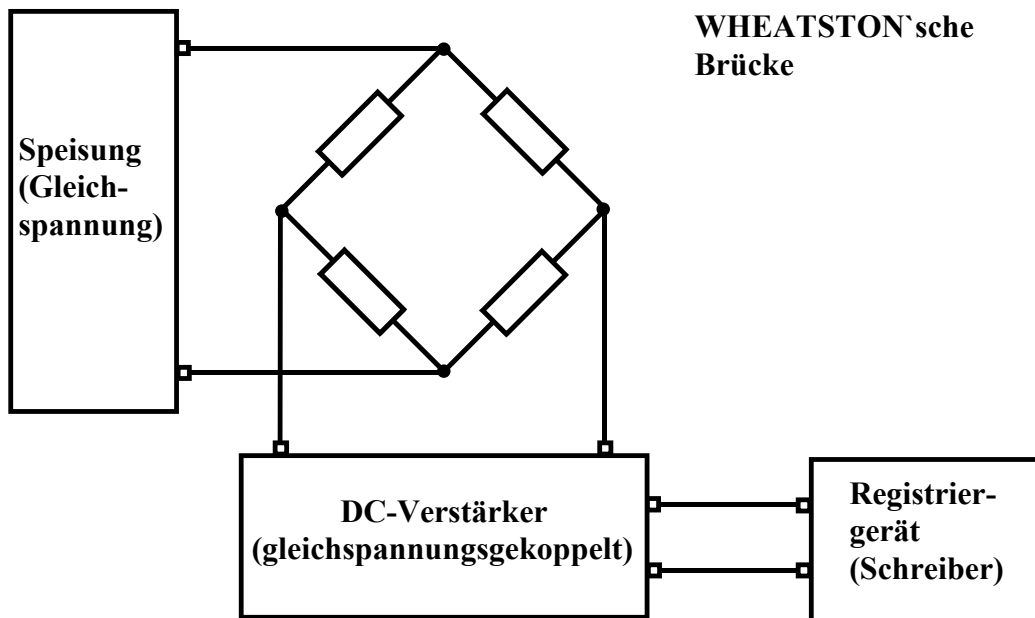


Abb. 2: Meßanordnung

### Ex-vivo-Untersuchungen

Narkotisierten Kaninchen wurden für Injektionen ein Katheter in die Ohrdrumvene eingeführt. Die Blutentnahmen zur Bestimmung der Thrombinzeit und aPTT erfolgten über einen arteriellen Katheter, der in die A. femoralis eingeführt worden war. Vor und 5 min, 15 min, 30 min und 60 min nach Injektion der Prüfsubstanz wurden Blutproben entnommen.

Bei den Ex-vivo-Versuchen wurde meist 30 min nach i.v. Injektion der zu prüfenden Substanz bzw. nach Injektion von NaCl (Kontrollversuche) die A. carotis beiderseits entnommen. Anschließend wurden die Gefäße für die Experimente im Organbad präpariert. In einer zweiten Versuchsreihe wurde zunächst die A. carotis der einen Seite entfernt, 30 min nach Injektion wurde die A. carotis der anderen Seite entnommen und beide Gefäße in vitro entsprechenden Untersuchungen unterzogen.

### Statistische Auswertung

Alle angegebenen Werte beziehen sich auf Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) von n verschiedenen Tieren. Für die Signifikanzberechnung der verschiedenen Versuchsreihen wurde der T-Test eingesetzt.

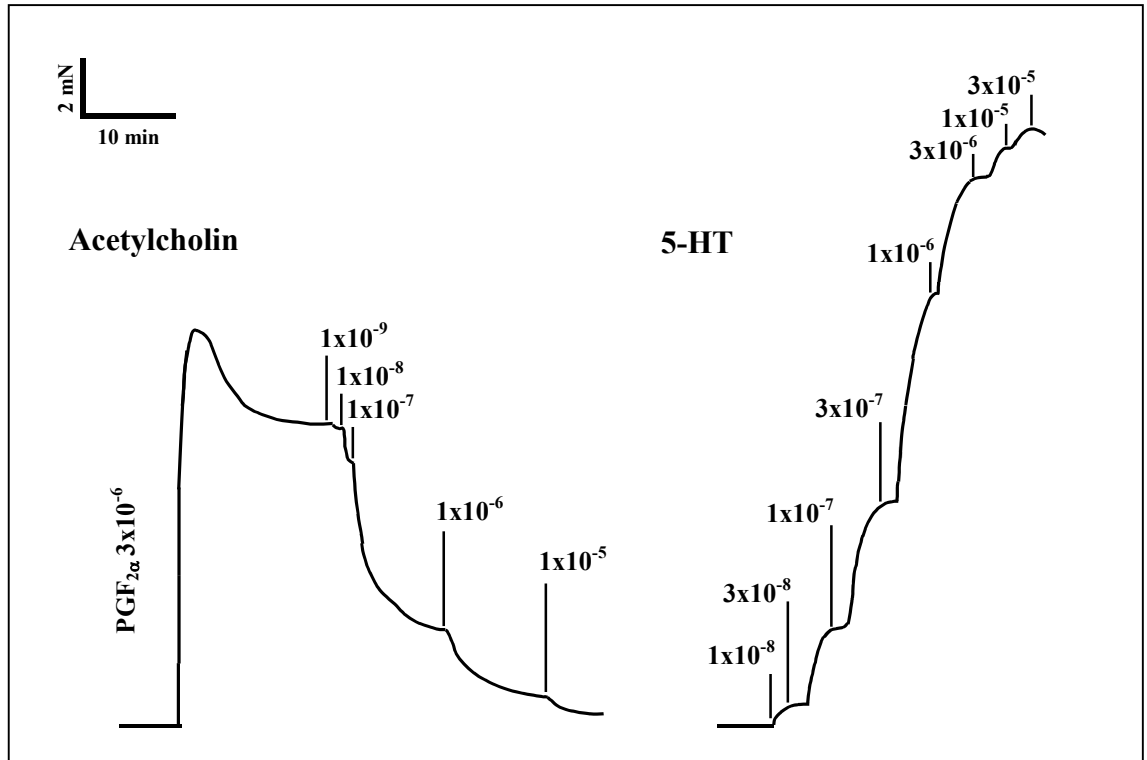


Abb. 3: Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die relaxierende Wirkung von Acetylcholin nach Vorkontraktion mit PGF<sub>2α</sub> (li. Abb.) und die gefäßkontrahierende Wirkung von 5-HT (re. Abb.) an der isolierten A. carotis von Kaninchen.

### 3. Ergebnis

#### 3.1. In-vitro-Untersuchungen an isolierten Gefäßen

##### Einfluß des Endothels auf die Vasokonstriktion

An Ringpräparaten der A. carotis bewirkt  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in einer Konzentration von  $3 \times 10^{-6}$  mol/l eine maximale Kontraktionskraft von  $16,14 \pm 0,69$  mN (n=16). Wenn die  $\text{PGF}_{2\alpha}$  induzierte Kontraktion ein Plateau erreicht hatte, wurde dem Organbad Acetylcholin zugesetzt, um die endothelabhängige Relaxation der Gefäße zu prüfen. Bei Gefäßen mit intaktem Endothel führt die kumulative Zugabe von Acetylcholin zu einer schrittweisen Relaxation der vorkontrahierten Gefäße, die bei einer Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l das Maximum erreicht. Ein Versuchsbeispiel ist in Abb. 3 dargestellt.

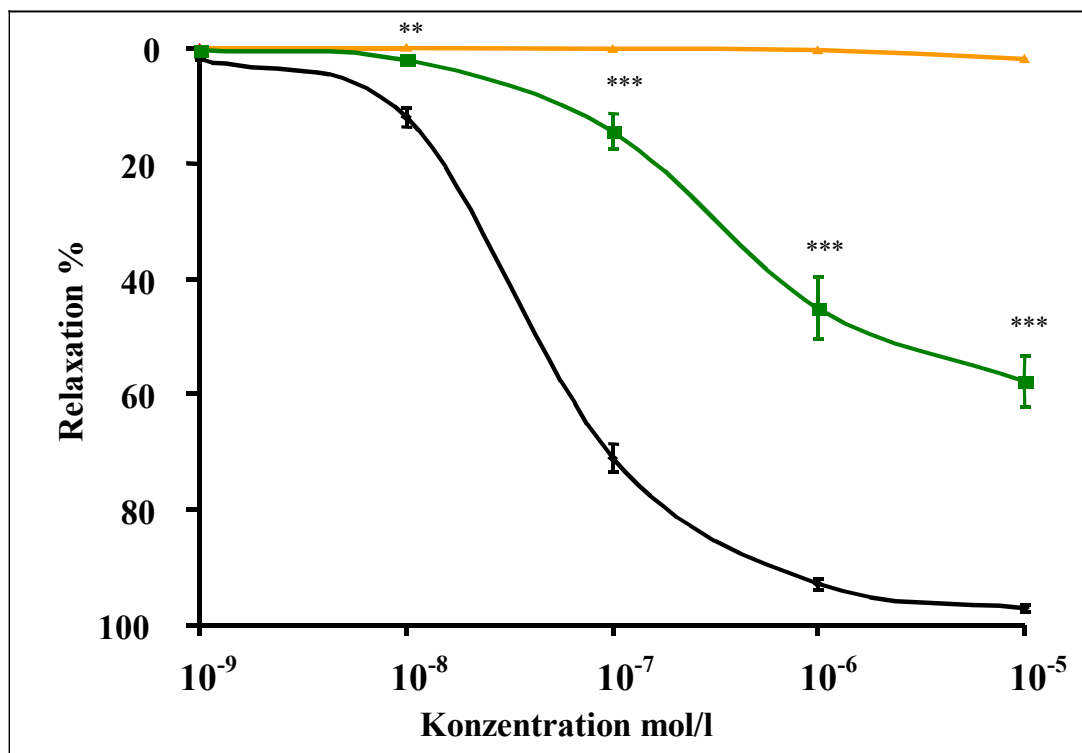
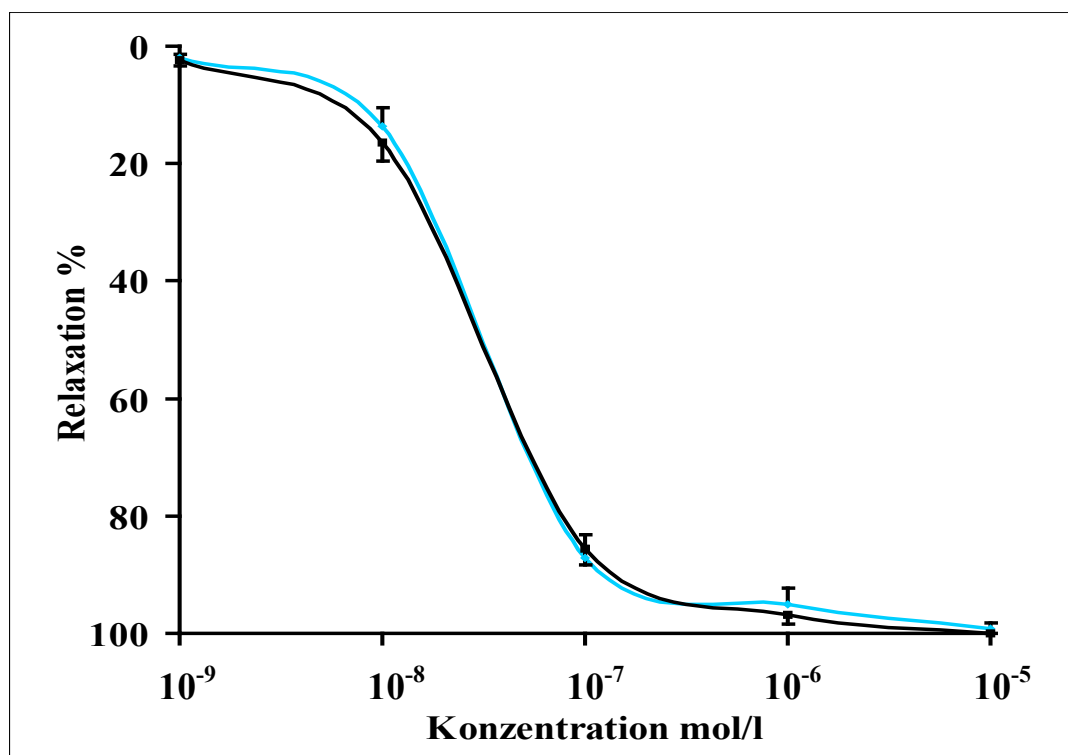


Abb. 4: Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Acetylcholin (ACh) an Gefäßringen der A. carotis von Kaninchen in % der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Kontraktion (=100%):  
 ■ mit Endothel, ■ ohne Endothel, ■ nach Vorinkubation mit L-NAME  $2 \times 10^{-4}$  mol/l. Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 9. \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die gefäßdilatorische Wirkung für Acetylcholin sind in Abb. 4 wiedergegeben. Bei Gefäßpräparaten, bei denen das Endothel durch vorsichtiges Drehen über einem angerauhten Glasstab entfernt wurde, war die Acetylcholin vermittelte Relaxation vollständig aufgehoben (Abb. 4).



**Abb. 5:** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Acetylcholin (ACh) an Gefäßringen der A. carotis von Kaninchen in % der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Kontraktion (=100%):  
 ■ mit Endothel, ■ nach Vorinkubation mit Indometazin  $3 \times 10^{-6}$  mol/l  
 Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 3

Um eine Beteiligung von Prostaglandinen bei der Kontraktion bzw. Dilatation auszuschließen, wurden die Cyclooxygenase der Gefäße durch Vorbehandlung der Gefäßringe mit Indometazin blockiert. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß die Acetylcholin-induzierte Relaxation nach Vorinkubation mit Indometazin ( $3 \times 10^{-6}$  mol/l) nicht signifikant beeinflusst wird (Abb. 5).

Im Gegensatz dazu wird bei Hemmung der NO-Synthese durch Vorbehandlung der Gefäße mit dem NO-Synthase-Inhibitor  $\text{N}^{\text{G}}$ -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) die Acetylcholin induzierte Relaxation signifikant vermindert (Abb. 4). Bei diesen Untersu-

chungen zeigte sich, daß bei einer 20-minütigen Vorinkubationszeit mit L-NAME ( $2 \times 10^{-4}$  mol/l) die  $\text{PGF}_{2\alpha}$  - induzierte Kontraktion im Vergleich zur Kontraktion bei Gefäßen ohne L-NAME (intakte NO-Synthese) verstärkt war (s. Tabelle 1).

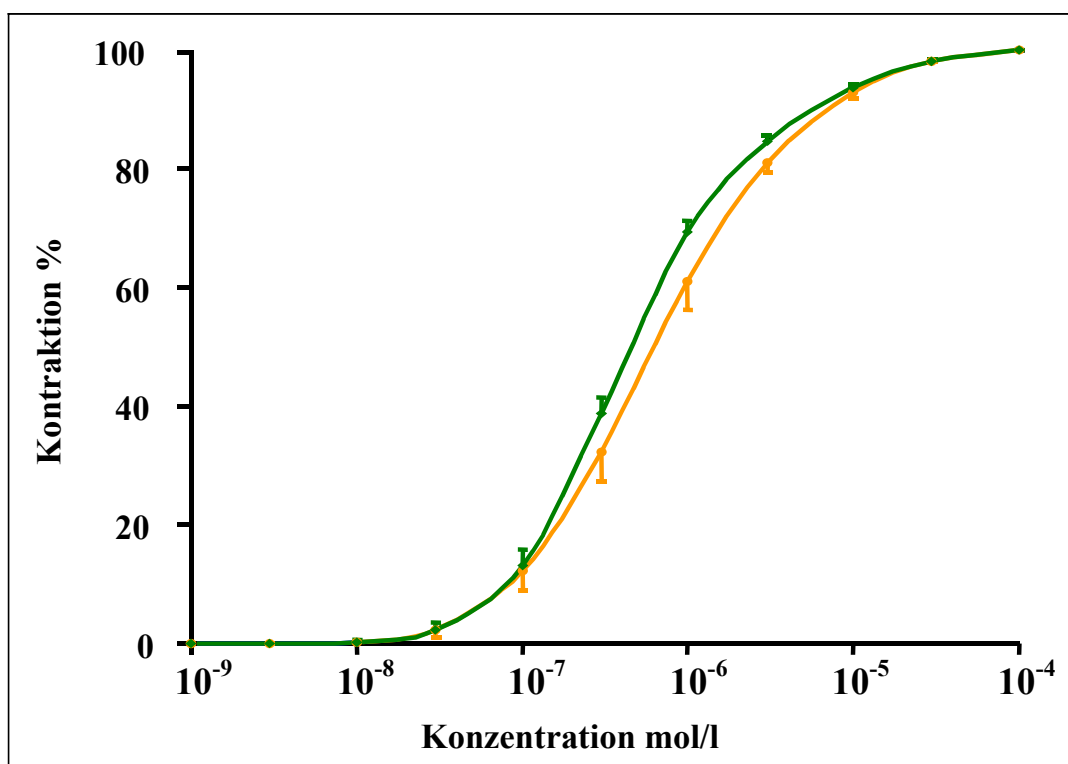
**Tabelle 1**

**Einfluß von L-NAME auf die durch  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierte Kontraktion und die Acetylcholin-induzierte Relaxation an isolierten Ringen der A. carotis mit intaktem Endothel in vitro.**

<b>A. carotis mit Endothel</b>	<b><math>\text{PGF}_{2\alpha}</math> (<math>3 \times 10^{-6}</math> mol/l) induzierte Kontraktion (mN) Mittelwert <math>\pm</math> SEM</b>	<b>(n)</b>	<b>Acetylcholin (<math>10^{-5}</math> mol/l) induzierte Relaxation in %</b>
<b>Kontrolle ohne L-NAME</b>	<b><math>13,82 \pm 1,1^{**}</math></b>	<b>(8)</b>	<b><math>97,10 \pm 0,6^{****}</math></b>
<b>nach Vorinkubation mit L-NAME (<math>2 \times 10^{-4}</math> mol/l)</b>	<b><math>18,43 \pm 1,4^{**}</math></b>	<b>(8)</b>	<b><math>57,79 \pm 4,4^{****}</math></b>

\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Phenylephrin bewirkt im allgemeinen bei Konzentrationen  $> 10^{-8}$  mol/l eine Kontraktion der Gefäßringe der A. carotis. Der maximale Effekt wird bei Konzentrationen zwischen  $3 \times 10^{-5}$  und  $10^{-4}$  mol/l erreicht. Der mittlere  $\text{EC}_{50}$ -Wert für die Phenylephrin induzierte Kontraktion beträgt  $6 \times 10^{-7}$  mol/l. Nach Vorinkubation der Gefäße mit L-NAME kam es zu einer geringen (nicht signifikanten) Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven (Abb. 6).



**Abb. 6 :** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Phenylephrin (Phe) an Gefäßringen der A. carotis von Kaninchen in % des maximalen Effektes:  
 — ohne Vorinkubation, — mit Vorinkubation von L-NAME  $2 \times 10^{-4}$  mol/l  
 Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 4

Die kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für 5-HT sind in Abb. 7 dargestellt. Im Vergleich zum Phenylephrin tritt bereits bei niedrigeren Konzentrationen eine Kontraktion auf, die bei  $10^{-5}$  mol/l das Maximum erreicht. Der mittlere  $EC_{50}$ -Wert für die Kontraktion beträgt  $9 \times 10^{-8}$  mol/l. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Effekten vor bzw. nach Vorinkubation mit L-NAME. Auch nach Vorinkubation mit Indomethazin traten keine Veränderungen der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Agonisten auf.

### 3.2. Ex-vivo-Untersuchungen mit L-NAME zur Funktion des Endothels

Um zu prüfen, ob L-NAME nach intravenöser Applikation die Synthese von NO blockiert, wurden Kaninchen über eine Ohrdrainvene 100 mg/kg langsam injiziert. In diesen Untersuchungen wurde rechtsseitig die A. carotis vor der L-NAME-Injektion entfernt. Die linksseitige A. carotis wurde 30 min nach der Injektion von L-NAME entnommen.

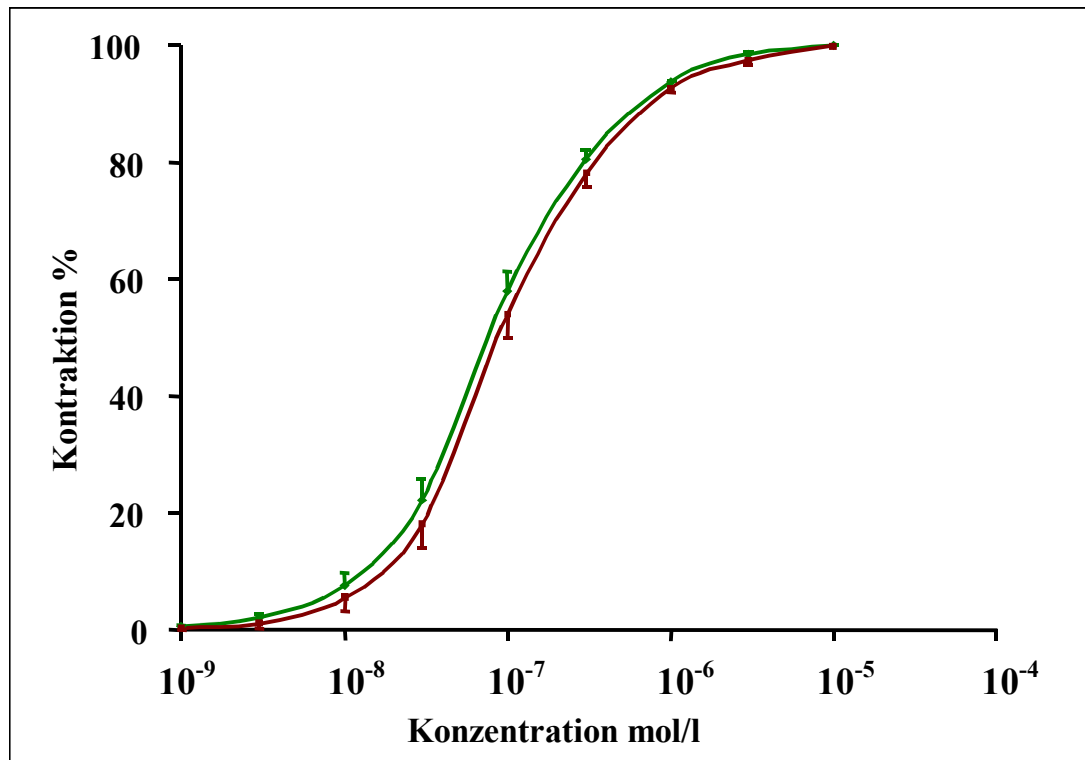


Abb. 7 : Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve für 5-HT an Gefäßringen der A. carotis von Kaninchen in % des maximalen Effektes:

■ ohne Vorinkubation, ■ mit Vorinkubation mit L-NAME  $2 \times 10^{-4}$  mol/l  
Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 4

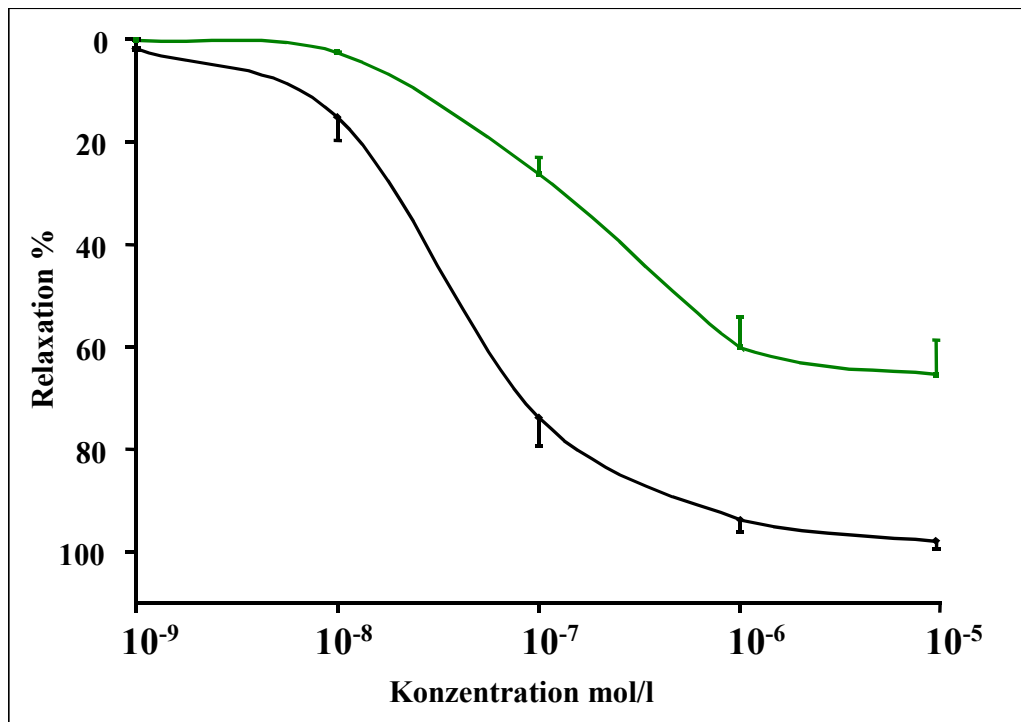
Tabelle 2

Einfluß von L-NAME auf die  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierte Kontraktion und die Acetylcholin-induzierte Relaxation ex vivo.

A. carotis mit Endothel	$\text{PGF}_{2\alpha}$ ( $3 \times 10^{-6}$ mol/l) induzierte Kontraktion (mN) Mittelwert $\pm$ SEM	(n)	Acetylcholin ( $10^{-5}$ mol/l) induzierte Relaxation in %
Kontrolle ohne L-NAME	$17,62 \pm 0,4^{***}$	(5)	$97,92 \pm 1,6^*$
nach Injektion von L-NAME (100 mg/kg)	$22,80 \pm 0,7^{***}$	(5)	$65,43 \pm 6,9^*$

\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Die Gefäße wurden entsprechend den In vitro-Versuchen im Organbad präpariert. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich in Übereinstimmung mit den In-vitro-Versuchen, daß die Gefäßringe 30 min nach der L-NAME-Gabe eine verstärkte PGF<sub>2α</sub>-induzierte Kontraktion aufwiesen, und die endothelabhängige Relaxation im Vergleich zu den Kontrollen signifikant geringer war (Abb. 8; Tabelle 2).



**Abb. 8: Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Acetylcholin (Ach) an Gefäßringen der A. carotis von Kaninchen in % der PGF<sub>2α</sub>-Kontraktion (=100%):**  
 ■ vor Injektion, ■ nach Injektion von L-NAME 100 mg/kg  
 Mittelwert ± SEM, n = 4. \* p < 0,05

Die kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die vasokonstriktorisches Effekte von Phenylephrin in % des maximalen Effektes sind in Abb. 9 und die Absolutwerte [mN] in Abb. 10 dargestellt. Aus Abb. 10 geht hervor, daß nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit L-NAME der vasokonstriktorisches Effekt (Absolutwerte) höher ist als der der Kontrollen. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant.

Die in Abb. 11 dargestellte Konzentrations-Wirkungs-Kurve für 5-HT der Gefäßringe die nach Injektion von L-NAME entnommen wurden, zeigt eine leichte (nicht signifikante) Linksverschiebung im Vergleich zu denen, die vor Injektion entnommen wurden.



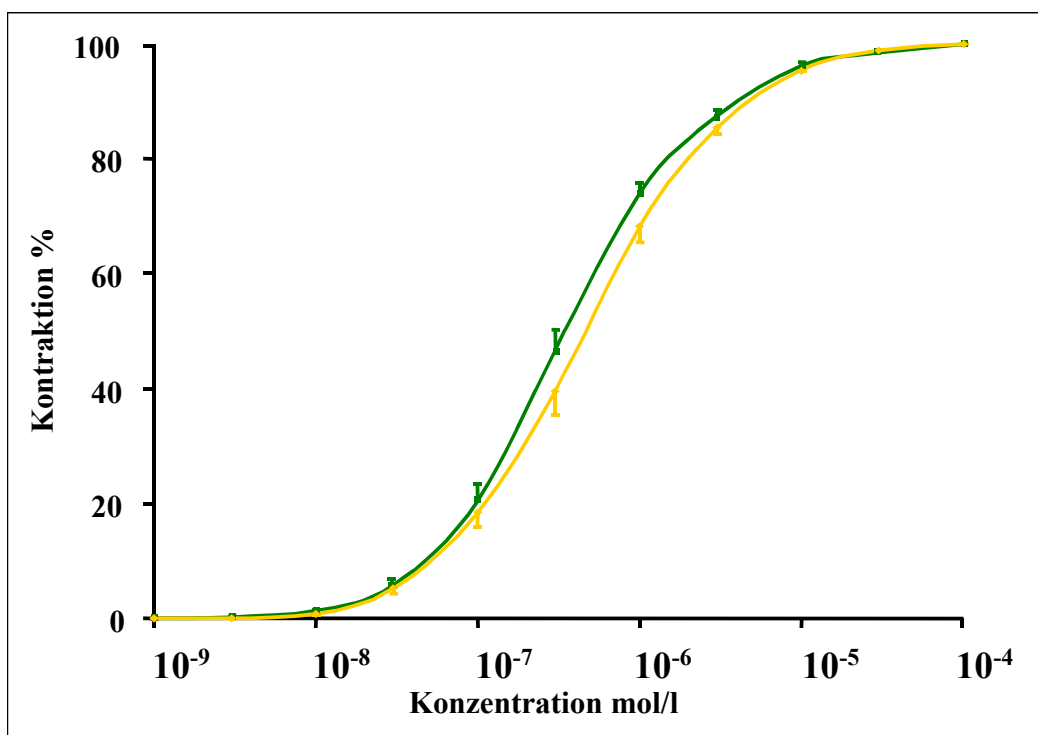


Abb.9: Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Phenylephrin (Phe) an Gefäßringen der A. carotis von Kaninchen in % des maximalen Effektes:  
 ■ vor Injektion, ■ nach Injektion von L-NAME 100 mg/kg  
 Mittelwert  $\pm$  SEM, n=4

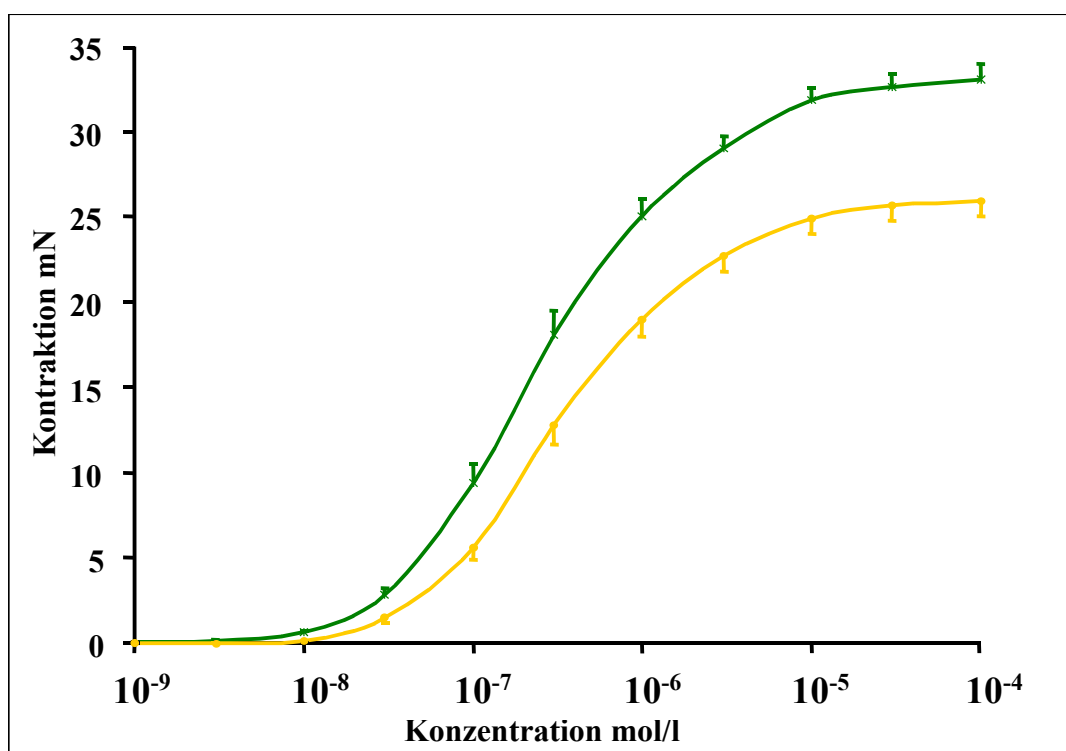


Abb. 10: Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Phenylephrin (Phe) an Gefäßringen der A. carotis von Kaninchen in [mN]: ■ vor Injektion, ■ nach Injektion von L-NAME 100 mg/kg Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 4

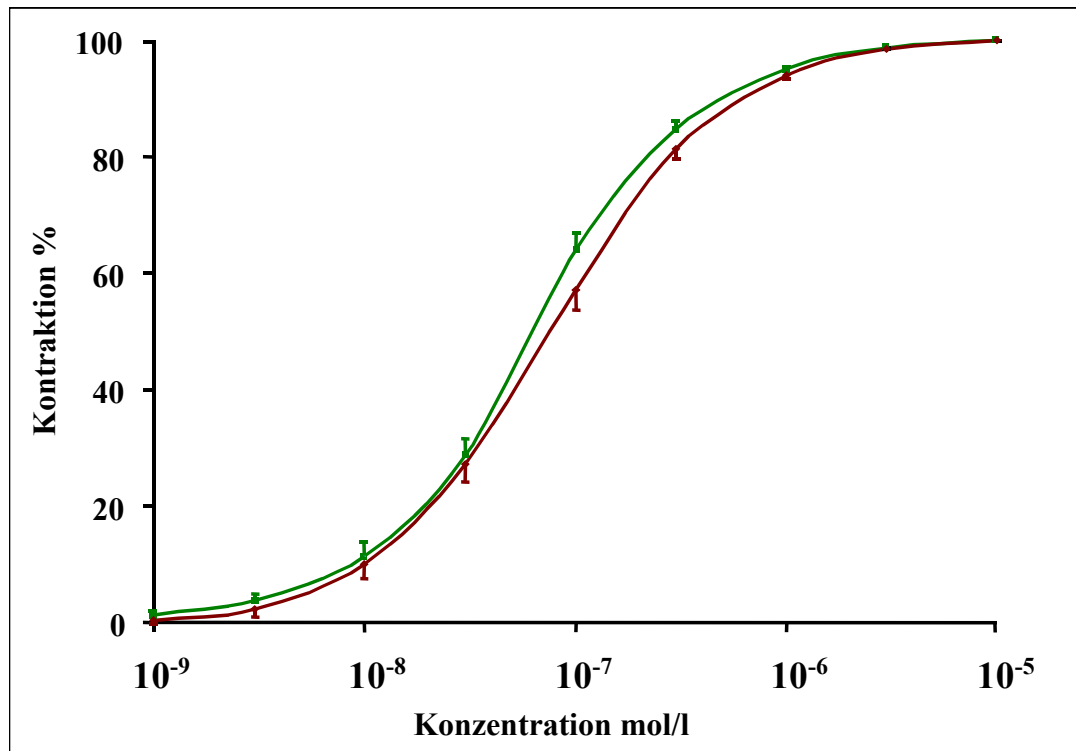


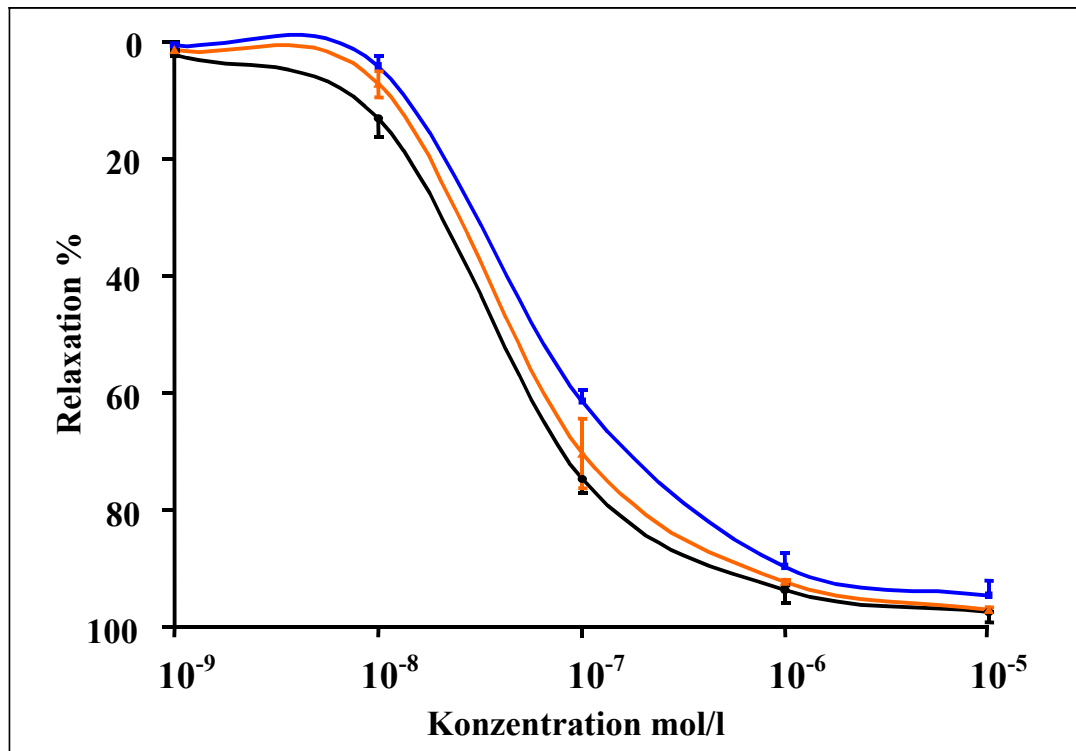
Abb. 11: Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve für 5-HT an Gefäßringen der A. carotis von Kaninchen in % des maximalen Effektes:

■ vor Injektion, ■ nach Injektion von L-NAME 100 mg/kg  
Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 4

### 3.3. In-vitro-Untersuchungen mit L-Arginin und Argatroban

#### Einfluß von Argatroban und L-Arginin auf die Ach-induzierte Relaxation in vitro

Bei diesen Versuchen wurde nach der ersten Konzentrations-Wirkungs-Kurve für den relaxierenden Effekt von Acetylcholin an  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -vorkontrahierten Gefäßringen eine zweite erstellt, wobei 20 min vor der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Kontraktion die Gefäßringe mit L- Glutamin ( $10^{-3}$  mol/l) bzw. L-NAME ( $2 \times 10^{-4}$  mol/l) vorinkubiert wurden. Die Versuchsergebnisse sind in Abb. 12 und 13 dargestellt. Zu einem Teil der Gefäßpräparate wurde 5 min nach Glutamin bzw. L-NAME L-Arginin ( $10^{-3}$  mol/l), das Substrat der NO-Synthase, zugegeben. Bei den Gefäßringen, die ausschließlich mit L-NAME bzw. L-Glutamin vorinkubiert wurden, zeigte sich eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve d.h. die Acetylcholin bedingte Relaxation wurde vermindert, wobei L-NAME signifikant stärker wirksam war als L-Glutamin (Abb. 12 und 13).



**Abb.12 :** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Acetylcholin (Ach) an Gefäßringen der A. carotis von Kaninchen in % der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Kontraktion (=100%):  
 ■ ohne Vorinkubation, ■ mit Vorinkubation von L-Glutamin  $10^{-3}$  mol/l und L-Arginin  $10^{-3}$  mol/l, ■ mit Vorinkubation von L-Glutamin  $10^{-3}$  mol/l  
 Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 3

Im Gegensatz dazu konnte bei den Präparaten, die 5 min später mit L-Arginin behandelt wurden (insgesamt 15 min vor  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Zugabe inkubiert wurden), die Wirkung von L-NAME bzw. L-Glutamin reduziert werden, d.h. es trat eine Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve nach links auf. Es war jedoch bei der kurzen Inkubationszeit nicht möglich, die Wirkung von L-NAME vollständig aufzuheben (Abb. 13).

Um zu prüfen, ob Argatroban in vitro einen Einfluß auf die endothelabhängige Relaxation hat, wurden die Gefäßringe der A. carotis 15 min mit Argatroban in den Konzentrationen von  $10^{-7}$  -  $10^{-5}$  mol/l vorinkubiert und danach an den  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -vorkontrahierten Gefäßen die Acetylcholin-induzierte Relaxation bestimmt. Diese Untersuchungen ergaben, daß Argatroban allein keinen Einfluß auf die Acetylcholin induzierte Relaxation aufweist. Die durch L-NAME bzw. L-Glutamin hervorgerufene Verminderung der Acetylcholin induzierten Relaxation wurde jedoch teilweise wieder aufgehoben (Abb. 14 und 15). Während bei  $10^{-7}$  mol/l Argatroban dieser Effekt noch nicht ausgeprägt zum Tragen kam, war der Effekt bei  $10^{-6}$  mol/l signifikant. Es war jedoch auffällig, daß bei einer höheren Konzentration von Argatroban ( $10^{-5}$  mol/l) wider Erwarten die Konzentrations-

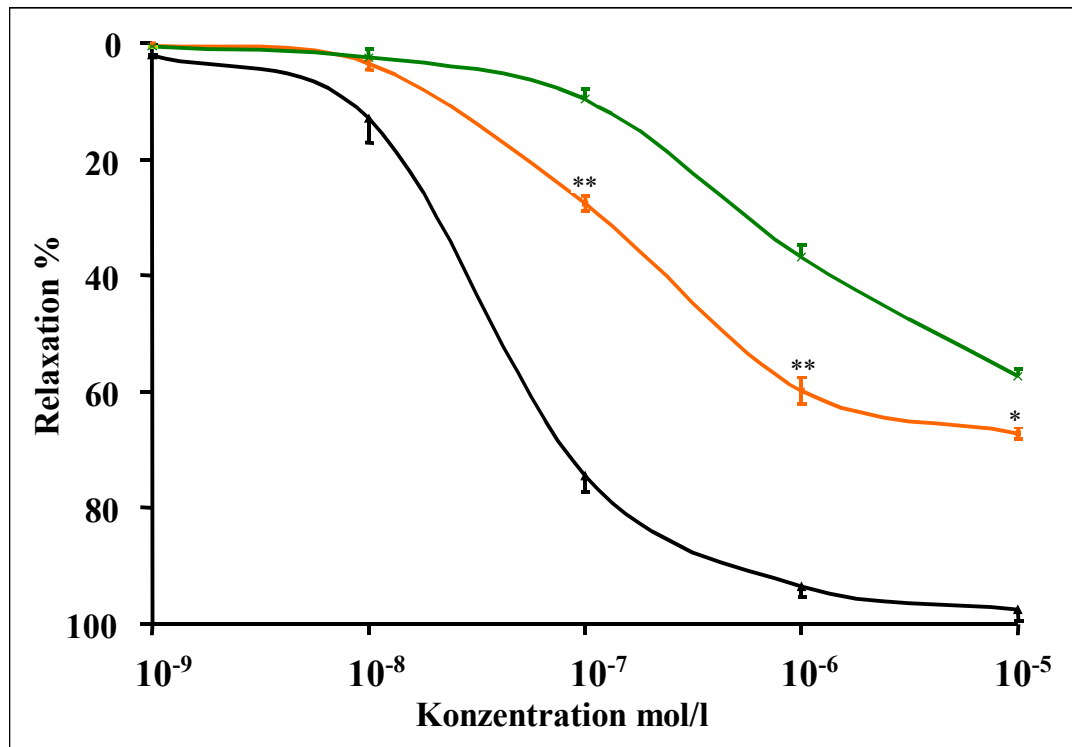


Abb. 13: Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Acetylcholin (Ach) an Gefäßringen der A. carotis von Kaninchen in % der PGF<sub>2α</sub>-Kontraktion (=100%):  
 ■ ohne Vorinkubation, ■ mit Vorinkubation von L-NAME 2x10<sup>-4</sup> mol/l und L-Arginin 10<sup>-3</sup> mol/l, ■ mit Vorinkubation von L-NAME 2x10<sup>-4</sup> mol/l  
 Mittelwert ± SEM, n = 4. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01

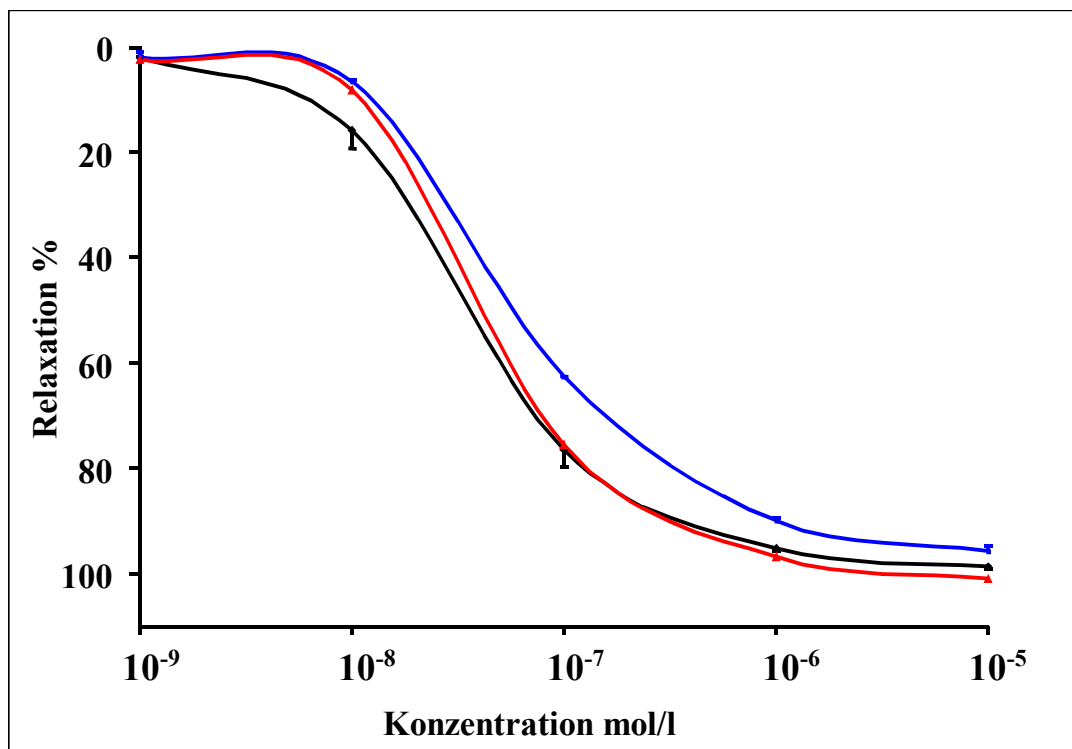
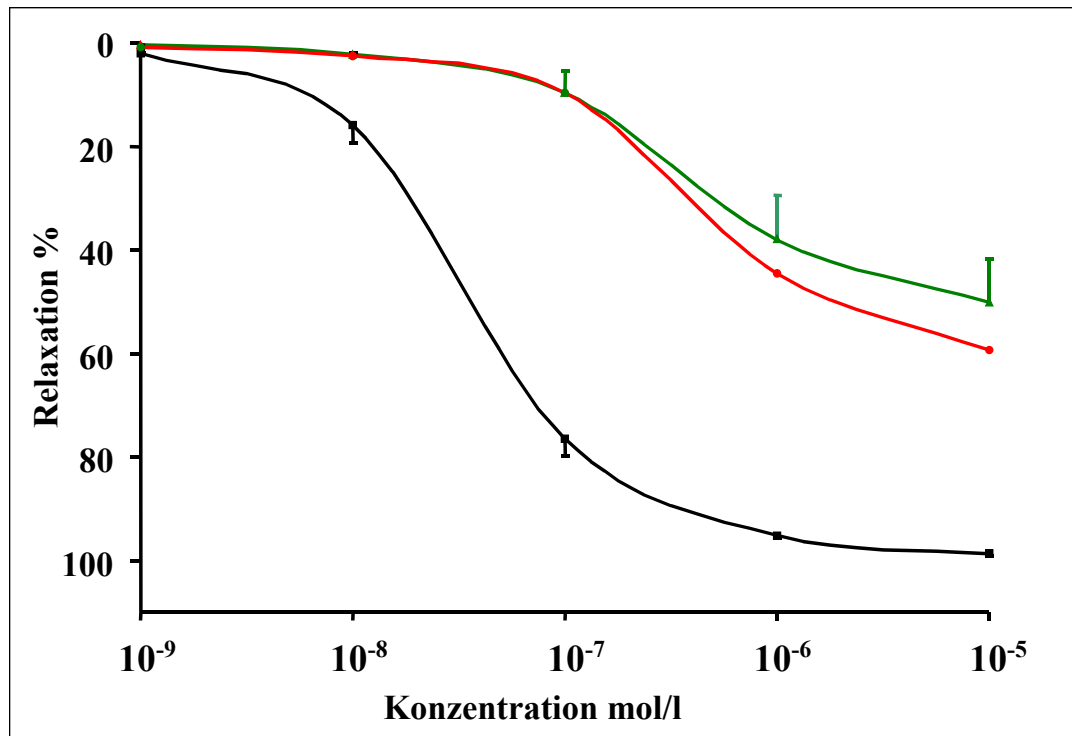


Abb. 14: Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Acetylcholin (Ach) an Gefäßringen der A. carotis von Kaninchen in % der PGF<sub>2α</sub>-Kontraktion (=100%):  
 ■ ohne Vorinkubation, ■ mit Vorinkubation von L-Glutamin 10<sup>-3</sup> mol/l, ■ mit Vorinkubation von L-Glutamin 10<sup>-3</sup> mol/l und Argatroban 10<sup>-6</sup> mol/l  
 Mittelwert ± SEM, n = 4



**Abb. 15:** Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Acetylcholin (ACh) an Gefäßringen der A. carotis von Kaninchen in % der PGF<sub>2a</sub>-Kontraktion (=100%) :  
 ■ ohne Vorinkubation, ■ mit Vorinkubation von L-NAME 2x10<sup>-4</sup> mol/l, ■ mit Vorinkubation von L-NAME 2x10<sup>-4</sup> mol/l und Argatroban 10<sup>-6</sup> mol/l  
 Mittelwert±SEM, n = 4

Wirkungs-Kurven sich nicht wesentlich von denen unterschieden, die mit L-NAME ohne Argatroban erstellt worden waren. Das gleiche trifft auch für die Vorinkubation mit L-Glutamin und Argatroban zu (s. Abb. 14).

Die In-vitro Untersuchungen zeigten insgesamt nur sehr geringe Effekte von L-Arginin und Argatroban auf die durch Acetylcholin ausgelöste Relaxation bzw. auf die durch L-NAME bzw. L-Glutamin hervorgerufene Verminderung der Acetylcholin-induzierten Relaxation.

### Einfluß von Arachidonsäure und PRP-Lysat auf das Endothel.

Bei Untersuchungen an Hunden war in der Arbeitsgruppe von Prof. Fareed (persönliche Mitteilung) gefunden worden, daß nach Argatrobangabe, insbesondere die durch Arachidonsäure bzw. die durch PRP hervorgerufenen Kontraktionen vermindert werden. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde zunächst in vitro die durch Arachidonsäure ausgelöste Kontraktion an der A. carotis geprüft. Nach entsprechenden Vorversuchen wurde die Arachidonsäure in einer Konzentration von  $10^{-5}$  mol/l verwendet. Die durch Arachidonsäure bedingte Kontraktion erreichte  $7,71 \pm 0,53$  mN (n=6), das entspricht  $49,65 \pm 2,73$  % (n=6) der durch Phenylephrin ( $10^{-6}$  mol/l) hervorgerufenen Kontraktion. Nach Erreichen des Kontraktionsmaximums kam es zu einer relativ schnell einsetzenden Tonusminderung bis zum Erreichen des Ausgangszustandes der Kontraktion. Nach entsprechender Auswaschphase wurde eine zweite Kontraktion durch Arachidonsäure ausgelöst, die jedoch einen vergleichsweise geringeren Kontraktionsanstieg hervorrief (Abb. 16).

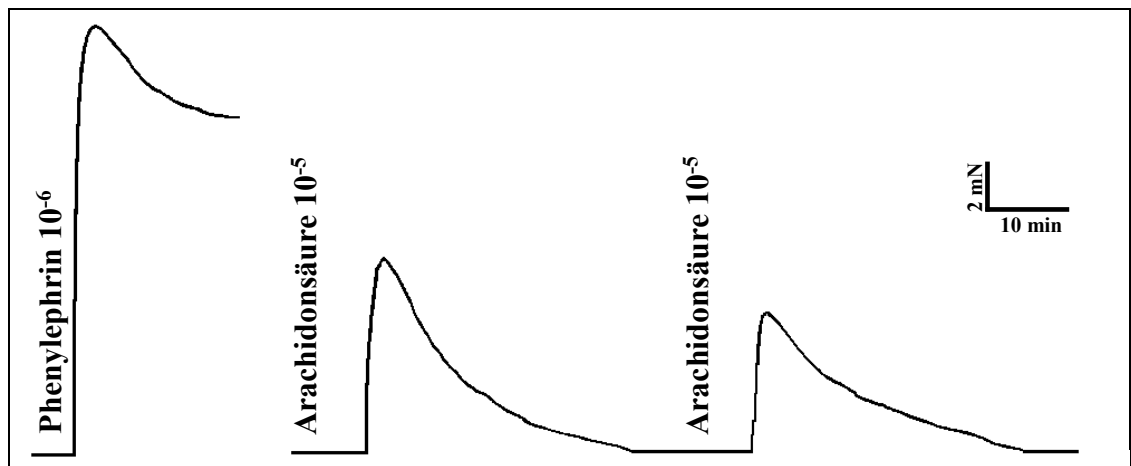


Abb. 16: Kontraktionen ausgelöst durch eine Zugabe von Phenylephrin  $10^{-6}$  mol/l (li.) und einer zweimaligen Zugabe von Arachidonsäure  $10^{-5}$  mol/l an der isolierten A. carotis bei Kontrolltieren mit intaktem Endothel

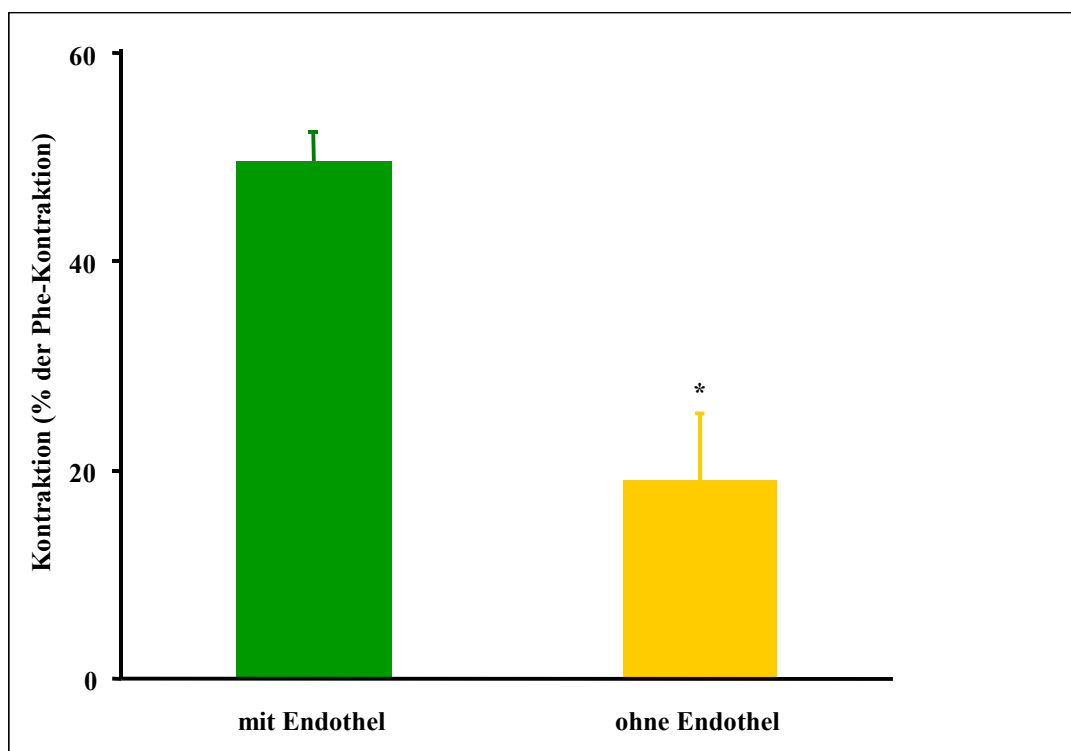


Abb. 17: Kontraktion von Gefäßen mit und ohne Endothel ausgelöst durch Arachidonsäure ( $10^{-5}$  mol/l) in % der Phenylephrin-Kontraktion. Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 4. \*p < 0,05

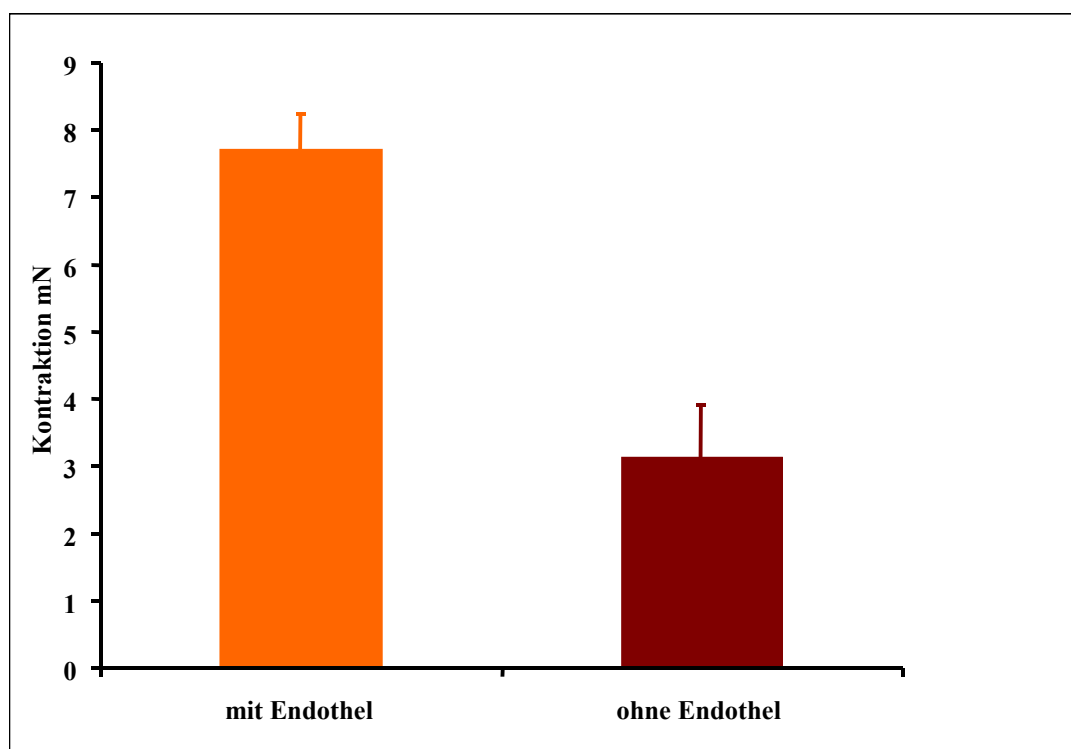
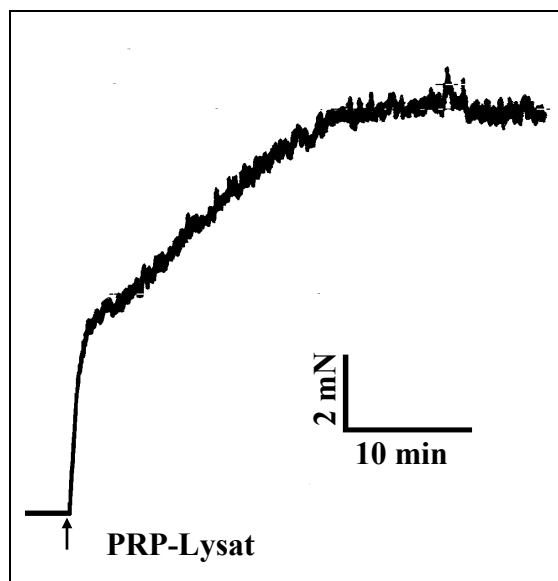


Abb. 18: Kontraktion von Gefäßen mit und ohne Endothel ausgelöst durch Arachidonsäure ( $10^{-5}$  mol/l) in mN. Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 4

Einigen Gefäßpräparaten wurde durch vorsichtiges Drehen über einem angerauhten Glasstab das Endothel entfernt. Beim Vergleich der durch Arachidonsäure hervorgerufenen Kontraktionen der Gefäßringe mit und ohne Endothel zeigte sich eine signifikante Minderung letzterer (Abb. 17 und 18).

Die durch Arachidonsäure hervorgerufene Kontraktion wurde durch die Thromboxanrezeptor-Antagonisten Daltroban ( $10^{-6}$  mol/l) und BAY U 345 ( $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  mol/l) nahezu vollständig gehemmt. Nach Vorinkubation der Gefäßpräparate mit Indometazin ( $3 \times 10^{-6}$  mol/l) wurde nur eine teilweise (nicht signifikante) Hemmung der durch Arachidonsäure bedingten Kontraktion erreicht.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden unterschiedliche Mengen PRP-Lysat dem Organbad ausgesetzt. Bei einer Zugabe von 50  $\mu$ l PRP-Lysat trat eine Gefäßkontraktion auf, die  $55,81 \pm 5,17$  % ( $n=7$ ) der Phenylephrin induzierten Kontraktion entsprach. Dabei kam es nach einem anfänglich raschen Kontraktionsanstieg innerhalb der ersten



**Abb. 19: Kontraktion ausgelöst durch eine Zugabe von 50  $\mu$ l plättchenreichem Plasma-Lysat**

Sekunden, im folgenden zu einer langsam ansteigenden oszillationsartigen Kontraktion bis zum Erreichen eines Plateaus nach ca. 20 min (Abb. 19). Bei 10 minütiger Vorinkubation des PRP-Lysates mit Indometazin konnte keine wesentliche Kontraktionsminderung beobachtet werden. Eine vollständige Hemmung der PRP-Lysat-bedingten Kontraktion wurde nach Vorinkubation mit Ketanserin ( $10^{-6}$  mol/l) oder Cyproheptadin ( $3 \times 10^{-7}$  und  $3 \times 10^{-6}$  mol/l) erreicht. Zum Vergleich wurde auch die Hemmung der durch 5-HT ( $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  mol/l) ausgelösten Kontraktion bestimmt. Auch hier ergab sich eine vollständige Hemmung durch Vorinkubation mit Ketanserin ( $10^{-6}$  mol/l) und Cyprohepta-



din (bereits bei  $3 \times 10^{-7}$  mol/l). Eine Spontanrelaxation, wie nach der durch Arachidonsäure ausgelösten Kontraktion, wurde nicht beobachtet, auch kam es durch eine Denudothelialisierung von Gefäßringen im Gegensatz zur Arachidonsäure zu einer verstärkten Maximalkontraktion (Abb. 20). Durch den  $\alpha_1$ -Rezeptorantagonisten Prazosin ( $10^{-7}$  und  $10^{-8}$  mol/l) wurde die Kontraktion durch PRP-Lysat nicht gehemmt, ebenso hatten die Thromboxanantagonisten Daltroban ( $10^{-6}$  mol/l) und BAY U 345 ( $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  mol/l) keinen signifikanten Einfluß auf die PRP-Lysat-Kontraktion.

Nach diesen Versuchsergebnissen lag die Vermutung nahe, daß die durch das PRP-Lysat ausgelöste Kontraktion auf das aus den Plättchen freigesetzte Serotonin zurückzuführen ist. Bekanntlich enthalten Kaninchenthrombocyten relativ hohe Menge an Serotonin, die ausreichend sind, um eine Kontraktion auszulösen. Durch den Prozeß des Einfrierens und Auftauens wird die Membran der Blutplättchen zerstört, so daß Serotonin aus den Granula austreten kann.

Um nachzuweisen, daß niedermolekulare Substanzen an der Kontraktion beteiligt sind, wurde das PRP-Lysat enteiweißt und eine Trennung zwischen nieder- und hochmolekularen Stoffen vollzogen (siehe Methode). Die Zugabe von 50  $\mu$ l des niedermolekularen

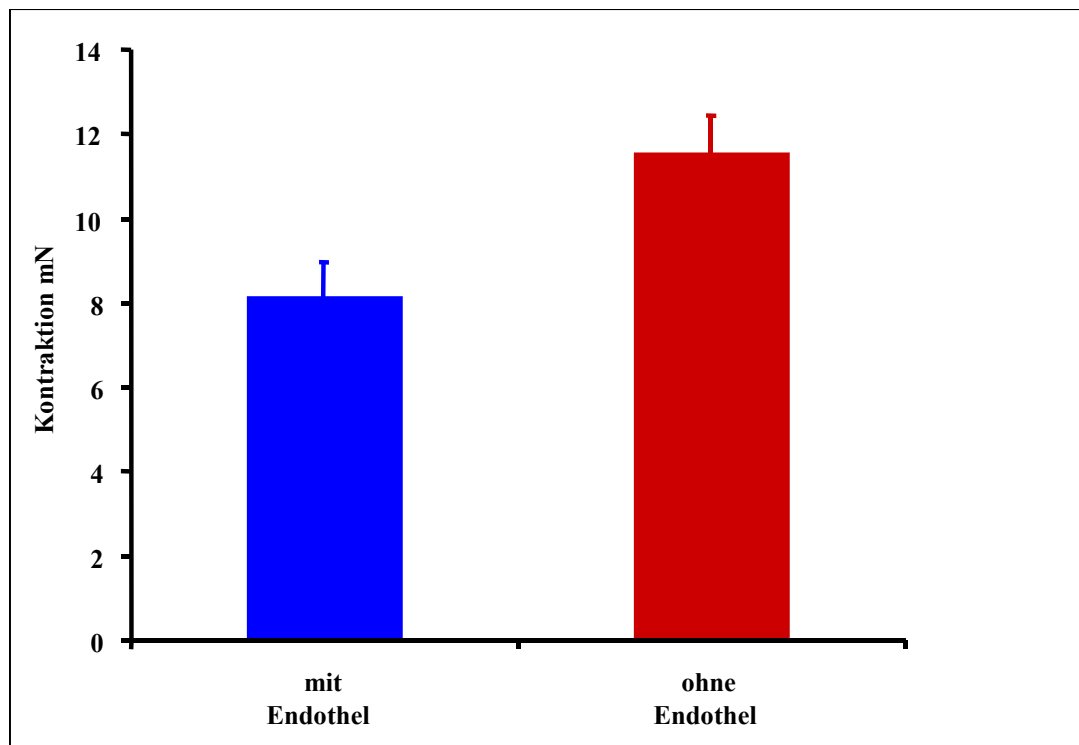
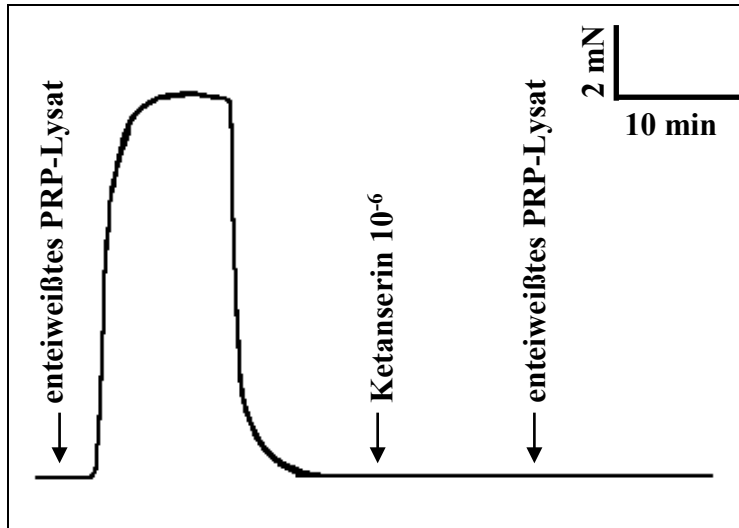
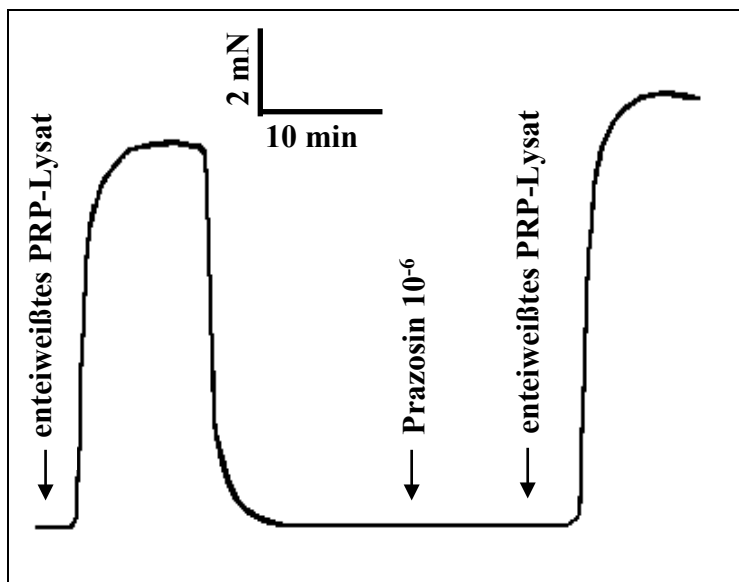


Abb. 20: Kontraktion ausgelöst durch 50  $\mu$ l plättchenreiches Plasma-Lysat an der A. carotis mit ■ und ohne ■ Endothel in mN. Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 4

Extrakt zum Organbad führte zu einem prompten Kontraktionsanstieg der Gefäße, der etwa 78% der durch Phenylephrin ausgelösten Kontraktion entsprach. Die endothelabhängige Relaxation durch Acetylcholin erbrachte einen über 90%-igen Tonusabfall. Durch Ketanserin ( $10^{-6}$  mol/l) ließ sich die durch das entweißtes PRP-Lysat hervorgerufene Kontraktion vollständig hemmen, während Prazosin ( $10^{-7}$  mol/l) keinen Einfluß hatte (Abb. 21 und 22).



**Abb. 21:** Kontraktionen ausgelöst durch eine Zugabe von 50  $\mu$ l entweißtem plättchenreichen Plasma-Lysat und einer Vorinkubation der Gefäßringe mit Ketanserin in einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l sowie einer anschließenden Zugabe von 50  $\mu$ l entweißtem PRP-Lysat.



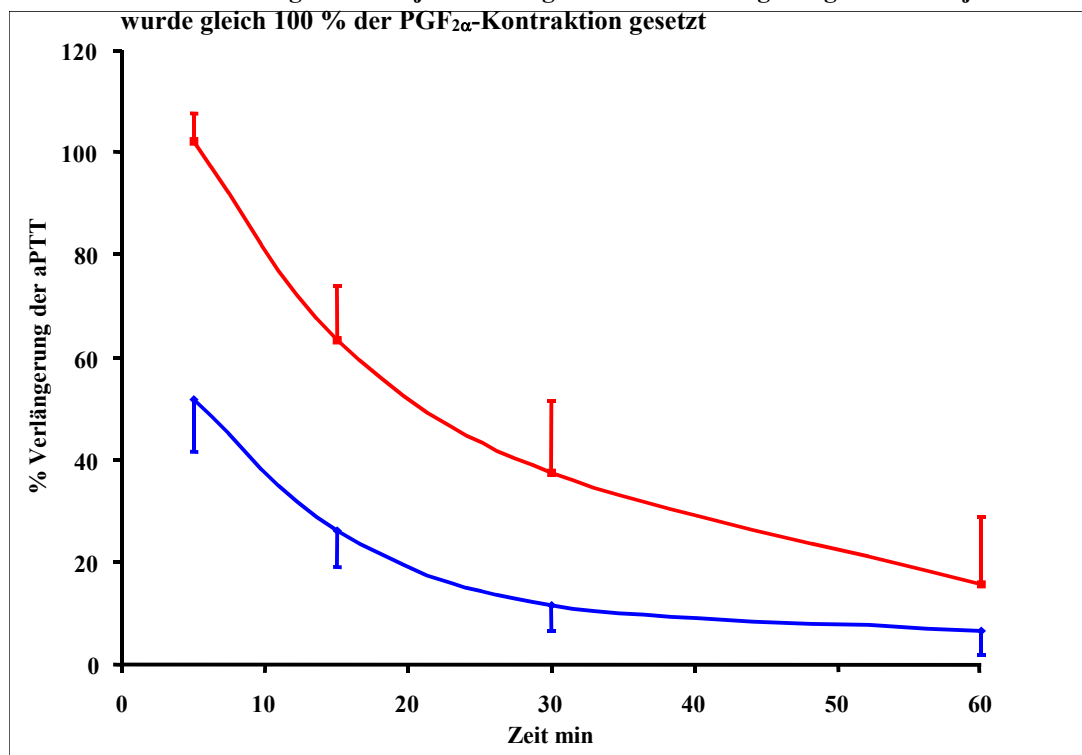
**Abb.22:** Kontraktionen ausgelöst durch eine Zugabe von 50  $\mu$ l entweißtem plättchenreichen Plasma-Lysat und einer Vorinkubation der Gefäßringe mit Prazosin in einer Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l sowie einer anschließenden Zugabe von 50  $\mu$ l entweißtem PRP-Lysat.

### 3.4. Ex-vivo-Untersuchungen mit Argatroban

#### Einfluß von Argatroban auf die Blutgerinnung ex vivo

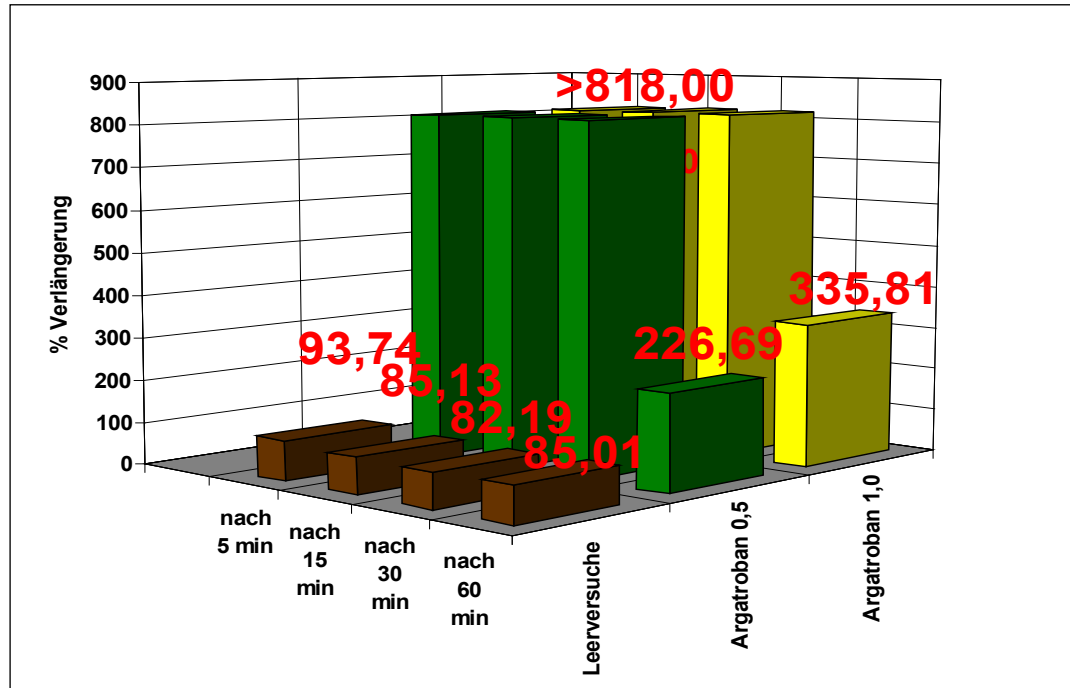
Narkotisierten Kaninchen (s.o.) wurden für spätere Argatroban-Injektionen ein peripherer venöser Katheter in eine Ohrtrandvene und für die Blutentnahmen während des Versuches ein arterieller Katheter in die A. femoralis gelegt. Danach erfolgte die Präparation der A. carotis beidseits. Die Thrombinzeit der Kontrollen betrug in dem Zeitraum vor bis 60 min nach Injektion von NaCl  $37 \pm 1,76$  s (n=26). Nach Injektion von 0,5 mg/kg Argatroban stieg die Thrombinzeit auf über  $>180$  s und fiel nach 30 min wieder auf  $152 \pm 5,9$  s (n=4) und nach 60 min auf  $78,8 \pm 3,2$  s (n=4) ab. Bei einer Argatrobaninjektion von 1mg/kg fiel die Thrombinzeit erst nach 60 min auf  $134,6 \pm 5,8$  s (n= 4) ab (Abb. 24). Die aPTT betrug bei den Kontrolltieren  $29,2 \pm 1,5$  s (n=27) und nach Injektion von 0,5 mg/kg Argatroban wurde die aPTT nach 5 min auf  $54,2 \pm 5,1$  s (n=4) verlängert und fiel

Abb. 24: Einfluß von Argatroban 1,0 mg/kg ■ bzw. 0,5 mg/kg ■ auf die TT.  
■ TT ohne Argatrobaninjektion. Angaben in % Verlängerung. TT vor Injektion wurde gleich 100 % der PGF<sub>2α</sub>-Kontraktion gesetzt



nach 60 min auf  $38,3 \pm 4,4$  s (n=4) ab (Abb. 23).

Abb. 23: Einfluß von Argatroban 1,0 mg/kg — bzw. 0,5 mg/kg — auf die aPTT (s) in % Verlängerung. Mittelwert $\pm$ SEM, n = 4



### Einfluß von Argatroban auf die Gefäße ex vivo

Je eine der beiden Aa. carotes wurde nach 30 min und nach 60 min post injektionem entnommen, präpariert, in Ringe geschnitten und in das Organbad gebracht, um die Kontraktionen zu messen.

Die erstellten kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Ach sowie für Phe und 5-HT zeigten zwischen den Ringen, die nach 30 min und nach 60 min entnommen worden waren, keine signifikanten Unterschiede in den biologischen Effekten, so daß später die zweiseitige Gefäßentnahme nach Injektion zugunsten einer Entnahme vor und nach Injektion verlassen wurde.

Beim Vergleich zwischen Leerversuchen und den Versuchen mit Argatroban kam es zu keiner signifikanten Verstärkung der Ach-bedingten Relaxation (Abb. 25). Die kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für vasokonstriktorische Effekte von Phe (Abb. 26) und 5-HT (Abb. 27) zeigten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Das trifft sowohl für die relativen als auch für die absoluten Werte (mN) der Kontraktion zu.

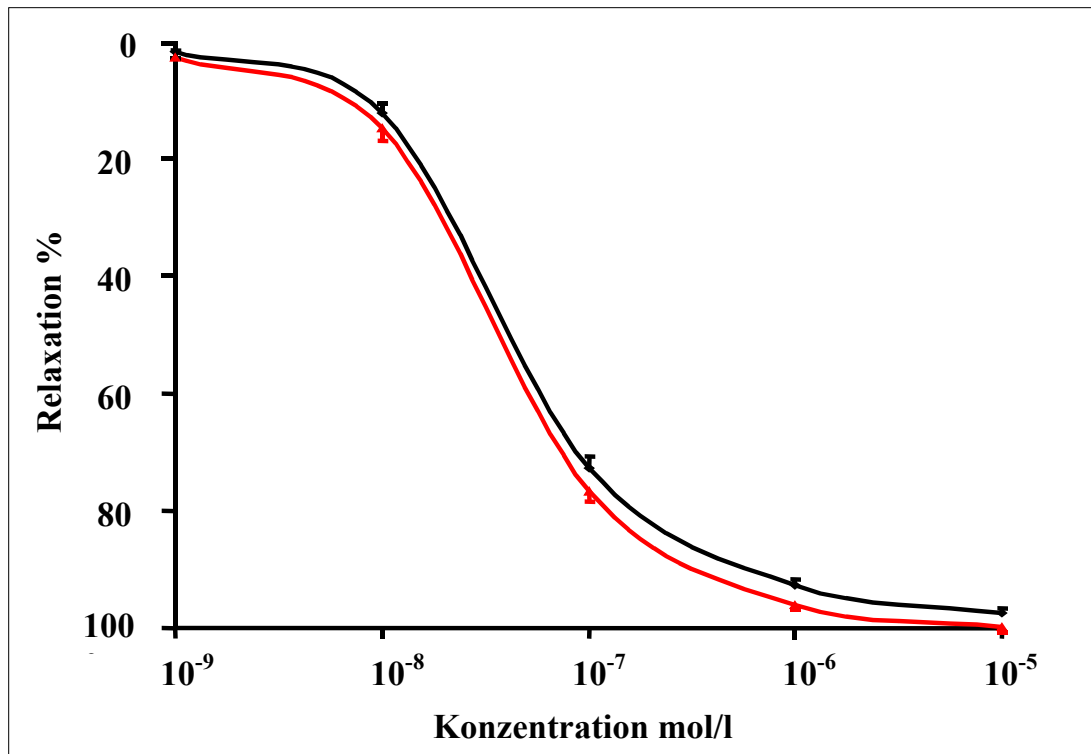


Abb. 25: Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Acetylcholin (Ach) an Gefäßringen der A. carotis von Kaninchen in % der  $PGF_{2\alpha}$ -Kontraktion (=100%):  
 — vor Injektion, — nach Injektion von Argatroban 1,0 mg/kg  
 Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 6

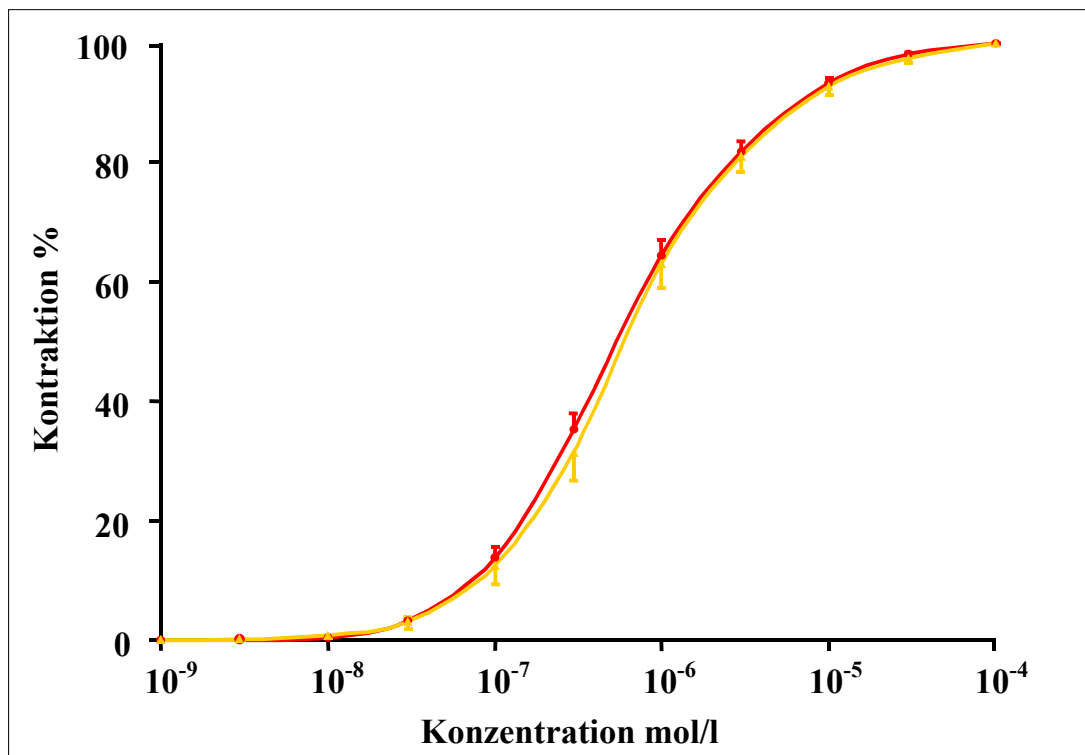


Abb. 26: Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Phenylephrin (Phe) an Gefäßringen der A. carotis von Kaninchen in % des maximalen Effektes:  
 — vor Injektion, — nach Injektion von Argatroban 1,0 mg/kg  
 Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 6

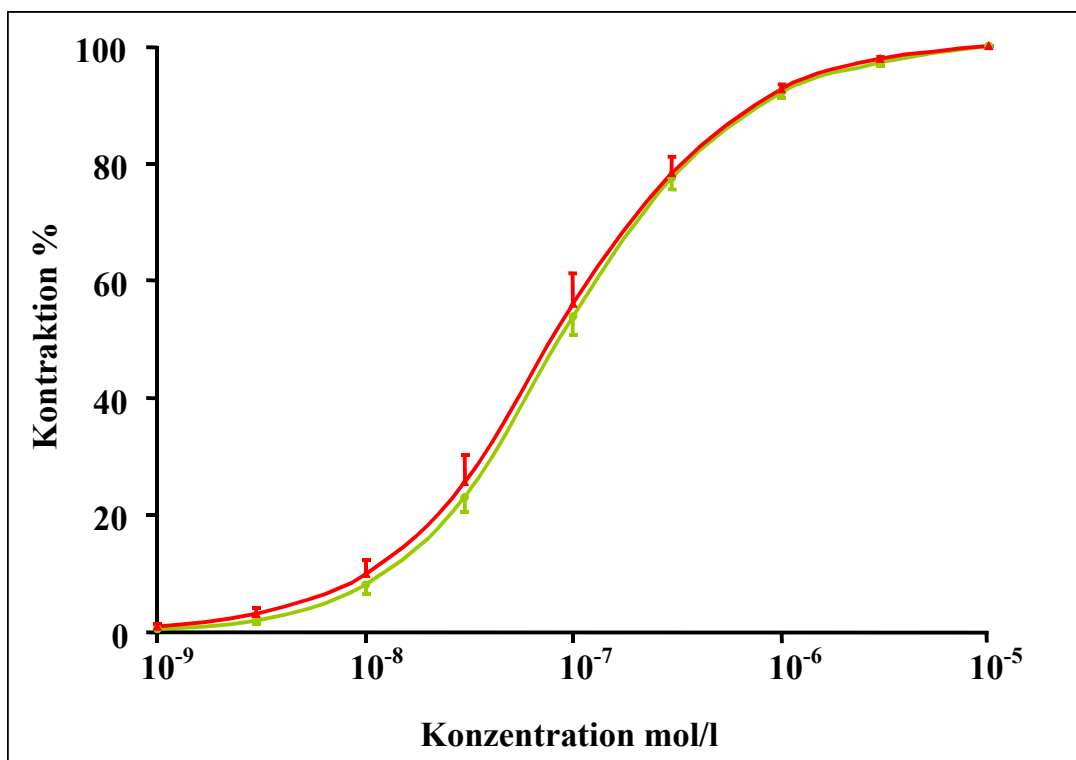


Abb. 27: Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve für 5-HT an Gefäßringen der A. carotis von Kaninchen in % des maximalen Effektes:  
 — vor Injektion, — nach Injektion von Argatroban 1,0 mg/kg  
 Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 6

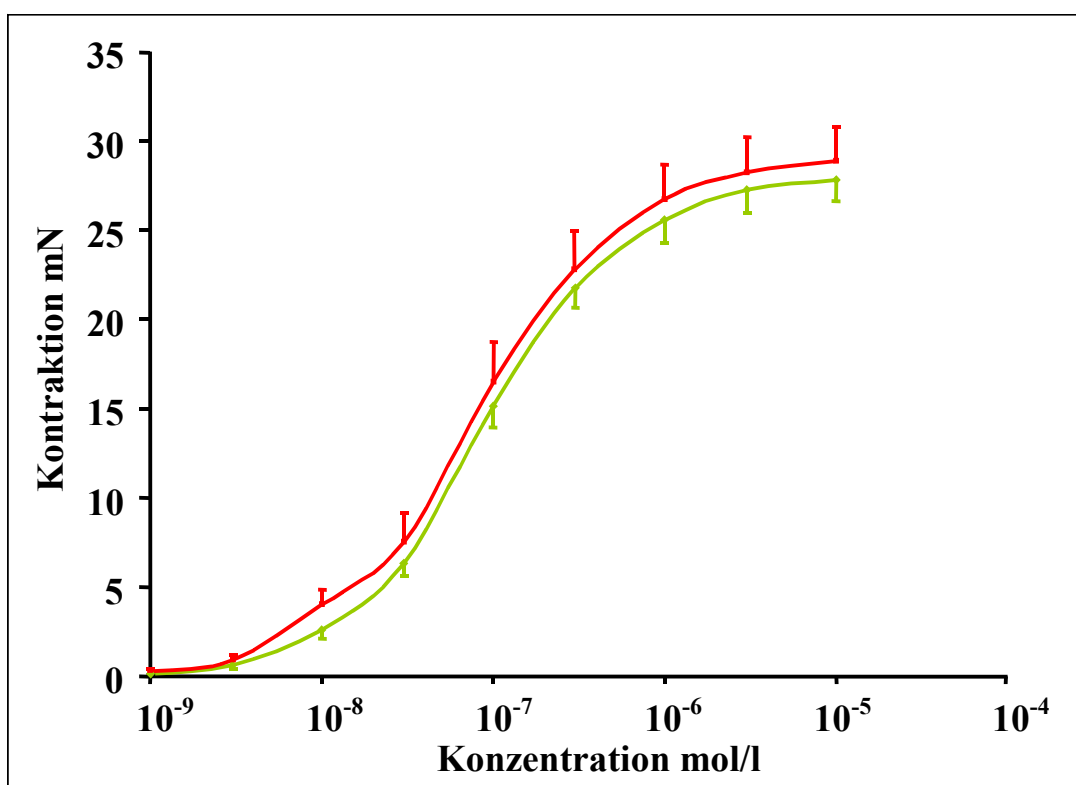


Abb. 28: Kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve für 5-HT an Gefäßringen der A. carotis von Kaninchen in mN:  
 — vor Injektion, — nach Injektion von Argatroban 1,0 mg/kg  
 Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 6

Es schlossen sich nun Versuche an, bei denen der Einfluß von Argatroban auf die durch Arachidonsäure oder PRP-Lysat hervorgerufenen Kontraktionen untersucht wurden. Dazu wurden nach entsprechender Präparation eine A. carotis vor, die zweite 30 min nach Injektion von 0,5 mg Argatroban/kg entnommen. Nach Entfernen des perivaskulären Bindegewebes und Fixierung im Organbad wurden an den Gefäßringen wie bei den vorangegangenen Versuchen Kontraktionen durch Arachidonsäure und PRP-Lysat ausgelöst. Ein Teil der Gefäßringe wurde deendothelialisiert. Beim Vergleich der durch Phe ausgelösten Kontraktionen zeigte sich an den deendothelialisierten Gefäßringen, die vor und nach Injektion entnommen wurden, eine signifikante Wirkungsverstärkung, wobei die Maximalkontraktion an den nach Argatrobaninjektion entnommenen Gefäßen geringer war (Abb. 29), der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

In ähnlicher Weise waren diese Ergebnisse auch bei den durch PRP-Lysat ausgelösten Kontraktionen nachweisbar (Abb. 30). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gefäßringen die vor und nach Injektion von Argatroban entnommen worden waren, konnte jedoch nicht beobachtet werden.

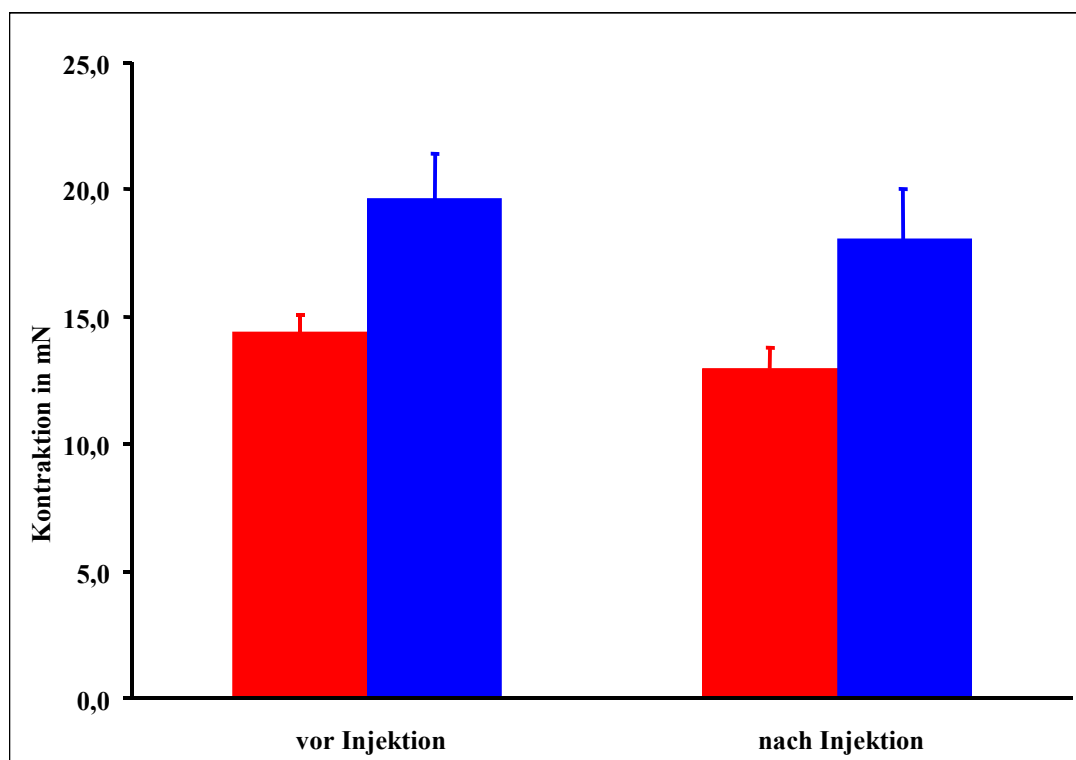


Abb. 29: Kontraktion von Phenylephrin (Konzentration  $3 \times 10^{-6}$  mol/l) an Gefäßen mit ■ und ohne ■ Endothel vor und nach Injektion von 0,5 mg/kg Argatroban in mN. Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 3

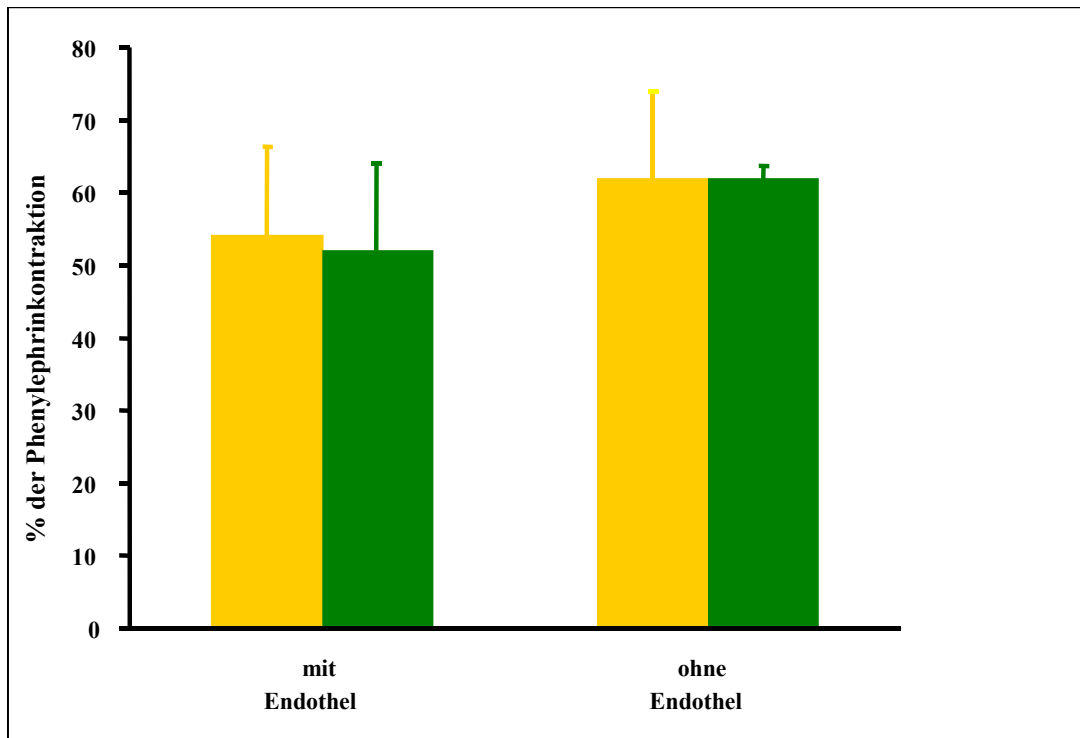


Abb. 30 Kontraktion ausgelöst durch 50  $\mu$ l plättchenreiches Plasma-Lysat an Gefäßen mit und ohne Endothel vor ■ und ■ nach Injektion von 0,5 mg/kg Argatroban in %

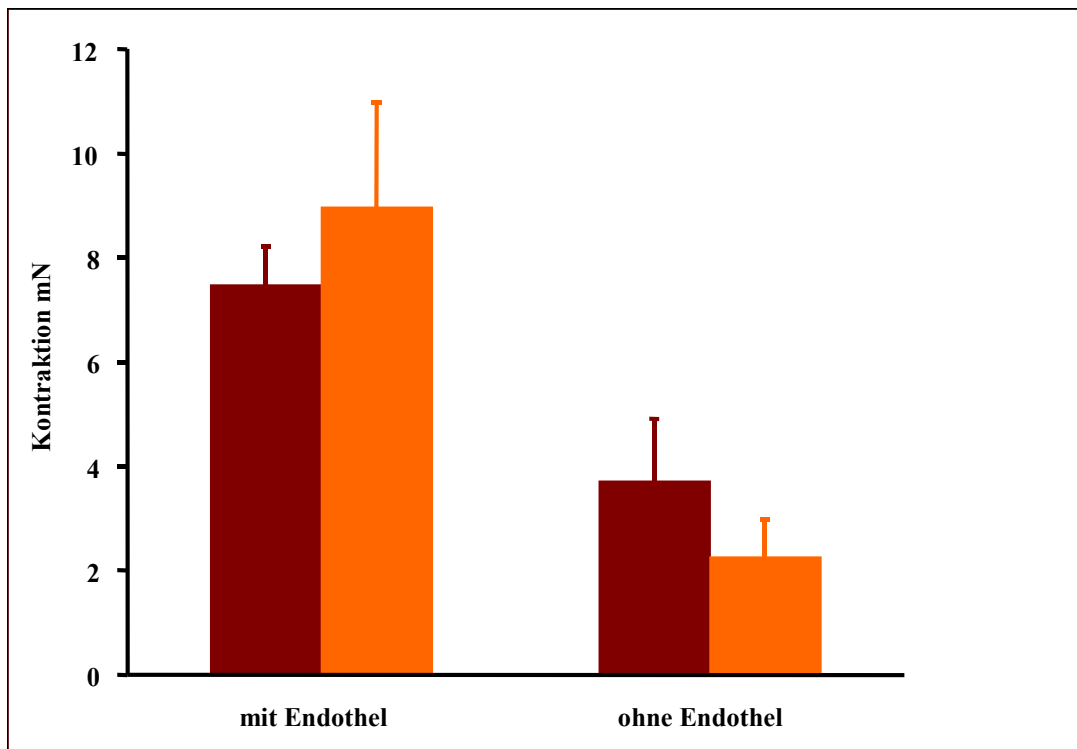


Abb. 31: Durch [Arachidonsäure] (Konzentration  $10^{-5}$  mol/l) ausgelöste Kontraktion in mN der A. carotis ex vivo mit und ohne Endothel vor ■ und nach ■ Injektion von 0,5 mg/kg Argatroban in mN. Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 3



Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Zugabe von Arachidonsäure eine verminderte Maximalkontraktion der deendothelialisierten Gefäßringe. Nach Injektion von Argatroban kam es an den Gefäßringen mit Endothel zu einer verstärkten, an den Gefäßringen ohne Endothel zu einer verminderten Kontraktion (Abb. 31). Die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant.

## 4. Diskussion

Bei der Hämostase und Thrombose spielt die Serinprotease Thrombin, die sich infolge ihrer besonderen Sekundär- und Tertiärstruktur durch eine hohe Substratspezifität auszeichnet, eine zentrale Rolle. Thrombin katalysiert die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin und leitet damit den Blutgerinnungsprozeß im eigentlichen Sinne ein. Darüber hinaus aktiviert Thrombin weitere Blutgerinnungsfaktoren, wie Faktor V, Faktor VIII und Faktor XIII.

Thrombin ist in der Lage, an verschiedenen Zellen und Geweben rezeptorvermittelte Reaktionen auszulösen. Dabei aktiviert Thrombin seinen Rezeptor über proteolytische Spaltung eines Peptids vom extrazellulären N-Terminus (Vu et al., 1991). Der neuentstandene N-Terminus ist jetzt in der Lage, den Rezeptor zu aktivieren und eine intrazelluläre Signaltransduktion auszulösen. Die Aktivierung des Thrombinrezeptors (PAR-1) bewirkt eine Aggregation der Thrombocyten, eine Freisetzung biologisch aktiver Inhaltsstoffe aus den Granula sowie eine Expression der Glycoproteine (GP) II b / III a (Vu et al., 1991). Weitere zelluläre rezeptorvermittelte Wirkungen des Thrombins wurden an Fibroblasten, Makrophagen und Nervenzellen nachgewiesen (Cunningham & Farrell, 1986; Moscat et al., 1987; Kinney et al., 1983). Über die Aktivierung des PAR-1 an Endothelzellen werden die Synthese und Freisetzung von Prostacyclin, tPA, Fibronectin, Thrombomodulin, Plasminogenaktivator, EDRF u.a. vermittelt (Jaffe et al., 1987; De Mey et al., 1982). Thrombin ist somit in der Lage, über endothelvermittelte Prozesse eine Dilatation der Gefäßmuskulatur auszulösen (Glusa & Wolfram, 1988; Glusa, 1992). Die durch Thrombin hervorgerufene Gefäßrelaxation ist vom Gefäßtyp (Gebremedhin et al., 1986; Wolfram, 1987) und von einem intakten Endothel abhängig (Glusa & Markwardt, 1988; Haver & Namm, 1984). An Gefäßen mit geschädigtem Endothel geht die relaxierende Wirkung verloren und eine Gefäßkontraktion durch direkte Aktivierung der glatten Muskelzellen tritt hervor (Glusa et al., 1988; 1996; Glusa, 1992; Garland & Bevan, 1986; Walz et al., 1986). Ku (1982) zeigte an Hundecoronarien nach einer experimentell ausgelösten Myocardischämie, daß die endothelabhängige Relaxation durch Thrombin in eine Vasokonstriktion überging.

Bei kardiovaskulären Erkrankungen mit thromboembolischen Komplikationen, z.B. Myokardinfarkt, ist Thrombin maßgeblich an der Entstehung eines Thrombus, der in der Regel an den Gefäßabschnitten mit Endothelschädigung entsteht, beteiligt. Sowohl in experimentellen als auch in klinischen Untersuchungen wurde gezeigt, daß beim akuten Myokardinfarkt vermehrt Fibrinopeptid A (FPA), Prothrombinfragment 1 + 2 sowie der TAT-Komplex auftreten, die Marker für den Ablauf einer intravasalen Thrombinbildung darstellen (Eisenberg et al., 1985; Nossel et al., 1974; Owen et al., 1988; Ring et al., 1988). Aufgrund seiner mitogenen Eigenschaften auf Fibroblasten, Makrophagen und glatte Muskelzellen kann Thrombin nach Angioplastie zu einer Restenose beitragen (McBride et al., 1988). Somit kommt einer Hemmung der proteolytischen Aktivität des Thrombins eine wichtige pathophysiologische Bedeutung zu.

Zur Therapie bei thromboembolischen Erkrankungen stehen derzeit neben indirekten oralen Antikoagulantien verschiedene Heparine zur Verfügung. Neben unfraktioniertem Heparin gewinnen niedermolekulare Heparine zusehends therapeutische Bedeutung. Heparine benötigen Antithrombin III für ihre gerinnungshemmende Aktivität (Rosenberg & Damus, 1987). Die Effektivität insbesondere des unfraktionierten Heparins ist durch den AT III-Spiegel limitiert. Außerdem ist das an Thrombozyten und Fibrin gebundene Thrombin nicht zugänglich für die Inaktivierung durch den Heparin-Antithrombin III-Komplex (Weitz et al., 1990).

Bei einer Langzeittherapie mit Heparin wurde das Auftreten einer Osteoporose beschrieben. Eine relativ schwere Komplikation nach Heparin-gabe ist die heparininduzierte Thrombocytopenie (HIT). Dabei werden die mit dem Beginn der Heparin-gabe einsetzende Thrombocytopenie Typ I und die nach 5 - 20 Tagen nach Heparin-gabe einsetzende Thrombocytopenie Typ II unterschieden (Greinacher & Eichler, 1995). Während die HIT Typ I aufgrund des geringen Thrombocytopenabfalls eine relativ harmlose Begleiterscheinung ist, kann die durch eine immunologische Reaktion gegen einen Komplex aus Heparin und dem Plättchenfaktor-4 (PF4)-Aggregaten hervorgerufene HIT Typ II zu einer lebensbedrohlichen Situation führen (Greinacher & Eichler, 1995). Der Grund dafür ist ein extrem erhöhtes Thromboserisiko mit der Gefahr von arteriellen Gefäßverschlüssen durch eine IgG vermittelte Aktivierung von Thrombozyten, Schädigung von Endothelzellen und eine IgG vermittelte Bildung von hochthrombogenen Mikropartikeln aus

Thrombozyten (Chong et al., 1989; King & Kelton, 1984). Neben einer sofortigen Heparinkarenz ist eine Fortsetzung der Antikoagulation essentiell (Matsuo et al., 1992).

Die Antikoagulation bei der Thrombozytopenie Typ II erfolgt derzeit hauptsächlich mit dem Heparinoid Orgaran<sup>®</sup>, das sich durch ein niedriges Molekulargewicht und einen geringeren Sulfatierungsgrad bei Heparin-ähnlicher Wirkung auszeichnet. In seltenen Fällen können jedoch Kreuzreaktionen auftreten. Diese sind aufgrund der anderen chemischen Struktur bei dem jetzt rekombinant vorliegenden Peptid Hirudin ausgeschlossen. Hirudin braucht im Gegensatz zu den Heparinen für die Inaktivierung des Thrombins keine Kofaktoren. Auch zeichnet sich Hirudin durch eine geringere Blutungsgefahr und eine gute Wirkungsüberwachung durch die aPTT aus (Markwardt, 1989).

In den letzten Jahren wurde intensiv an der Entwicklung neuer, direkt wirkender niedermolekularer Thrombininhibitoren gearbeitet (Stürzebecher & Markwardt, 1982; Stürzebecher et al., 1983; Hauptmann & Stürzebecher, 1999). Eine wichtige Voraussetzung dafür war die Aufklärung der strukturellen Eigenschaften des Thrombins durch die Röntgenkristallstrukturanalyse (Bode & Stubbs, 1995) und die systematische Untersuchung der Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen Thrombin und den Pancreasenzymen Trypsin und Chymotrypsin. Zu den ersten kleinmolekularen direkten Thrombininhibitoren gehört u.a. D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketon, das direkt das aktive Zentrum des Thrombins blockiert (Bode et al., 1992). Diese Thrombininhibitoren führen nicht nur zu einer Hemmung der enzymatischen Aktivität des Thrombins, sondern unterbrechen auch die durch Thrombin ausgelösten zellulären Effekte (Fareed, 1981; White et al., 1984; Glusa et al., 1995; Glusa, 1988). Als hoch wirksame Thrombininhibitoren erwiesen sich auch Benzamidinderivate wie  $\alpha$ -NAPAP (Kaiser & Markwardt, 1986; Stürzebecher et al., 1983). Die zuletzt genannte Verbindung wirkte im Tierexperiment antikoagulatorisch und antithrombotisch (Hauptmann et al., 1985). Darüber hinaus war  $\alpha$ -NAPAP auch in der Lage, die durch Thrombin ausgelösten vasculären Effekte zu blockieren (Glusa, 1992; 1988).

Okamoto et al. entwickelten 1978 mit dem Argatroban einen selektiven synthetischen Thrombininhibitor (Kobayashi & Tazaki, 1997). Argatroban wird vorwiegend hepatisch metabolisiert und biliär ausgeschieden (Kikumoto et al., 1984). Seine Halbwertszeit be-

trägt 26-36 min (Iida et al., 1986). Die antikoagulatorische und antithrombotische Wirkung wurde sowohl in Tierexperimenten als auch in klinischen Studien nachgewiesen (Duval et al., 1996; Kobayashi & Tazaki, 1997; Matsuo et al., 1992; 1997; Schumacher et al., 1996; Tamao & Kikumoto, 1997; Winn et al., 1993). Der antithrombotische Effekt des Argatroban konnte auch bei einem Antithrombin III-Mangel im Tierexperiment nachgewiesen werden (Kumada & Abiko, 1981).

Ein weiterer Vorteil von Argatroban stellt die geringe Molekülgröße dar, so daß auch an Fibrin gebundenes Thrombin inaktiviert werden kann, welches bei der Thrombolysen freigesetzt wird (Fenton, 1986; Berry et al., 1994). Mellott et al. (1990) zeigten an arteriellen Thrombosen bei Hunden, daß sich weder durch Heparin, noch durch den 5-HT-Rezeptorantagonisten Ketanserin und den Thromboxan A<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten L-691, 574, wohl aber durch Argatroban eine Reocclusion nach tPA-Lyse verhindern ließ (Clark et al., 1991; Iida et al., 1986).

Hara et al. (1986) konnten eine Hemmung der durch Thrombin ausgelösten Thrombocytenaggregation nachweisen. An isolierten Coronargefäßen von Hunden konnte gezeigt werden, daß Argatroban die vasokonstriktorischen Effekte des Thrombins hemmt (Winn et al., 1993).

Aufgrund der vorteilhaften antithrombotischen und antikoagulatorischen Eigenschaften wird Argatroban in verschiedenen Ländern bei der HIT II eingesetzt.

Auch laufen klinische Studien, die einen Einsatz von Argatroban bei der Haemodialyse, insbesondere bei Patienten mit AT III-Mangel, bei der DIC, nach PTCA und bei akuten ischämischen Hirninfarkten, prüfen (Ota et al., 1983; Hara et al., 1987; Kumon et al., 1984; Matsuo et al., 1990; 1992; 1997; Kobayashi & Tazaki, 1997).

Bei Patienten wurde 24 h nach einer Therapie mit Argatroban eine vermehrte Nitritauscheidung als Ausdruck einer vermehrten NO-Bildung gemessen (Fareed, persönliche Mitteilung).

Es wäre denkbar, daß Argatroban als eine Arginin enthaltende Verbindung über die Bereitstellung der terminalen Guanidinogruppe des Arginins zu einer endothelabhängigen Relaxation führt. Für Arginin und kleine Peptide, die Arginin enthalten, wurde dies bereits in einigen experimentellen Untersuchungen nachgewiesen (Arnal et al. 1995; Pucci et al., 1995; Cooke et al., 1992).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Argatroban an Gefäßringen der A. carotis von Kaninchen *in vitro* und *ex vivo* an der endothelabhängigen Relaxation durch Acetylcholin an Prostaglandin<sub>2α</sub>- bzw. Phenylephrin-vorkontrahierten Gefäßringen geprüft.

Es bestätigte sich, daß Acetylcholin konzentrationsabhängig zu einer Gefäßrelaxation führt, die bereits andere Autoren in verschiedenen experimentellen Untersuchungen beschrieben (Furchgott & Zawadzki, 1980; Winn et al., 1993). Nach einer Deendothelialisierung der Gefäßringe war die Acetylcholin-induzierte Gefäßrelaxation aufgehoben. Die Kontraktion durch Phenylephrin war signifikant angestiegen. Somit konnte auch an der A. carotis von Kaninchen eine Endothelabhängigkeit der Acetylcholin-induzierten Gefäßrelaxation nachgewiesen werden. Eine Vorinkubation der Gefäßringe mit Indometazin hatte keinen Einfluß auf die endothelabhängige Relaxation durch Acetylcholin. Die Unabhängigkeit der endothelabhängigen Relaxation von Cyclooxygenaseprodukten wurde bereits durch mehrere Autoren in verschiedenen experimentellen Untersuchungen beschrieben (Furchgott & Zawadzki, 1980; Furchgott, 1988; Angus & Cocks, 1989).

Sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* kam es nach Vorbehandlung mit dem NO-Synthase-Hemmer N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) zu einer signifikanten Hemmung der endothelabhängigen Relaxation durch Acetylcholin. Außerdem war durch L-NAME eine verstärkte Kontraktion durch PGF<sub>2α</sub> und Phenylephrin nachweisbar. Das entspricht den Beobachtungen von Marin and Sanchez-Ferrer (1990) die ebenfalls eine Hemmung der NO-Freisetzung durch L-NAME beschrieben.

Bei den *Ex-vivo*-Untersuchungen kam es bei einer Dosis von 1 mg/kg Argatroban zu keiner Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Acetylcholin im Vergleich zu den Kontrollen. Zum gleichen Ergebnis kamen Winn et al. (1993), die an isolierten Coronararterien von Hunden ebenfalls keine signifikant verbesserte Relaxation fanden. Eine Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven für 5-HT und Phenylephrin konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Offenbar ist es nicht möglich, an Gefäßen mit intaktem Endothel eine vermehrte NO-Bildung durch die NO-Synthase zu induzieren, indem man Arginin als Enzymsubstrat bereitstellt, da L-Arginin in ausreichenden Mengen zur Verfügung steht.

Zu diesem Ergebnis kamen auch mehrere Autoren. So zeigten Pucci et al. (1995), daß an mit Phenylephrin vorkontrahierten Aortenringen von normotensiven Ratten L-Arginin zu keiner Relaxation führt. Arnal et al. (1995) beobachteten an kultivierten Schweineaortaendothelien und Kaninchenaortenringen durch eine Vorinkubation mit L-Arginin keine Änderung der NO-Freisetzung bzw. Verstärkung der endothelabhängigen Gefäßrelaxation durch Acetylcholin.

Bei verschiedenen cardiovasculären Risikofaktoren kommt es zu einer Abschwächung der endothelinduzierten Vasodilatation. So ist die endothelabhängige Relaxation bei Patienten mit Hypertonie nach i.a. Injektion von Acetylcholin in die Unterarmzirkulation bzw. in den Koronarkreislauf reduziert (Taddei et al., 1992; 1993; Linder et al., 1990). Coronarangiografisch konnte eine direkte Korrelation zwischen dem Schweregrad der Koronarsklerose und der Abschwächung der Acetylcholin-induzierten Vasodilatation gezeigt werden (Böger et al., 1996). Panza et al. (1993) wiesen in der Unterarmzirkulation von Patienten mit arterieller essentieller Hypertonie zudem eine verminderte Vasokonstriktion nach i.a. Injektion von N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) als Hinweis auf eine reduzierte basale NO-Freisetzung nach. Möglicherweise ist u.a. die vermehrte Bildung von endogenen, kompetitiven NOS-Inhibitoren wie dem asymmetrischen Dimethylarginin (ADMA) dafür verantwortlich. Erhöhte Spiegel wurden wie bereits eingangs beschrieben bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit, jungen Patienten mit asymptomatischer Hypercholesterinämie und am Tiermodell des Cholesteringefütterten Kaninchens nachgewiesen (Böger et al., 1997; Bode-Böger et al., 1997; 1996). Ein Überangebot von L-Arginin könnte die kompetitive Hemmung der NO-Synthase durch endogene NO-Synthase -Inhibitoren aufheben.

In diesem Zusammenhang wurden Versuche durchgeführt, bei denen durch kompetitive Hemmstoffe der NO-Synthase - L-NAME bzw. L-Glutamin - eine Enzymaktivierung mit deutlicher Reduzierung der Acetylcholin-induzierten Relaxation erkennbar ist. Eine Vorinkubation der Gefäße mit L-Arginin bewirkte nun eine teilweise Aufhebung, der kompetitiven Hemmung der NO-Synthase durch L-NAME bzw. L-Glutamin und führte zu einer verbesserten Relaxation.

Zum gleichen Ergebnis kamen Arnal et al. (1995), die an kultivierten Schweineaortaendothelien und Kaninchenaortaringen durch L-Arginin eine dosisabhängige Aufhebung der Hemmung der rezeptorstimulierten NO-Freisetzung durch L-Glutamin fanden.

In anderen Experimenten beschrieben Pucci et al. (1995) an mit Phenylephrin vorkontrahierten Aortaringen von Ratten mit Angiotensin-abhängiger Hypertension sowohl eine endothelabhängige als auch eine endothelunabhängige Relaxation durch L-Arginin.

An Kaninchen mit ausgeprägter Arteriosklerose führte eine L-Argininzufuhr über einen längeren Zeitraum zu einer Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation (Cooke et al., 1992). An 34 Patienten mit instabiler Angina pectoris zeigten Chauhan et al. (1996), daß sich die coronare Durchblutung durch eine Acetylcholininfusion mit zunehmendem Alter der Patienten, bedingt durch eine höhergradige Endothelschädigung, nicht steigern ließ. Diese endotheliale Dysfunktion konnte durch eine intracoronare L-Arginin-Infusion vermindert werden. Bode-Böger et al. (1996) beobachteten bei Patienten mit einer peripheren arteriellen Verschußkrankheit die höhere ADMA-Plasmakonzentrationen als die gesunden Kontrollpersonen aufwiesen, daß eine kontinuierliche Infusion von L-Arginin zu einer peripheren Vasodilatation, vergleichbar mit dem in der Klinik eingesetzten PGE<sub>1</sub>, führt. Die Autoren haben im Urin der Patienten eine deutlich gesteigerte Nitritausscheidung und cGMP Exkretionsraten als ein Maß für die endogene NO Bildung im Urin gemessen.

Nach kontinuierlicher Infusion von L-Arginin wurde bei Patienten mit pulmonaler Hypertension eine Senkung des pulmonalen Druckes nachgewiesen (Mehta et al., 1995).

Auch konnte eine verbesserte endothelabhängige Vasodilatation in den Widerstandsgefäßen des Unterarmes bei Patienten mit Hypertonie nach i.v. Infusion von L-Arginin nachgewiesen werden (Calver et al., 1992).

Argatroban führte in einer Konzentration von  $10^{-6}$  mmol/l nur zu einer geringfügigen Abschwächung der NO-Synthase-Hemmung durch L-Glutamin und L-NAME. Sowohl bei einer Erniedrigung als auch bei einer Erhöhung der Argatroban-Konzentration kam es zu einer Verringerung dieses Effektes. Letzteres ist möglicherweise aufgrund einer zu geringen Versuchszahl nicht verwertbar. Insgesamt muß gesagt werden, daß Argatroban als NO-Donator keinen wesentlichen Einfluß auf die NO-Sythese am intakten Gefäß hat. Durchaus denkbar wäre jedoch ein Einfluß von Argatroban am arteriosklerotisch veränderten Gefäß. Andeutungsweise war dieser Trend bei den Versuchen mit L-NAME und L-Glutamin zu erkennen.



Fareed et al. (persönliche Mitteilung) fanden bei Untersuchungen an Hunden eine Beeinflussung der durch Arachidonsäure und plättchenreiches Plasma (PRP) hervorgerufenen Kontraktion durch Argatroban. Arachidonsäure führte an Gefäßringen der A. carotis von Kaninchen zu einer Kontraktion, die nach Vorinkubation der Präparate mit den Thromboxanantagonisten Daltroban und BAY U 345 fast vollständig gehemmt wurde. Eine Deendothelialisierung bewirkte eine Verminderung der maximalen, durch Arachidonsäure ausgelösten Kontraktion. Die nach Injektion von 0,5 mg/kg Argatroban entnommenen Gefäße zeigten keine signifikante Veränderung der Kontraktion durch Arachidonsäure.

Weiterhin wurde geprüft, ob die durch PRP ausgelöste Kontraktion auch durch Argatroban beeinflusst wird. Weder der  $\alpha_1$ -Adrenorezeptorantagonist Prazosin noch die Thromboxanrezeptor-Antagonisten Daltroban und BAY U 345 und der reversible Cyclooxygenaseantagonist Indometazin hatten einen signifikanten Einfluß auf die durch PRP ausgelöste Kontraktion. Die starke Kontraktion durch PRP war jedoch durch die 5-HT-Rezeptorantagonisten Ketanserin und Cyproheptadin vollständig antagonisierbar. Da entweißtes PRP eine vergleichbare prompte Kontraktion aufwies, war anzunehmen, daß ein niedermolekularer wasserlöslicher Stoff für die Kontraktion verantwortlich sein mußte. Wahrscheinlich handelte es sich dabei um Serotonin, welches durch das Einfrieren und Auftauen der Proben aus geschädigten Thrombocyten ausgetreten war.

Nach Vorinkubation der Gefäße mit Argatroban konnte keine Veränderungen der kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für PRP festgestellt werden. Dies war aufgrund der Vorversuche, bei denen Argatroban keinen Einfluß auf die durch Serotonin ausgelöste Kontraktion zeigte, anzunehmen.

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht hervor, daß durch Argatroban am intakten Gefäß *in vitro* keine signifikanten Veränderungen der geprüften endothelabhängigen Gefäßkontraktionen und -relaxationen hervorgerufen werden. Argatroban allein besitzt keinen vasoaktiven Effekt. Auch nach intravenöser Applikation zeigten die Gefäße im Vergleich zu den Kontrollen keine Veränderungen in ihrem Relaxations- und Kontraktionsverhalten.

Veränderungen der Gefäßkontraktion und -relaxation treten an der isolierten A. carotis von Kaninchen nur dann auf, wenn die NO-Synthese durch L-NAME blockiert wurde.

Wahrscheinlich ist hierfür das im intakten Endothel in ausreichender Konzentration vorhandene Substrat der NO-Synthase L-Arginin verantwortlich, so daß eine Steigerung der Enzymaktivität nicht durch den N-Donator Argatroban hervorgerufen werden kann.

Zukünftig sollten sich Untersuchungen mit Argatroban auf arteriosklerotisch veränderte Gefäße konzentrieren, die möglicherweise einen Einfluß von Argatroban auf die endothelabhängige Vasodilatation belegen können, da Arginin als endogenes Substrat der NO-Synthase im intakten Endothel in ausreichenden Mengen zur Verfügung steht und erst im arteriosklerotisch veränderten Gefäß ein Substratmangel zu verzeichnen ist.

Bei den durchgeführten Gerinnungsanalysen wurde nach einer einmaligen Injektion von 1mg/kg Argatroban nach 5 min eine Verdopplung, nach einer Injektion von 0,5 mg/kg eine 1,5fache Verlängerung der aPTT bestimmt. Entsprechend der Halbwertszeit von Argatroban wurde nach etwa einer Stunde wieder die normale aPTT erreicht. Die TT war noch nach einer Stunde bei einer Argatroban-Dosis von 1,0 mg/kg auf das 3,1fache, bei einer Dosis von 0,5 mg/kg auf das 2,1fache verlängert. Somit wurde die Wirkung von Argatroban als Thrombininhibitor auch ex vivo bestätigt.

In der Literatur wurde durch Green et al. (1985) in vitro Versuchen eine Verdopplung der aPTT bei einer Argatroban Konzentration von 1,0-0,1  $\mu$ M beschrieben.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß des kompetitiven synthetischen Thrombininhibitors Argatroban an der A. carotis von Kaninchen in vitro und ex vivo untersucht. Da in der Literatur nur wenige Experimente an der A. carotis von Kaninchen beschrieben wurden, war es notwendig, einführend grundsätzliche Gefäßreaktionen zu prüfen.

Narkotisierten Kaninchen wurden bei in vitro Versuchen die A. carotis beiderseits, bei ex vivo Versuchen je ein Gefäß vor das andere nach Injektion der zu testenden Substanz, entnommen. Anschließend wurden die Aa. carotes in ca. 2-3 mm große Ringe geschnitten und in einem Organbad fixiert. Nach einer 60 minütigen Adaptationszeit wurden an den Gefäßringen Kontraktionen durch Kaliumchlorid und Prostaglandin<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) ausgelöst, die isometrisch mit einem HSE Kraftaufnehmer gemessen wurden. Danach schlossen sich kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Serotonin (5-HT) und Phenylephrin (Phe) an. Der mittlere EC<sub>50</sub> –Wert für die Kontraktion durch Phe lag bei  $6 \times 10^{-7}$  mol/l, der für 5-HT bei  $9 \times 10^{-8}$  mol/l. An deendothelialisierten Gefäßen war die durch Phe ausgelöste Kontraktion signifikant größer. Darüber hinaus wurden Kontraktionen durch PGF<sub>2α</sub> und Arachidonsäure ausgelöst.

An PGF<sub>2α</sub>-vorkontrahierten Gefäßringen mit intaktem Endothel ließ sich durch Acetylcholin konzentrationsabhängig eine kurzfristige reversible Relaxation auslösen. An deendothelialisierten Gefäßringen wurde die Acetylcholin-induzierte Relaxation vollständig aufgehoben.

Eine Hemmung der Eicosanoide durch den Cyclooxygenaseinhibitor Indometazin hatte keinen Einfluß auf die Acetylcholin-induzierte Relaxation. Die Acetylcholin-induzierte Relaxation wurde durch L-NAME, das die NO-Synthese blockiert, sowohl in vitro als auch nach Injektion von 100 mg/kg L-NAME signifikant vermindert, so daß die Acetylcholin-induzierte Relaxation wahrscheinlich durch NO vermittelt wird. Gleiches konnte bei dem NO-Synthase-Hemmer L-Glutamin, wenn auch in geringerer Ausprägung, beobachtet werden.

Durch L-NAME kam es in vitro und ex vivo zu einer geringfügigen, nicht signifikanten Zunahme der durch PGF<sub>2α</sub> und Phe hervorgerufenen Kontraktionen.

L-Arginin, das endogene Substrat der NO-Synthase, bewirkte eine Reduktion der durch

L-NAME und L-Glutamin hervorgerufenen Verminderung der Acetylcholin-induzierten Relaxation.

Argatroban hatte auf Gefäße mit intaktem Endothel *in vitro* weder einen kontrahierenden noch einen relaxierenden Effekt. Eine verstärkte Acetylcholin-induzierte endothelabhängige Relaxation konnte ebenso nicht nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion der durch L-NAME und L-Glutamin hervorgerufenen Verminderung der Acetylcholin-induzierten Relaxation durch Argatroban *in vitro*.

Narkotisierten Kaninchen wurde eine A. carotis vor *i.v.* Injektion von 1,0 mg/kg Argatroban, die andere 30 min danach, entfernt. Argatroban hatte keine Verschiebung der kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Phe und 5-HT *ex vivo* zur Folge. Die durch Phe-ausgelöste Maximalkontraktion an Gefäßen die nach *i.v.* Injektion von Argatroban entnommen wurden, war – wenn auch nicht signifikant – geringer als die der Gefäße die vor Injektion entnommen wurden.

Die Annahme, daß Argatroban als ein Argininderivat am intakten Gefäß eine verbesserte NO-vermittelte Acetylcholin-induzierte Relaxation bewirkt, bestätigte sich nicht.

Aus der A. femoralis der Kaninchen wurden vor und nach Injektion von Argatroban Blutproben zur Messung der Blutgerinnung entnommen. Die Gerinnungsanalysen belegten den Effekt von Argatroban als Thrombininhibitor. Es kam sowohl zu einer Verlängerung der Thrombinzeit als auch der aPTT.

Die durchgeführten Experimente beschränkten sich überwiegend auf Gefäße mit intaktem Endothel, auf die Argatroban keine Wirkung hatte. Andeutungsweise zeigte sich eine verbesserte Acetylcholin-induzierte Relaxation durch Argatroban, nachdem die NO-Synthase durch L-NAME bzw. L-Glutamin kompetitiv gehemmt wurde. Da insbesondere am arteriosklerotisch veränderten Gefäß eine gestörte NO-Synthese zu beobachten ist, ist anzunehmen, daß hier möglicherweise, ähnlich wie bereits experimentell für L-Arginin nachgewiesen, ein gefäßrelaxierender Effekt für Argatroban vorhanden sein könnte. In weiterführenden Experimenten sollte die Wirkung von Argatroban auf arteriosklerotisch veränderte Gefäße untersucht werden.

## 6. Literaturverzeichnis

ANGUS JA, COCKS TM.

Endothelium-derived relaxing factor.

Pharmac Ther 1989; 41: 303 - 351.

ARNAL JF, MÜNZEL T, VENEMA RC, JAMES NL, BAI C, MITCH WE,  
HARRISON DG.

Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production.

J Clin Invest 1995; 7: 2565 - 2572.

AZUMA H, ISHIKAWA M, SEKIZAKI S.

Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation.

Br J Pharmacol 1986; 88: 411 - 415.

BASSENGE E, BUSSE R.

Endothelial modulation of coronary tone.

Prog Cardiovasc Dis 1988; 30: 349 - 380

BASSENGE E, HEUSCH G.

Endothelial and neuro-humoral control of coronary blood flow in health and disease.

Rev Physiol Biochem Pharmacol 1990; 116: 77 - 165.

BASSENGE E, ZANZINGER J.

Nitrates in different vascular beds, nitrate tolerance and interactions with endothelial function.

Am J Cardiol 1992; 70: 23 B - 29 B

BENNETT BM, LEITMANN C, SCHRÖDER H, KAWAMOTO JH, NAKATSU K,  
MURAD F.

Relationship between biotransformation of glyceryl trinitrate and cyclic GMP accumulation in various cultured cell lines.

J Pharmacol Exp Ther 1989; 250: 316 - 323.

BENNETT BM, MCDONALD BJ, JAMES MJ ST.

Hepatic cytochrome P-450-mediated activation of rat aortic guanylyl cyclase by glyceryl trinitrate.

J Pharmacol Exp Ther 1992; 261: 716 - 723.

BERRY CN, GIARDOT C, LECOFFRE C, LUNVEN C.

Effects of the synthetic thrombin inhibitor argatroban on fibrin- or clotincorporated thrombin: comparison with heparin and recombinant hirudin.

Thromb Haemost 1994; 72: 381 - 386.

BODE W, STUBBS MT.

Die Raumstruktur des Thrombins: ein Wegweiser zu seinen vielfältigen Funktionen. Hämostaseologie 1995; 15: 1 - 13.

BODE W, TURK D, KARSHIKOV A.

The refined 1.9 Å X-ray crystal structure of D-Phe-ProArg chloromethylketone inhibited human  $\alpha$ -thrombin. Structure analysis, overall structure, electrostatic properites, detailed active site geometry, structure-function relationship.

Protein Sci 1992; 1: 426 - 471.

BODE-BÖGER SM, BÖGER RH, ALFKE H, HEINZEL D, TSIKAS D, CREUTZIG A, ALEXANDER K, FRÖLICH JC.

L-arginine induces NO-dependent vasodilation in patients with critical limb ischemia - a randomized, controlled study.

Circulation 1996; 93: 85 - 90.

BODE-BÖGER SM, BÖGER RH, FRÖLICH JC.

Antiarteriosklerotische Wirkungen durch Stimulation der endogenen NO-Synthese.

Internist 1997; 38: 461 - 465.

BODE-BÖGER SM, BÖGER RH, KIENKE S, JUNKER W, FRÖLICH JC.

Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits.

Biochem Biophys Res Commun 1996; 219: 598 - 603

BÖGER RH, BODE-BÖGER SM, FRÖLICH JC.

The L-arginine: nitric oxide pathway: Role in atherosclerosis and therapeutic implications.

Atherosclerosis 1996; 127: 1 - 11

BÖGER RH, BODE-BÖGER SM, MÜGGE A, KIENKE S, BRANDES R, DWENGER A, FRÖLICH JC. Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production.

Atherosclerosis 1995; 117: 273 - 284.

BÖGER RH, BODE-BÖGER SM, THIELE W, JUNKER W, ALEXANDER K, FRÖLICH JC.

Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease.

Circulation 1997; 95: 2068 - 2074

BÖGER RH, SCHELLONG SM, BODE-BÖGER SM, GALLAND A, BURCHERT W, FRÖLICH JC.

L-arginine increases nutritive muscular blood flow determined by positron emission tomography (PET) in patient with peripheral arterial occlusive disease.

Circulation 1996; 94 (Suppl): 1 - 543

BOSSALLER C, HABIB GB, YAMAMOTO H, WILLIAMS C, WELLS S, HENRY PD.

Impaired muscarinic endothelium-dependent relaxation and cyclic guanosine 5'-monophosphate formation in arteriosclerotic human coronary artery and rabbit aorta.

J Clin Invest 1987; 79: 170 - 174.

BOTTING R, VANE JR .

Mediators and the anti-thrombotic properties of the vascular endothelium.

Ann Med 1989; 21: 31 - 38.

BRIEN JF, MCLAUGHLIN BE, BREEDON TH, BENNETT BM, NAKATSU K,  
MARKS GS.

Biotransformation of glyceryl trinitrate occurs concurrently with relaxation of rabbit aorta.

J Pharmacol Exp Ther 1986; 237: 608 - 614.

BUSH LR.

Argatroban a selective, potent thrombin inhibitor.

Cardiovasc Drug Rev 1991; 3: 247 - 263.

BUSSE R.

Die Rolle endothelialer Autakoide für Vasomotion und Hämostase.

Hämostaseologie 1989; 9: 217 - 226

BUSSE R, MÜLSCH A, BASSENGE E.

Vasoconstriction elicits release of NO from isolated conduit and resistance-sized arteries by a shear stress-dependent mechanism.

Pflügers Arch 1991; 418 (Suppl. 1): R 103.

CALVER A, COLLIER J, MONCADA S, VALLANCE P.

Effect of local intra-arterial N<sup>G</sup>-mono-methyl-L-arginin in patient with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears normal.

J Hypertens 1992; 10: 1025 - 1031.

CHAUHAN A, MORE RS, MULLINS PA, TAYLOR G, PETCH MC,  
SCHOFIELD PM.

Aging-associated endothelial dysfunction in humans is reversed by L-arginine.

J Am Coll Cardiol 1996; 28: 1796 - 1804.



CHONG BH, FAWAZ I, CHESTERMAN CN, BERNDT MC.

Heparin-induced thrombocytopenia. Mechanism of interaction of the heparin-dependent antibody with platelets.

Br J Haematol 1989; 73: 235 - 240.

CLARKE RJ, MAYO G, FITZGERALD GA, FITZGERALD DJ.

Combined administration of aspirin and a specific thrombin inhibitor in man. Circulation 1991; 83: 1510 - 1518.

COHEN RA.

The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular diseases.

Prog Cardiovasc Dis 1995; 38: 105 - 128.

COOKE JP, ANDON NA, GIRERD XJ, HIRSCH AT, CREAGER MA.

Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta.

Circulation 1991; 83: 1057 - 1062.

COOKE JP, SINGER AH, TSAO P, ZERA P, ROWAN RA, BILLINGHAM ME.

Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit.

J Clin Invest 1992; 90: 1168 - 1172.

COOKE JP, TSAO PS.

Cytoprotective effects of nitric oxide.

Circulation 1993; 88: 2451 - 2453.

CUNNINGHAM DD, FARRELL DH.

Thrombin interactions with cultured fibroblasts: Relationship to mitogenic stimulation.

Ann NY Acad Sci USA 1986; 485: 240 - 248.

DE MEY JG, CLAEYS M, VANHOUTTE PM.

Endothelium-dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine triphosphate, thrombin and arachidonic acid in the canine femoral artery.

J Pharmacol Exp Ther 1982; 222: 166 - 173.

DREXLER H, ZEIHNER AM, MEINZER K, JUST H.

Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine.

Lancet 1991; 338: 1546 - 1550.

DUVAL N, LUNVEN DP, O'BRIEN A, GROSSET SE, O'CONNOR R, BERRY CN.

Antithrombotic actions of the thrombin inhibitor, argatroban, in a canine model of coronary cyclic flow: comparison with heparin.

Br J Pharmacol 1996; 118: 727 - 733.

EISENBERG PR, SHERMAN LA, SCHECTMAN K, PEREZ J, SOBEL BE, JAFFE AS.

Fibrinopeptide A: a marker of acute coronary thrombosis.

Circulation 1985; 71: 912 - 918.

FAREED J, MESSMORE HL, KINDEL G, KARZMAR AG, FENTON JW.

Thrombin induced contraction of isolated smooth muscles.

Thromb Haemost 1981; 46: 0634.

FENTON JW II.

Thrombin.

Ann NY Acad Sci USA 1986; 485: 912 - 927.

FÖRSTER S, WODITSCH I, SCHRÖDER H, SCHRÖR K.

Reduced nitric oxide release causes nitrate tolerance in the intact coronary circulation.

J Cardiovasc Pharmacol 1991; 17: 867 - 872.

FÖRSTERMANN U, CLOSS EI, POLLOCK JS, NAKANE M, SCHWARZ P, GATH I, KLEINERT H.

Nitric oxide isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. Hypertension 1994; 23: 1121 - 1131.

FÖRSTERMANN U, MÜGGE A, ALHEID U, HAVERICH A, FRÖLICH JC.

Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries.

Circ Res 1988, 62: 185 - 190

FÖRSTERMANN U, MÜLSCH A, BÖHME E, BUSSE R.

Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries.

Circ Res 1986; 58: 531 - 538.

FÖRSTERMANN U, TROGISCH G, BUSSE R.

Species-dependent differences in the nature of endothelium-derived vascular relaxing factor.

Eur J Pharmacol 1984; 106: 639 - 643.

FRANCIOSA JA, MIKULIC E, COHN N, JOSE E, FABIE A.

Hemodynamic effects of orally administered isosorbide dinitrate in patients with congestive heart failure.

Circulation 1974; 50: 1020 - 1024.

FURCHGOTT RF.

Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide.

In: Mechanismus of Vasodilatation, Vol. 4. Vanhoutte P. M. (ed). New York: Raven Press 1988: pp 401 - 414.

FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV.

The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.

Nature 1980; 299: 373 - 376.

FURLONG B, HENDERSON AH, LEWIS MJ , SMITH JA.

Endothelium-derived relaxant factor inhibits in vitro platelet aggregation.

Br J Pharmacol 1987; 90: 687 - 692.

GARLAND CJ, BEVAN JA.

Alpha-adrenoreceptor antagonists selectively reduce thrombin-stimulated contraction in rabbit arteries.

J Pharmacol Exp Ther 1986; 238: 947 - 953

GEBREMEDHIN D, BALLAGI-PORDANY G, HADHAZY P, MAGYAR K,  
MACHOVICH R.

Species specificity of thrombin-induced changes in vascular tone.

Eur J Pharmacol 1986; 132: 71 - 74.

GELLER DA, LOWENSTEIN CJ, SHAPIRO RA ET AL.

Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes.

Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 3491 - 3495.

GILLIS CN, PITT BR.

The fate of circulating amines within the pulmonary circulation.

Ann Rev Physiol 1982; 44: 269 - 281.

GLUSA E.

Endothelium-dependent relaxant effect of thrombin on isolated pig coronary arteries.

Biomed Biochim Acta 1988; 47: S67 - S70.

GLUSA E.

Thrombin induces endothelium-dependent relaxation of pig coronary arteries.

Folia Haematol (Leipz) 1988; 115: 101 - 105.

GLUSA E.

Vascular effects of thrombin.

Semin Thromb Hemost 1992; 18: 296 - 304.

GLUSA E, MARKWARDT F.

Studies on thrombin-induced endothelium-dependent vascular effects.

Biomed Biochim Acta 1988; 47: 623 - 630.

GLUSA E, PAINTZ M, BRETSCHEIDER E.

Relaxant and contractile responses of porcine pulmonary arteries to thrombin and thrombin receptor activating peptides.

Semin Thromb Hemost 1996; 22: 261 - 265.

GLUSA E, PAINTZ M, ZUCKER TP, SCHRÖR K.

Thrombin receptor activating peptide-induced cellular effects: Comparative studies on human platelet activation and endothelium-dependent relaxation of porcine pulmonary arteries.

Agent Actions 1995; 45 (Suppl): 303 - 307.

GLUSA E, WOLFRAM U.

The contractile response of vascular smooth muscle to thrombin and its inhibition by thrombin inhibitors.

Folia Haematol (Leipz) 1988; 115: 94 - 100.

GREEN D, TS'AO C, REYNOLDS N, KAHN D, KOHL H, COHEN I.

In vitro studies of new synthetic thrombin inhibitor.

Thromb Res 1985; 37: 145 - 153.

GREENBERG S, DIECKE FPJ.

Endothelium-derived relaxing and contracting factors: new concepts and new findings.  
Drug Dev Res 1988; 12: 131 - 149.

GREINACHER A, EICHLER P.

Die Heparin-assoziierte Thrombozytopenie - Immunologische Aspekte.  
Hämostaseologie 1995; 15: 117 - 121.

GRIFFITH TM, EDWARDS DH, LEWIS MJ, NEWBY AC, HENDERSON A H.

The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor.  
Nature 1984, 308: 645 - 347.

HARE JM, COLUCCI WS.

Role of nitric oxide in the regulation of myocardial function.  
Prog Cardiovasc Dis 1995; 38: 155 - 166.

HARA H, TAMAO Y, KIKUMOTO R.

Effect of argatroban (MD-805) on platelet function.  
Jpn Pharmacol Ther 1986; 14 (Suppl 5): 13 - 19.

HARA H, TAMAO Y, KIKUMOTO R, OKAMOTO S.

Effect of synthetic thrombin inhibitor MCI-9038 on experimental models of disseminated intravascular coagulation in rabbits.  
Thromb Haemost 1987; 57: 164 - 170.

HARRISON DG, BATES JN.

The nitrovasodilators: New ideas about old drugs.  
Circulation 1993; 87: 1461 - 1467.

HAUPTMANN J, KAISER B, MARKWARDT F.

Anticoagulant action of synthetic tight binding inhibitors of thrombin in vitro and in vivo.  
Thromb Res 1985; 39: 771 - 775.

HAUPTMANN J, STÜRZEBECKER J.

Synthetic inhibitors of thrombin and factor Xa: from bench to bedside.

Thromb Res 1999; 93: 203 - 241.

HAYER VM, NAMM DH.

Characterization of the thrombin-induced contraction of vascular smooth muscle.

Blood Vessels 1984; 21: 53 - 63.

HOGAN JC, LEWIS MJ, HENDERSON AH.

In vivo EDRF activity influences platelet function.

Br J Pharmacol 1988; 94: 1020 - 1022.

HOUSTON DS, SHEPHERD JT, VANHOUTTE PM.

Aggregating human platelets cause direct contraction and endothelium-dependent relaxation of isolated canine coronary arteries - Role of serotonin, thromboxane A<sub>2</sub> and adenosine nucleotides.

J Clin Invest 1986; 78: 539 - 544.

IGNARRO LJ, BYRNS RE, WOOD KS.

Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical.

In: Mechanisms of Vasodilatation. Vol.4. Vanhoutte P. M. (ed). New York: Raven Press 1988; pp 427 - 435.

IIDA S, KOMATSU T, HIRANO T.

Pharmacokinetic studies of argipidine (MD-805) in dogs and rabbits. Blood or plasma level profile, metabolism, excretion and accumulation after single or consecutive intravenous administration of argipidine.

Oyo Yakuri 1986; 32: 1117 - 1127.

JAFFE EA, GRULICH J, WEKSLER BB.

Correlation between thrombin-induced prostacyclin production and inositol triphosphate and cytosolic free calcium levels in cultured human endothelial cells.

J Biol Chem 1987; 262: 8557 - 8565.

KAISER B, MARKWARDT F.

Experimental studies on the antithrombotic action of a highly effective synthetic thrombin inhibitor.

Thromb Haemost 1986; 55: 194 - 196.

KELLY RA, BALLIGAND J-L, SMITH TW.

Nitric oxide and cardiac function.

Circ Res 1996; 79: 363 - 380.

KIKUMOTO R, TAMAO Y, TEZUKA T ET AL.

Selective inhibition of thrombin by (2R, 4R)-methyl-1-[N<sup>□</sup>□[□□□methyl-1,2,3,4-tetrahydro-8-quinoliny]-sulfonyl]-L-arginyl}-2-piperidine carboxylic acid.

Biochemistry 1984; 32: 85 - 90.

KING DJ, KELTON JG.

Heparin associated thrombocytopenia.

Ann Intern Med 1984; 100: 535 - 540.

KINNEY M MC, SNIDER RM, RICHELSON E.

Thrombin binding to human brain and spinal cord.

Mayo Clin Proc 1983; 58: 829 - 831.

KOBAYASHI S, TAZAKI Y.

Effect of the thrombin inhibitor argatroban in acute cerebral thrombosis.

Semin Thromb Hemost 1997; 23: 531 - 534

KU DD.



Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischaemia.

Science 1982; 218: 576 - 578.

KUMADA K, ABIKO Y.

Comparative study on heparin and a synthetic thrombin inhibitor no. 805 (MD-805) in experimental antithrombin deficient animals.

Thromb Res 1981; 24: 285 - 298.

KUMON K, TANAKA K, NOBUYUKI N, YASUAKI N, FUJITA T.

Anticoagulation with a synthetic thrombin inhibitor after cardiovascular surgery and treatment of disseminated intravascular coagulation.

Crit Care Med 1984; 12: 1039 - 1043.

LINDER L, KIOWSKY W, BÜHLER FR, LÜSCHER TF.

Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension.

Circulation 1990; 81: 1762 - 1767.

LÜCKHOFF A, BUSSE R.

Increased free calcium in endothelial cells under stimulation with adenine nucleotides.

J Cell Physiol 1986; 126: 414 - 420.

MARIN J, SANCHEZ-FERRER CF.

Role of endothelium-formed nitric oxide on vascular responses.

Gen Pharmac 1990; 21: 575-584.

MARKWARDT F.

Hirudin als potentielles Anticoagulans zur Prävention der Rethrombosierung nach intrakoronarer Lyse und Angioplastie.

Hämostaseologie 1989; 9: 204 - 208.

MATSUO T, KARIO K, KODAMA K, OKAMOTO S.

Clinical application of the synthetic thrombin inhibitor, argatroban (MD-805).  
Semin Thromb Hemost 1992; 18: 155 - 159.

MATSUO T, KOIDE M, KARIO K.

Development of argatroban, a direkt thrombin inhibitor, and its clinical application.  
Semin Thromb Hemost 1997; 23: 516 - 522.

MATSUO T, YAMADA T, YAMANASHI T, RYO R.

Anticoagulant therapy with MD 805 of a hemodialysis patient with heparin-induced thrombocytopenia.  
Thromb Res 1990; 58: 663 - 666.

MCBRIDE W, LANGE RA, HILLIS LD.

Restenosis after successful coronary angioplasty. Pathophysiology and prevention.  
N Engl J Med 1988; 318: 1734 - 1737.

MEHTA S, STEWART DJ, LANGLEBEN D, LEVY RD.

Short-term pulmonary vasodilation with L-arginine in pulmonary hypertension.  
Am Heart Ass 1995; 1539 - 1541.

MELKUMYANTS AM, BALASHOV SA, VESELOVA ES , KHAYUTIN VM .

Continuous control of the lumen of feline conduit arteries by blood flow rate.  
Cardiovasc Res 1987; 21: 863 - 870.

MELLOTT MJ, CONNELLY TM, YORK SJ, BUSH LR.

Prevention of reocclusion by MCI-9038, a thrombin inhibitor, following t-PA induced thrombolysis in a canine model of femoral arterial thrombosis.  
Thromb Haemost 1990; 64: 526 - 534.

MOSCAT J, MORENE F, GARCIA-BARRENE P.

Mitogenic activity and inositide metabolism in thrombin-stimulated pig aorta endothelial cells.

Biochem Biophys Res Commun 1987; 145: 1302 - 1309.

MÜGGE A, BRANDES R, BÖGER RH, DWENGER A, BODE-BÖGER SM, KIENKE S, FRÖLICH JC, LICHTLEN PR.

Vascular release of superoxide radicals is enhanced in hypercholesterolemic rabbits.

J Cardiovasc Pharmacol 1994; 24: 994 - 998.

MÜLSCH A, BÖHME E, BUSSE R.

Stimulation of soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from cultured endothelial cells.

Eur J Pharmacol 1987; 135: 247 - 250.

NATHAN C.

Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells.

FASEB J 1992; 6: 3051 - 3064.

NEEDLEMAN P, JAKSCHIK B, JOHNSON EM.

Sulfhydryl requirement for relaxation of vascular smooth muscle.

J Pharmacol Exp Ther 1973; 187: 324 - 331.

NOSSEL HL, YUDELMAN I, CANFIELD RE.

Measurement of fibrinopeptide A in human blood.

J Clin Invest 1974; 54: 43 - 53.

OHARA Y, PETERSON TE, HARRISON DG.

Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production.

J Clin Invest 1993; 91: 2546 - 2551.

OTA K, KAWAGUCHI H, NAKAGAWA S ET AL.

Clinical evaluation of a new thrombin inhibitor available for haemodialysis.

Eur Dialysis Transplant Assoc 1983; 20: 144 - 149.

OWEN J, FRIEDMAN KD, GROSSMAN BA, WILKINS C, BERK AD, POWERS R.

Thrombolytic therapy with tissue plasminogen activator or streptokinase induces transient thrombin activity.

Blood 1988; 72: 616 - 620.

PALMER RMJ, ASHTON DS, MONCADA S.

Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine.

Nature 1988; 333: 664 - 666.

PALMER RMJ, FERRIGE AG, MONCADA S.

Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.

Nature 1987; 327: 524 - 526.

PANZA JA, CASINO PR, BADAR DM, QUYYUMI AA.

Effect of increased availability of endothelium-derived nitric oxide precursor on endothelium-dependent vascular relaxation in normal subjects and in patients with essential hypertension.

Circulation 1993; 87: 1475 - 1481.

PEARSON JD, GORDON JL.

Nucleotide metabolism by endothelium.

Ann Rev Physiol 1985; 47: 617 - 627.

PFEILSCHIFTER J, EBERHARDT W, HUMMEL R, KUNZ D, MÜHL H, NITSCH D, PLÜSS C, WALKER G.

Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase - potential for a novel class of anti-inflammatory agents.

Cell Biol Int 1996; 20: 51 - 58.

POHL U, BUSSE R, KUON E, BASSENGE E.

Pulsatile perfusion stimulates the release of endothelial autocoids.

J Appl Cardiol 1986; 1: 215 - 235.

POHL U, HOLTZ J, BUSSE R, BASSENGE E.

Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo.

Hypertension 1986; 8: 37 - 44.

PUCCI ML, DICK LB, MILLER KB, SMITH CJ, NASJLETTI A.

Enhanced responses to l-arginine in aortic rings from rats with angiotensin-dependent hypertension.

J Pharmacol Exp Ther 1995; 274: 1 - 7.

RAGAZZI E, CHINELLATO A, PANDOLFO L, FROLDI G, CAPARROTTA L,  
ALIEV G, PRODOCIMI M, FASSINA G.

Endothelial nucleotide-mediated aorta relaxation in aged watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.

J Cardiovasc Pharmacol 1995; 26: 119 - 126.

RAPOPORT RM.

Cyclic guanosine monophosphate inhibition of contraction may be mediated through inhibition of phosphatidylinositol hydrolysis in rat aorta.

Circ Res 1986; 58: 407 - 410.

RAPOPORT RM, MURAD F.

Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP.

J Cyclic Nucleotide Res 1983; 9: 281 - 296.

RASMUSSEN UB, VOURET-CRAVIARI V, JALLAT S, SCHLESINGER Y, PAGES

G, PAVIRANI A, LECOCQ JP, POUYSSEGUR J, VAN OBBERGHEN-SCHILLING E.  
cDNA cloning and expression of a hamster  $\alpha$ -thrombin receptor coupled to  $Ca^{2+}$  mobilization.

FEBS Lett 1991; 288: 123 - 128.

REES D, PALMER RMJ, MONCADA S.

Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure.

Proc Natl Acad Sci 1989; 86: 3375 - 3378.

REES D, PALMER RM, SCHULZ R, HODSON HF, MONCADA S.

Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo.

Br J Pharmacol 1990; 101: 746 - 752.

RIEDE UN, SCHAEFER HE, WEHNER H.

Allgemeine und spezielle Pathologie.

Arteriosklerose 1989; 9: 386 - 393.

RING ME, BUTMAN SM, BRUCK DC, FEINBERG WM, CORRIGAN JJ.

Fibrin metabolism in patients with acute myocardial infarction during and after treatment with tissue type plasminogen activator.

Thromb Haemost 1988; 60: 428 - 433.

ROSENBERG, RD, DAMUS PS.

The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor.

J Biol Chem 1973; 248: 6490 - 6505.

RUBANYI GM, LORENZ RR, VANHOUTTE PM.

Bioassay of endothelium-derived relaxing factor(s): inactivation by catecholamines.

Am J Physiol 1985; 249: H 95 - 101.

RUBANYI GM, ROMERO JC, VANHOUTTE PM.

Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor.

Am J Physiol 1986; 250: H 1145 - 1149.

SCHÄCHINGER V, ZEIHNER AM.

NO in der Therapie der Angina pectoris: Nitrate oder Molsidomin?

Internist 1997; 38: 438 - 447

SCHMIDT HHHW, LOHMANN SL, WALTER U.

The nitric oxide and cGMP signal-trans-duction pathway.

Biochem Biophys Acta 1993; 1178: 153 - 175.

SCHMIDT HHHW, NAU H, WITTFOHT W, GERLACH J, PRESCHER KE, KLEIN MM, NIROOMAND F, BÖHME E.

Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide.

Eur J Pharmacol 1988; 154: 213 - 216.

SCHMIDT HHHW, WALTER U.

NO at work.

Cell 1994; 78: 919 - 925.

SCHRÖDER H.

Neue Erkenntnisse zum molekularen Wirkungsmechanismus von Nitrovasodilatoren und ihre Bedeutung für die Klinik.

Med Welt 1994; 45: 426 - 431.

SCHRÖDER H, LEITMAN DC, BENNETT BM, HAYWARD LD, MURAD F.

Cultured rat lung fibroblasts as a model for organic-nitrate-induced cyclic GMP accumulation and activation of guanylate cyclase.

J Appl Cardiol 1987; 2: 301 - 311.

SCHRÖDER H, SCHRÖR K.

Inhibitors of cytochrome P-450 reduce cyclic GMP stimulation by glyceryl trinitrate in LLC-PK<sub>1</sub> kidney epithelial cells.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1990; 342: 616 - 618.

SCHRÖR K, BRAUN M.

Platelets as a source of vasoactive mediators.

Stroke 1990; 21 (Suppl. IV): 32 - 35.

SCHRÖR K, HOHLFELD T.

Koagulation, Thrombose und Fibrinolyse bei myocardialer Ischämie.

In: G. Heusch (Hrsg) Pathophysiologie und rationale Pharmakotherapie der Myocardischämie. Steinkopff, Darmstadt, 1990; S 89 - 117.

SCHUMACHER WA, HERAN CL, STEINBACHER TE.

Low-molecular-weight heparin (Fragmin) and thrombin active-site inhibitor (argatroban) compared in experimental arterial and venous thrombosis and bleeding time.

J Cardiovasc Pharmacol 1996; 28: 19 - 25.

SELLKE FW, MYERS PR, BATES JN, HARRISON DG.

Influence of vessel size on the sensitivity of porcine microvessels to nitroglycerin.

Am J Physiol 1990; 258: H515 - H520.

SERVENT D, DELAFORGE M, DUCROCQ C, MANSUY D, LENFANT M.

Nitric oxide formation during microsomal hepatic denitration of glyceryl trinitrate: Involvement of cytochrome P-450.

Biochem Biophys Res Commun 1989; 163: 1210 - 1216.

SMIESKO V, KOZIK J, DOLEZEL S.

Role of endothelium in the control of arterial diameter by blood flow.

Blood Vessels 1985; 22: 247 - 251.

STAFFORINI DM, MCINTYRE TM, CARTER ME, PRESCOTT SM.



Human plasma platelet activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor.

J Biol Chem 1987; 262: 4215 - 4222.

STÜRZEBECKER J, MARKWARDT F.

Synthetische Inhibitoren des Thrombins und anderer Gerinnungsenzyme - Struktur und Wirkung - Beiträge zur Wirkstoffforschung 1982.

STÜRZEBECKER J, MARKWARDT F, VOIGT B, WAGNER G, WALSMANN P.

Cyclic amides of N-arylsulfonylaminoacylated 4-amidino-phenylalanine-tight binding inhibitors of thrombin.

Thromb Res 1983; 29: 635 - 642.

TADDEI S, VIRDIS A, MATTEI P, ARZILLI F, SALVETTI A.

Endothelium-dependent forearm vasodilation is reduced in normotensive subjects with familial history of hypertension.

J Cardiovasc Pharmacol 1992; 20: 193 - 195.

TADDEI S, VIRDIS A, MATTEI P, SALVETTI A.

Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. Hypertension 1993; 21: 929 - 933.

TAMAO Y, KIKUMOTO R.

Effect of argatroban, a selective thrombin inhibitor, on animal models of cerebral thrombosis.

Semin Thromb Hemost 1997; 23: 523 - 530.

TAPPARELLI C, METTERNICH R, EHRHARDT C, COOK NS.

Synthetic low-molecular weight thrombin inhibitors: molecular design and pharmacological profile.

Trends Pharmacol Sci 1993;14: 366 - 375.

TWORT CHC, VAN BREMEN C.

Cyclic guanosine monophosphate-enhanced sequestration of  $\text{Ca}^{2+}$  by sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle.

Circ Res 1988; 62: 961 - 964.

VALLANCE P, COLLIER J, MONCADA S.

Effects of endothelium- derived nitric oxide on peripheral arterial tone in man.

Lancet 1989; 2: 977 - 1000

VU TKH, HUNG DT, WHEATON VL, COUGHLIN SR.

Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation.

Cell 1991; 64: 1057 - 1068.

WALZ DA, ANDERSON GF, FENTON JW.

Responses of aortic smooth muscle to thrombin and thrombin analogues.

Ann NY Acad Sci USA 1986; 485: 323 - 334.

WEITZ JI, HUDOBA M, MASEL D, MARAGANORE J, HIRSH J.

Clot bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III independent inhibitors.

J Clin Invest 1990; 86: 385 - 391.

WHITE RP, SHIRASAWA Y, ROBERTSON JT.

Comparison of responses elicited by alpha-thrombin in isolated canine basilar, coronary, mesenteric and renal arteries.

Blood Vessels. 1984; 21: 12 - 22.

WINN M J, JAIN K, KU DD.

Argatroban and inhibition of the vasomotor actions of thrombin.

J Cardiovasc Pharmacol 1993; 22: 754 - 760.

WOLF J, WERRINGLOER J.

Metabolic degradation of glyceryl trinitrate.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1988; 337 (Suppl.): R 9.

WOLFRAM U.

Untersuchungen zur vasokonstriktorisches Wirkung von Thrombin an isolierten Gefäßpräparaten.

Dissertation 1987; Med Akademie Erfurt.

ZEIHER AM.

Endothelial vasodilator dysfunction: pathogenetic link to myocardial ischemia or epiphenomen.

Lancet 1996; 348: S 10 - S 12.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbständig angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Univ.-Prof. Dr. E. Glusa,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und daß Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

daß ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

daß ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Sondershausen, 18.04.2001

Hans-Martin Schrödter

## **Lebenslauf**

Name, Vorname: Schrödter, Hans-Martin  
Geburtsdatum, -ort: 18.10.1968 in Köthen/Sachsen-Anhalt  
Anschrift: Schloßstraße 48  
99706 Sondershausen  
Familienstand: verheiratet

### Schulbildung:

09/75 – 08/85 10. POS „Friedrich-Schiller“ Eilenburg  
09/85 – 08/87 EOS „Friedrich-Engels“ Eilenburg  
1987 Abitur

### Hochschulbildung

09/89 – 08/91 Universität Leipzig, Studiengang Humanmedizin  
09/91 – 09/95 FSU Jena, Ausbildungsort Erfurt,  
Studiengang Humanmedizin  
09/95 Hochschulabschluß mit dem III. Staatsexamen der  
Humanmedizin an der FSU Jena

### Berufliche Tätigkeit

09/87 – 10/87 Klinisches Vorpraktikum im Kreiskrankenhaus  
Eilenburg  
09/89 – 10/87 Klinisches Vorpraktikum im Kreiskrankenhaus  
Sondershausen  
10/95 – 03/96 AiP an der FSU Jena, Institut für vaskuläre Biologie  
und Medizin, Bereich Erfurt, Institut für experimentelle  
Angiologie und Hämostaseologie  
04/96 – 03/97 AiP in der Inneren Abteilung des Kyffhäuserkreis-  
krankenhauses Sondershausen  
ab 04/97 Arzt in Weiterbildung in der Inneren Abteilung des  
Kyffhäuserkreiskrankenhauses Sondershausen

Sondershausen, 18.04.2001

Hans-Martin Schrödter

**THESEN ZUR DISSERTATION**

**Untersuchungen über den Einfluß des synthetischen  
Thrombininhibitors Argatroban auf isolierte Gefäße**

**vorgelegt von**

**Hans-Martin Schrödter**

**Sondershausen, im Mai 2001**

## Thesen

1. Endothelzellen sind an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt, indem sie durch NO-Synthasen aus der Aminosäure L-Arginin Stickstoffmonoxid (NO) synthetisieren, das die lösliche Guanylatzyklase aktiviert und einen Anstieg des cGMP bewirkt. Über cGMP-abhängige Proteinkinase der glatten Muskelzellen der Gefäßwand kommt es zu einer Relaxation der Gefäßmuskelzellen. In Endothelzellen kann die NO-Synthese über die Aktivierung von membranständigen Rezeptoren oder durch Scherkräfte des strömenden Blutes stimuliert werden.
2. An Gefäßen mit geschädigtem Endothel ist die endothelabhängige Vasodilatation vermindert. Hier bewirkt eine exogene Zufuhr von L-Arginin - dem Substrat der NO-Synthase - eine verbesserte endothelabhängige Vasodilatation.
3. Die endothelabhängige Relaxation wird im allgemeinen an vorkontrahierten Gefäßen untersucht. Es wurden daher verschiedene Agonisten mit vasokonstriktorischer Wirkung wie Serotonin, Phenylephrin und Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  an der A. carotis von Kaninchen geprüft, deren vasokonstriktorische Wirkung an den Gefäßen ohne Endothel verstärkt ist.
4. An vorkontrahierten Ringen der A. carotis von Kaninchen löst Acetylcholin eine endothelabhängige Relaxation aus, die NO-vermittelt ist, da durch Hemmung der NO-Synthase durch  $N^G$ -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) und L-Glutamin die Wirkung vermindert wird. Ein Substratüberschuß, d.h. eine Zugabe von L-Arginin, bewirkt eine teilweise Aufhebung der Wirkung von L-NAME bzw. Glutamin.
5. Das Argininderivat Argatroban, ein kompetitiver synthetischer Thrombininhibitor, hat in vitro keinen relaxierenden als auch kontrahierenden Effekt an Gefäßen mit intaktem Endothel. Die Acetylcholin-induzierte endothelabhängige Relaxation wird nicht verstärkt.

6. Durch Argatroban wird die durch L-NAME hervorgerufene Verminderung der Acetylcholin-induzierten Gefäßrelaxation in vitro geringfügig konzentrationsabhängig abgeschwächt.
7. Vor und 30 min nach i.v. Gabe von Argatroban (1 mg/kg) wurde narkotisierten Kaninchen je eine A. carotis entnommen und die endothelabhängige Relaxation durch Acetylcholin und die vasokonstriktorische Wirkung von Serotonin, Phenylephrin und Arachidonsäure sowie plättchenreichem Plasma untersucht. Dabei zeigte sich kein Unterschied zu den Gefäßen ohne Vorbehandlung mit Argatroban.
8. Argatroban hemmt nach i.v. Applikation dosisabhängig die Gerinnung, die sich in einer signifikanten Verlängerung der aPTT und der Thrombinzeit zeigt, d.h. bei zuverlässiger gerinnungshemmender Wirkung führt Argatroban zu keinen Veränderungen an intakten Gefäßen.
9. In weiterführenden Experimenten sollte die Wirkung von Argatroban an arteriosklerotisch veränderten Gefäßpräparaten untersucht werden, da Argatroban möglicherweise ähnlich wie Arginin erst an arteriosklerotischen Gefäßen die gestörte Gefäßrelaxation teilweise wieder aufheben kann.